

**«MICROBIOLOGIA Y BIOQUIMICA DEL QUESO TIPO  
«ULLOA» Y PREPARACION DE UN «FERMENTO» PARA SU  
ELABORACION A PARTIR DE LECHE PASTERIZADA»**

*Por Juan Antonio Ordóñez*

INDICE

CAPITULO I.—INTRODUCCION.—I.1. Generalidades.—I.2. Queso tipo «Ulloa»: características.—I.3. Aspectos microbiológicos de la maduración del queso.—1. Gérmenes lácticos.—1. Estreptococos lácticos homofermentativos.—2. Lactobacilos homofermentativos.—3. Otros gérmenes lácticos que intervienen en la maduración de algunos quesos.—2. Otras bacterias (no clasificadas como gérmenes lácticos) que intervienen en la maduración del queso.—1. Micrococos. 2. Enterococos.—I.4. Aspectos bioquímicos de la maduración del queso.—1. Glicolisis.—2. Metabolismo lipídico.—3. Proteolisis y tasa de aminoácidos libres.—1. Actividad proteolítica de diferentes bacterias que intervienen en la maduración de los quesos, similares al tipo «Ulloa».—1. Actividad proteolítica de los estreptococos lácticos.—2. Actividad proteolítica de los lactobacilos.—3. Actividad proteolítica de los enterococos.—CAPITULO II.—MATERIAL, PRODUCTOS Y METODOS.—II.1. MATERIAL.—1. Material general.—2. Microscopía.—3. Liofilizaciones.—4. Concentraciones de volumen.—5. Cromatografías.—II.2. PRODUCTOS.—1. Reactivos.—2. Soportes cromatográficos.—3. Disolventes y purificación de los mismos.—4. Disolventes para espectrofotometría.—5. Gases.—II.3. METODOS MICROBIOLOGICOS.—1 Transporte y toma de muestras.—2. Preparación de la muestra para los análisis microbiológicos.—3. Preparación de los medios de cultivo.—4. Medios de cultivos utilizados.—5. Recuentos de microorganismos viables.—6. Preparación de las diluciones.—7. Siembras en placa.—8. Recuentos.—9. Aislamientos de las colonias.—10. Identificación de los microorganismos.—1. Género *Streptococcus*.—A. Identificación del género.—B. Género *Streptococcus*, grupos fisiológicos Enterococos (pertenecientes al grupo D de Lancefield) y Láctico (grupo N de Lancefield).—C. Identificación de las especies del género *Streptococcus*.—1. Grupo Enterococos.—2. Grupo Láctico.—2. Género *Lactobacillus*.—A. Identificación del género.—B. Grupos *Streptobacterium*, *Thermobacterium* y *Betabacterium*.—C. Especies del género *Lactobacillus*, grupo *Streptobacterium*.—3. Géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*.—A. Identificación de las especies de ambos géneros.—11. Fabricación de los cultivos lácticos.—II.4. METODOS BIOQUIMICOS.—1. Obtención de la muestra. 2. Extracto seco.—3. Determinaciones de nitrógeno.—4. Fraccionamiento de los componentes nitrogenados de los quesos.—1. Obtención de la muestra.—2. Nitrógeno total.—3. Nitrógeno soluble.—4. Nitrógeno no proteíco.—5. Nitrógeno amoniacal.—6. Nitrógeno amónico.—5. Identificación y determinación de aminoácidos libres.—1. Preparación y ajuste de tampones.—2. Preparación del reactivo de ninhidrina.—3. Empaquetado de las columnas.—4. Extracción, purificación y colocación de la muestra; desarrollo de la cromatografía y análisis de las fracciones eluidas.—5. Identificación y cuantificación de los aminoácidos.—6. Determinación del nitrógeno peptídico en la disolución acuosa final, obtenida en la extracción y purificación de los aminoácidos libres del queso.—6. Extracción, fraccionamiento, identificación y cuantificación de los lí-

pidos.—1. Determinación de la materia grasa total.—2. Extracción de los lípidos.—a) Método físico.—b) Método químico.—3. Fraccionamiento de los lípidos purificados en columna de ácido-silílico-celita.—1. Ácido silílico-celita 4/1.—2. Ácido silílico-celita 1/1.—4. Fraccionamiento de los lípidos apolares en columna de sílica gel.—5. Obtención de la fracción insaponificable.—6. Cromatografía en lámina fina.—7. Reactivos empleados para el revelado de las láminas finas.—1. Reactivos generales.—a) Ácido sulfúrico.—b) Reactivo del iodo.—2. Reactivos específicos.—a) Reactivo de ninhidrina para pulverizaciones.—b) Reactivo de iodo-ioduro potásico.—c) Reactivo del azul de molibdeno.—d) Reactivo periodato-Schiff.—e) Rodamina 6G.—8. Cromatografía en papel de los productos de hidrólisis de los cerebrósidos y glicosilglicéridos.—7. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa.—1. Cromatografía de los ácidos grasos solubles en agua.—2. Metilación de los ácidos grasos libres.—3. Transesterificación de los ácidos grasos esterificados.—4. Cromatografía de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.—5. Identificación de los ácidos grasos.—8. Identificación del colesterol.—9. Cuantificación de los distintos componentes lipídicos caracterizados.—1. Ácidos grasos libres.—2. Triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, hidrocarburos y glicosilglicéridos.—3. Colesterol.—4. Fosfolípidos y cerebrósidos.—10. Ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor.—1. Destilación.—2. Titulación y saponificación.—A. Ácidos grasos solubles.—B. Ácidos grasos insolubles.—3. Preparación de la muestra para el análisis cromatográfico de los ácidos grasos solubles e insolubles.—A. Ácidos grasos solubles.—B. Ácidos grasos insolubles.—11. Determinación de la relación molar de los glicosilglicéridos.—1. Determinación de glucosa.—2. Determinación de glicerol.—CAPITULO III.—RESULTADOS.—III.1. Flora microbiana de la leche y el queso y evolución de la misma a lo largo del proceso de maduración.—1. Flora de la leche. Recuentos.—2. Identificación de los gérmenes responsables de los recuentos.—1. Agar Elliker: Recuentos.—2. Identificación de los gérmenes responsables de los recuentos.—1. Agar Rogosa: Lactobacilos.—3. Agar géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*.—2. Agar Rogosa: Lactobacilos.—3. Agar géneros *Enterococcus*: Enterococos.—3. Evolución de la flora más significativa en el queso.—1. Evolución de los micrococos y estafilococos (cocos Gram positivos, catalasa positivos) y de los estreptococos lácticos (Gram positivos, catalasa negativos).—2. Identificación de los gérmenes pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*.—3. Naturaleza de la flora del queso que crece en Agar Rogosa.—4. Identificación de los gérmenes del queso que crecieron en Agar crece en Agar Rogosa.—III.2. Proteolisis durante el proceso madurativo de los quesos fabricados en *Enterococcus*.—III.3. Fabricación de quesos con leche pasterizada y distintos «fermentos».—1. Elaboración de los quesos experimentales en el laboratorio.—1. Ensayo con un cultivo constituido por todos los gérmenes aislados de posible significación en la maduración de quesos.—2. Cultivos constituidos por la flora láctica habitual y combinaciones diversas de la misma con los micrococos y enterococos aislados de los quesos que se pretendía imitar.—2. Fabricación de quesos a escala semiindustrial con leche pasterizada.—1. Valores de las fracciones nitrogenadas más significativas, al final de la maduración, de los quesos fabricados a escala semiindustrial con leche pasterizada.—2. Jurado de catadores.—III.4. Aminoácidos libres.—III.5. Composición lipídica de la cuajada y los quesos fabricados con leche cruda y leche pasteurizada.—1. Extracción del material lipídico por procedimientos físicos y químicos.—2. Fraccionamiento en columna de ácido silílico-celita.—1. Columnas de ácido silílico-celita 4/1.—2. Separación de lípidos polares y «neutros» sobre columna de ácido silílico-celita 1/1.—3. Fraccionamiento, identificación y cuantificación de los lípidos apolares.—1. Comportamiento de la columna, identificación de los componentes apolares eluidos y diferencias entre los lípidos «neutros» de los extractos físico y químico.—2. Fraccionamiento en columna de sílica gel e identificación de los lípidos apolares obtenidos por elución con cloroformo de las columnas de ácido silílico-celita 1/1.—3. Purificación por cromatografías en láminas finas de sílica gel, de los lípidos apolares para el análisis de ácidos grasos y para la cuantificación de los distintos componentes.—4. Ácidos grasos de los distintos componentes de los lípidos apolares.—5. Cuantificación de los lípidos apolares caracterizados.—6. Comparación de los lípidos apolares de los extractos físicos y químicos del queso.—4. Fraccionamiento, identificación y cuantificación de los lípidos polares.—1. Caracterización de los cerebrósidos y glicosilglicéridos identificados de los lípidos polares.—2. Naturaleza del glicosilglicérido.—3. Ácidos grasos de los lípidos polares.—4. Cuantificación de los componentes polares de los extractos lipídicos.—III.6. Ácidos grasos libres, arrastrables en corriente de vapor.—CAPITULO IV.—DISCUSIÓN.—IV.1. Aspectos microbiológicos.—1. Leche.—2. Evolución de la flora en los quesos fabricados con leche cruda.—IV.2. Proteolisis de los quesos elaborados con leche cruda.—IV.3. Quesos fabricados experimentalmente en el laboratorio con leche pasterizada y distintos fermentos.—IV.4. Pruebas a escala semiindustrial y establecimiento del cultivo definitivo.—1. Proteolisis.—2. Calidad organoléptica.—IV.5. Aminoácidos libres en el queso tipo «Ulloa».—IV.6. Composición lipídica.—1. Componentes lipídicos apolares.—2. Composición en ácidos grasos de los lípidos apolares.—3. Componentes lipídicos polares.—4. Ácidos grasos de los lípidos polares.—

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

#### I.1. Generalidades.

La tecnología de la fabricación del queso es una de las más complejas y variadas de la industria alimentaria. Se calcula (DAVIS, 1965) que anualmente se destinan más de tres millones de toneladas de leche a la fabricación de este producto, lo que pone de manifiesto su extraordinaria importancia económica. La diversidad de la misma queda evidenciada si se considera que existen en el mundo cerca de un millar de variedades y que prácticamente todas ellas se obtienen a partir de leche procedente de tres especies de mamíferos (vaca, cabra y oveja) de composición relativamente homogénea.

Aunque es posible que tal diversidad de productos sea un tanto artificiosa, en cuanto que un gran número de las variedades reconocidas son muy similares, es indudable que los distintos tipos de quesos ofrecen características físicas, químicas y organolépticas claramente muy distintas resultantes de la acción conjunta sobre los componentes de la leche de un gran número de factores interdependientes que pueden clasificarse en:

- 1) Factores microbiológicos: composición de la flora originalmente presente en la leche y la accidentalmente llegada a ella o intencionadamente añadida.
- 2) Factores bioquímicos: acción de los enzimas de la leche que quedan retenidos en la cuajada, de los liberados por las bacterias, levaduras y mohos y de los presentes en el cuajo.
- 3) Factores físicos y físico-químicos: temperatura, pH y efectos osmóticos.
- 4) Factores químicos: agua y calcio retenidos en la cuajada, concentración salina y composición de la atmósfera (humedad, CO<sub>2</sub>, amoniaco, etc.).
- 5) Factores mecánicos: corte, agitación, trituración, frotamiento, prensado, etc., que modifican los efectos de los precedentes.

La importancia relativa de estos factores varía en los distintos tipos de quesos y algunos de ellos ni siquiera actúan en determinadas variedades. Los más importantes y, sin duda, los más frecuentemente implicados son los factores microbiológicos y bioquímicos; su contribución sobre alguna de las etapas del proceso global, la maduración por ejemplo, es prácticamente del 100 %. A lo largo de esta etapa es cuando la cuajada que es un gel de fosfocaseinato cálcico (que engloba grasa, otras proteínas y sales) muy elástico con un sabor poco acusado y prácticamente indiferenciado se transforma en un producto más o menos estructurado, a veces con «ojos», con una composición química muy variable y unas características organolépticas (olor y sabor) frecuentemente muy acusadas.

Estas modificaciones más o menos intensas, según el tipo de queso, se deben a las acciones específicas de los enzimas lácteos, microbianos y del cuajo sobre los componentes químicos de la cuajada. Sin despreciar la importancia relativa de los enzimas de la leche y el cuajo, ni la de los factores físicos, físico-químicos y mecánicos que modulan la acción de unos y otros, es, sin duda, la flora microbiana participante en el proceso madurativo la responsable de las diferencias organolépticas fundamentales de los distintos tipos de quesos. Esta flora, en los llamados quesos de maduración natural, fabricados con leche no tratada por el calor es la originalmente presente en la misma o accidentalmente llegada a ella. Formando parte de esta flora natural se hallan, con frecuencia, microorganismos patógenos tales como algunos estafilococos, salmonelas, brucelas

y *Mycobacterium tuberculosis* que pueden causar graves problemas sanitarios al consumidor y de cuya inactivación durante el proceso madurativo, por los cambios del pH y actividad de agua, no es posible fiar, especialmente en el caso de las brucelas. Para liberarse del riesgo potencial que su supervivencia supone, especialmente en los quesos frescos y de maduración corta, la legislación de algunos países, España entre ellos, exige la pasterización de la leche. El «Código Alimentario Español», que todavía no ha entrado en vigor, en su artículo 3.15.31 dice que «será obligatoria la pasterización previa de la leche para todos los tipos de quesos comprendidos en la clasificación de «queso fresco» y aquellos cuyo consumo se realice antes de los tres meses». La legislación vigente se especifica en la Orden del Ministerio de la Gobernación de 25 de junio de 1968 (B. O. del Estado, núm. 185, de 2 de agosto) por la que, «como prevención para la lucha contra la brucelosis, se exige la pasterización obligatoria de la leche para la elaboración de los quesos frescos y de los que se consuman antes de los dos meses siguientes a su fabricación».

Los tratamientos térmicos utilizados para la pasterización de la leche destruyen los microorganismos que mayor trascendencia tienen en la determinación de las propiedades que finalmente muestra un queso. Resulta, por ello, necesario cuando el queso se fabrica a partir de leche pasterizada, la sustitución de la flora natural por otra intencionadamente añadida.

Si se pretende mantener las características propias de un determinado tipo de queso y fabricarlo con leche pasterizada, es imprescindible conocer a fondo la flora microbiana que participa en la determinación de tales propiedades cuando el queso se fabrica a partir de leche cruda y la importancia relativa de cada uno de sus componentes.

El presente trabajo constituye un intento de esta naturaleza referido al queso gallego tipo «Ulloa», cuyo período de maduración es corto, ya que su consumo se efectúa entre 3 y 4 semanas después de su elaboración y que por tanto debería fabricarse con leche pasterizada.

## I.2. Queso tipo «Ulloa»: características.

Se fabrica esta variedad, principalmente, en la provincia de Lugo y se puede definir como:

«Queso de pasta no cocida, de cuajada lavada y unas dimensiones medias de 20 cm de diámetro por 4-6 cm de altura, fabricado exclusivamente con leche de vaca adicionada de cuajo. La corteza es fina y elástica y la masa interna blanda, conteniendo como mínimo 40 gr de materia grasa por 100 gr. de extracto seco y cuyo contenido en materia seca es superior al 44%».

La producción quesera gallega, en general, según COMPAIRÉ (1966) queda recogida en la siguiente tabla (Tabla I.1).

Si tenemos en cuenta que el queso de Tetilla solamente se diferencia del tipo Ulloa en la forma, se deduce que se destinan anualmente 20.175.000 litros de leche a la producción de éste, obteniéndose 2.667.500 Kg. de queso que representa el 89,30 % de la producción

**TABLA I.1**  
Producción anual de los diferentes tipos de quesos gallegos

Tipo de queso	Leche utilizada (litros)	Quesos elaborados (Kg)
San Simón	638.750	73.000
Cerebro	2.190.000	306.000
Ulloa (1)	7.300.000	730.000
Tetilla	12.775.000	1.877.500
<b>TOTAL</b>	<b>22.903.750</b>	<b>2.987.100</b>

(1) A esta cantidad hay que añadir unos 60.000 Kg de queso que anualmente se fabrica en Orense y es semejante en todos los aspectos, al tipo Ulloa.

quesera gallega. Dado que esta variedad de queso se fabrica tradicionalmente con leche cruda, la preparación de un cultivo o «fermento» apto para su elaboración con leche pasterizada ofrece un considerable interés económico.

Por otra parte, pese al volumen de su producción, tanto su microbiología como su bioquímica son totalmente desconocidos.

## I.3. Aspectos microbiológicos de la maduración del queso.

Los microorganismos que en uno u otro momento participan en el conjunto de transformaciones sufridas por la cuajada, merced a las que adquiere las características propias de un queso determinado, son muy numerosos y pertenecen a tres grandes grupos: bacterias, hongos y levaduras; en tanto que en la maduración de ciertos tipos de quesos sólo participan las bacterias, no puede decirse que exista un solo queso maduro exclusivamente por hongos o levaduras.

Aquí trataremos exclusivamente de las bacterias que más frecuentemente intervienen en los procesos madurativos y de las funciones por ellos desempeñadas, haciendo énfasis en aquellas que participan en la maduración de los quesos de características similares a las del tipo «Ulloa».

### I.3.1. Gérmenes lácticos.

La única etapa absolutamente imprescindible en el proceso general de elaboración del queso es la coagulación de la leche, que no es más que la ruptura del equilibrio coloidal en que se encuentran las partículas de fosfocaseinato cálcico a consecuencia de la cual precipitan y forman un gel tridimensional: la cuajada. Este equilibrio suele romperse, para la fabricación del queso, por la acción hidrolítica que el cuajo ejerce sobre la k-caseína, proteína responsable de la estabilidad en la leche de las partículas de fosfocaseinato cálcico, aunque la cuajada puede también formarse bajo la exclusiva acción de otros factores como un pH suficientemente bajo (entre 4,6 y 5,4). Se obtiene así dos formas de cuajadas: ácidas y enzimáticas, de propiedades muy distintas y de gran trascendencia en la marcha de las etapas que van a tener lugar posteriormente. La mayor parte de los quesos se fabrican a partir de una cuajada mixta que participa, en diverso grado, de las propiedades de ambos tipos de cuajada y que se logra mediante la acción del cuajo y la acidificación causada por la acción de los gérmenes lácticos sobre la lactosa de la leche.

Los gérmenes lácticos desempeñan pues, desde el comienzo, uno de los papeles de mayor importancia en la elaboración del queso; el ácido láctico por ellos producido no sólo es capaz de coagular, «per se», la leche y de favorecer la acción del cuajo, cuando la coagulación es mixta, sin que facilita la retracción del coágulo y la expulsión del suero, confiere a la cuajada ciertas características físicas que influyen en la textura final y controla las actividades proteo y lipolítica de los distintos agentes responsables de las mismas, de un lado por gobernar el crecimiento microbiano impidiendo el desarrollo de los gérmenes putrefactivos, y de otro, por influir sobre la actividad de todos los enzimas.

Los gérmenes lácticos producen además, otras sustancias; algunas, como el diacetilo, provistas de propiedades aromáticas deseables en unos casos e indeseables en otros, otras que ejercen un efecto regulador del crecimiento de otros gérmenes, bien por poseer valor de factores de crecimiento, bien por ofrecer un carácter antibiótico, como la nisinina.

Fueron clasificados por KLUYVER y DONKER en 1935, en homofermentativos y heterofermentativos, atendiendo a la ruta metabólica utilizada para la transformación de la lactosa en ácido láctico; en el primer grupo se incluyen aquellos microorganismos que dan un solo producto final, ácido láctico, a partir de la lactosa y en el segundo los que liberan cantidades notables de otros compuestos como  $\text{CO}_2$ , ácido acético, ácido fórmico, acetaldehido, diacetilo, etc.

La distinción entre gérmenes lácticos homo y heterofermentativos no tiene unos límites precisos (GONSALUS y NIVEN, 1942). En los momentos actuales se considera que existen tres tipos de gérmenes lácticos (BUYZE y col., 1957), dependiendo de la posesión de aldolasa, 6-fosfatodeshidrogenasa y 6-fosfogluconatodeshidrogenasa. Los homofermentativos poseen aldolasa y carecen de las deshidrogenasas, siguiendo en la degradación de la glucosa el ciclo de Embden-

Meyerhof. Los heterofermentativos carecen de la aldolasa y triosafosfatodeshidrogenasa pero poseen glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y 6-fosfogluconatodeshidrogenasa, y una fosfocetolasa, metabolizando la glucosa vía la ruta de Warburg-Dickens, dando por cada unidad de glucosa una de  $\text{CO}_2$  y otra de fosfato de pentosa que merced a la acción de la fosfocetolasa se escinde en d-3-fosfogliceraldehido (que ingresa en la ruta de Embden-Meyerhof y produce ácido láctico) y acetil fosfato que puede pasar a acetaldehido y transformarse en etanol, acetoína, diacetilo, etc.

El tercer grupo, los heterofermentativos facultativos, poseen tanto la aldolasa precisa para el funcionamiento de la vía Embden-Meyerhof como las deshidrogenasas y fosfocetolasa de la ruta de los fosfatos de pentosa; siguen generalmente las rutas metabólicas de los homofermentativos obligados, pero cuando las condiciones son adversas pueden seguir la de los fosfatos de pentosa.

En el grupo de los lácticos homofermentativos se incluyen hoy ciertos estreptococos del grupo fisiológico «láctico» (*Streptococcus lactis* y *S. cremoris*) (MARTH, 1963) y algunos lactobacilos, los grupos *Thermobacterium* y *Streptobacterium* de Orla Jensen (ROcosa y SHARPE, 1959) y el género *Pediococcus* (GUNTHER, 1959). Como lácticos heterofermentativos se clasifican el *Streptococcus diacetilactis* (MARTH, 1963), el género *Leuconostoc* (MARTH, 1963) y los *Bacterium* de Orla Jensen, pertenecientes al género *Lactobacillus* (ROcosa y SHARPE, 1959).

#### I.3.1.1. *Estreptococos lácticos homofermentativos.*

Entre los primeros estudios sobre el papel de los estreptococos lácticos en la elaboración del queso se encuentran los de EVANS y col., (1914, 1918), quienes concluyeron que estos gérmenes se encuentran con regularidad y en gran número en todos los quesos tipo Cheddar y que su función primordial es la producción de ácido láctico a partir de la lactosa.

Ambas especies son muy similares pero *Streptococcus cremoris* no crece a 40°C., ni produce amoníaco a partir de la arginina o peptona, tampoco fermente la maltosa y es menos resistente a las condiciones adversas para el crecimiento. En casi todas las variedades de queso de pasta no cocida intervienen ambas especies (*S. cremoris* y *S. lactis*).

El *S. cremoris* es el germen responsable de la acidificación inicial producida por los cultivos usados para la fabricación del queso aunque a veces, puede deberse a alguna cepa de *S. lactis* (COLLINS, 1962). Ambos suelen usarse en cultivos mixtos. En el curso de la maduración suelen evolucionar de un modo distinto; en el queso Cheddar, *S. lactis* perdura, en grandes números, durante 8 semanas y disminuye luego gradualmente; el número de células de *S. cremoris* se va extinguendo, en cambio, rápidamente a partir de las 2 primeras semanas (DAWSON y FEAGAN, 1957). La diferente resistencia de las dos especies permite el logro de condiciones adecuadas para que otros microorganismos proliferen y determinar de una forma indirecta las características organolépticas finales, al controlar la implantación de una flora con intervención directa en la producción del aroma.

Si la acción acidificante de los estreptococos lácticos es o no suficiente para el logro de un producto final satisfactorio sin necesitar para ello de la colaboración de otros gérmenes, es una cuestión sobre la que existen opiniones contradictorias: WHITEHEAD y col. (1939) opinan que *S. lactis* y *S. cremoris* pueden producir suficiente ácido para asegurar un buen producto final mientras que SZABA y BALATONI (1962) afirman lo contrario.

#### I.3.1.2. *Lactobacilos homofermentativos.*

Los lactobacilos homofermentativos tienen una especial significación. Colaboran en las primeras fases de la fabricación del queso con los estreptococos lácticos, en la acidificación; prolongan su acción hasta etapas más avanzadas que aquéllos (cuando todos los estreptococos han desaparecido) (DAWSON y FEAGAN, 1957; JOHNS y COLE, 1959) y contribuyen a la hidrólisis de la caseína y de la materia grasa.

Se aíslan en todos los quesos, incluso en los frescos. Provienen principalmente de la leche (PERRY y SHARPE, 1960) aunque también pueden proceder de contaminaciones a partir del aire y otras fuentes (NAYLOR y SHARPE, 1958). Los lactobacilos constituyen la flora más importante de todos los quesos duros y de la mayor parte de los semiduros, predominando en los últimos estadios de la maduración.

Son un componente esencial de la flora de todos los quesos, excepto en aquellos cuya maduración es de unos pocos días, en que los predominantes son los estreptococos lácticos.

Su acción no siempre es deseable; ciertas especies producen sabores no convenientes para determinadas variedades de quesos, como ocurre con el *L. plantarum* que puede dar lugar a un ligero sabor amargo, no deseable en el queso Cheddar (DEANE y col., 1945).

En los quesos de pasta cruda sólo tienen importancia los lactobacilos mesófilos homofermentativos (*Streptobacterium* de Orla Jensen); los termófilos se utilizan para los quesos de pasta cocida y los heterofermentativos son microorganismos nefastos para la industria quesera, puesto que pueden provocar el hinchamiento precoz de la cuajada o del queso recién fabricado. En la leche suelen hallarse lactobacilos homo y heterofermentativos pero, afortunadamente, el ritmo de proliferación de los últimos es menor que el de los homofermentativos (PERRY y SHARPE, 1960). Estos autores observaron en la leche usada para la fabricación de queso Cheddar *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. fermenti*; los dos últimos (heterofermentativos) proliferaban mucho menos que los primeros (homofermentativos); MABBITT y ZIELINSKA (1955) demostraron con anterioridad que el equilibrio de aminoácidos en el queso joven es desfavorable para el crecimiento de *L. brevis* y que el incremento de la presión osmótica por la subida de la tasa de aminoácidos libres al cabo de seis meses de maduración ejerce también, sobre ellos, un efecto inhibidor.

Al *L. plantarum* apenas se le concede importancia en la maduración del queso (ALAIS, 1970) a excepción del queso CHEDDAR (PERRY y SHARPE, 1960; DAVIS, 1965), donde siempre está asociado a otra especie del mismo género, generalmente al *L. casei*. Esta asociación también ha sido demostrada en el queso «Cabrales» (BURGOS y col., 1971).

En definitiva, los lactobacilos homofermentativos cumplen las siguientes misiones en la elaboración del queso:

- 1) Aseguran una acidificación regular durante todo el proceso de maduración.
- 2) Ejercen, por ello, una acción inhibidora, comenzada ya por la acidificación producida por los estreptococos, sobre los gérmenes nocivos, especialmente sobre el *Clostridium butyricum*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que sólo proliferan en torno a la neutralidad.
- 3) Contribuyen, merced a sus proteinasas y peptidasas, a las degradaciones protéicas ocurridas a lo largo de la maduración.

#### I.3.1.3. *Otros gérmenes lácticos que intervienen en la maduración de algunos quesos.*

En la maduración de los quesos de pasta cocida intervienen especies de estreptococos y lactobacilos que proliferan a temperaturas superiores a las ya estudiadas.

Especial relevancia entre ellos posee el *S. thermophilus*, germen homofermentativo de capital importancia en la elaboración del queso tipo Emmental, que se desarrolla bien sólo en presencia de productos de hidrólisis de la caseína, lo que explica su asociación simbiótica con los lactobacilos. Suele intervenir asociado al *L. helveticum* que es también homofermentativo y termófilo.

En la elaboración del queso «Cottage», adquiere un gran interés el *S. diacetilactis*, germen heterofermentativo, buen productor de diacetilo, una sustancia de elevado poder aromático que es un contribuyente fundamental del «bouquet» de este queso pero indeseable en otros muchos.

En algunos quesos se encuentran especies del género *Leuconostoc*; es dudoso que su participación en los procesos madurativos sea, en algún caso, deseable. Algunas especies, *L. citrovorum* y *L. dextranicum* son buenos productores de diacetilo. Las especies de este género carecen de efectos proteolíticos (TRITTSLER y col., 1948) y pueden agrietar el queso y conferirle sabor amargo (HANSEN y col., 1933; DEANE y col., 1945).

#### I.3.2. *Otras bacterias (no clasificadas como gérmenes lácticos) que intervienen en la maduración del queso.*

Todos los microorganismos presentes en la leche pasan a la cuajada y ejercen alguna función en el proceso madurativo de los quesos de pasta cruda pero algunas desaparecen rápidamente porque el ácido láctico producido por los gérmenes fermentadores de la lactosa seleccionan la flora.

En los quesos con características similares al que este trabajo se refiere se han aislado con frecuencia micrococos y enterococos.

### I.3.2.1. *Micrococos.*

A pesar de su bien conocida actividad proteolítica y lipolítica y de la certeza de que casi siempre existen en los quesos (ALFORD y FRAZIER, 1950; FEACAN y DAWSON, 1959; HUCKER, 1922; IRVINE y BEACH, 1962) no se ha prestado demasiada atención al papel que puedan representar en la maduración y su contribución al «bouquet».

Las opiniones sobre sus efectos, en los casos en que se han estudiado, son contradictorias.

HARRIS y HAMMER (1940) estudiaron los efectos de su adición a la leche pasterizada para la fabricación de queso Cheddar; algunos cultivos mejoraban el sabor, otros no lo afectaban y, finalmente, algunos producían efectos indeseables. Concluyeron que ciertas cepas podrían utilizarse en los cultivos usados para la maduración de este queso.

DEANE y ANDERSON (1942) opinan que la adición de micrococos al queso Cheddar mejora su sabor y textura. En cualquier caso, su supervivencia en el queso es corta, el número de micrococos presente en la cuajada disminuye en un 70 % en la primera semana y el 99,5 % ha desaparecido a las 5 semanas (ROBERTSON y PERRY, 1961).

Es evidentemente necesario, un estudio con más profundidad referente a sus funciones en la maduración del queso antes de considerar su empleo como componentes de los cultivos usados para la fabricación de quesos a partir de leche pasterizada.

### I.3.2.2. *Enterococos.*

La contribución de los enterococos a la maduración de diversos tipos de quesos ha sido más extensamente estudiada.

Se encuentran en casi todos los quesos. Tanto en el Camembert (LENOIR, 1962) como en el Roquefort (DEVOYOD, 1969) y Cheddar (CLARK y REINBOLD, 1967), alcanzan cifras de hasta  $10^7$  -  $10^8$  gérmenes/gr. Las especies más frecuentemente encontradas son *S. faecalis* y sus variedades y *S. durans* (CLARK y REINBOLD, 1967).

CZULAK y HAMMOND (1956) investigaron el uso de cepas no hemolíticas de *S. durans* como componentes de los «starters», concluyeron que este gérmen produce tanto ácido a 45°C como *S. lactis* a 30°C o *S. thermophilus* a 45°C. Sugieren, además, que la citada especie, *S. durans*, ofrece la ventaja de ser más resistente a las concentraciones salinas. Podría emplearse, al igual que *S. thermophilus*, como sustitutivo del *S. lactis* y del *S. cremoris* cuando a lo largo del proceso de maduración se utilicen temperaturas altas y no puedan proliferar los gérmenes típicamente lácticos.

KOSIKOWSKI y DAHLBERG (1948) estudiaron los cambios experimentados por el número de *S. faecalis* durante la maduración del queso Cheddar; aumentan rápidamente durante el proceso de elaboración, están presentes en la cuajada y son los microorganismos más abundantes a lo largo del proceso madurativo. Fabricaron quesos con un cultivo compuesto por estreptococos lácticos y *S. faecalis* observando que maduraban rápidamente y tenían un sabor excelente (DAHLBERG y KOSIKOWSKI, 1949).

*S. faecalis* y *S. durans* se han usado con frecuencia en la fabricación acelerada del queso Cheddar (MABBITT, 1961).

DEANE (1951) comprobó que añadiendo 0,1 - 0,5 % de un cultivo de *S. faecalis*, var. *liquefaciens* a un «starter» para la fabricación de queso Cheddar, se obtenía un producto final de maduración rápida aunque con un sabor amargo. TITTSLER y col. (1948) y YATES y col. (1955) efectuaron experiencias similares y observaron una profunda proteolisis y un sabor ligeramente amargo.

También se ha intentado utilizar *S. faecalis* para la aceleración del proceso madurativo del queso Emmental pero sin mucho éxito (WINKLER, 1954).

### I.4. *Aspectos bioquímicos de la maduración del queso.*

Un queso en maduración es un sistema bioquímico muy complejo donde se establecen numerosos equilibrios y se entrecruzan múltiples rutas de degradación y síntesis; el producto de una de estas reacciones se convierte con frecuencia en sustrato de otras. La composición de un queso a lo largo de proceso madurativo sufre, por ello, múltiples cambios. Pequeñas modifica-

ciones ambientales e intrínsecas son capaces de producir profundos desplazamientos del equilibrio de las numerosas reacciones implicadas, lo que constituye el fundamento científico de algunas de las diversas manipulaciones a que, en la elaboración de los diferentes tipos de quesos, se someten éste y la cuajada.

En el curso de la maduración se van acumulando en grado diverso los numerosos contribuyentes de su «bouquet» (péptidos, aminoácidos libres, aminas, amoníaco, cetonas —especialmente metil cetonas—, aldehídos, ácidos grasos libres, los  $\beta$ -ceto e hidroxiderivados de los mismos, intermediarios del ciclo de Krebs, etc., etc. Estos compuestos, generalmente ausentes o en bajas concentraciones en la leche original, surgen como consecuencia de las transformaciones metabólicas sufridas por los compuestos mayoritarios de la leche: lactosa, triglicéridos y otros lípidos menos abundantes y proteínas, especialmente las caseínas, a las que no son ajenos otros componentes de la leche tales como sales minerales, vitaminas, etc., por su acción moduladora sobre algunos de los responsables fundamentales de las mismas.

Estas transformaciones están, en su mayoría, catalizados por enzimas de diversa procedencia; unos llegan al queso en maduración con la leche de cuya composición normal forman parte, otros le son aportados con el cuajo y la mayor parte son endo o exoenzimas microbianas.

Sin negar la importancia que realmente tienen ciertos procesos de síntesis, especialmente de aminoácidos, ácidos grasos y aldehídos, es, sin embargo, indudable que en la maduración de los quesos dominan los procesos hidrolíticos: glicolisis, lipolisis y proteolisis.

#### I.4.1. *Glicolisis.*

El único hidrato de carbono cuantitativamente importante de la leche es la lactosa, un glucopiranósil  $\beta$ -galactopiranósido. La primera reacción que ha de sufrir en su proceso degradativo es su hidrólisis efectuada bajo el efecto catalítico de una lactasa (o más correctamente una  $\beta$ -galactosidasa) que rinde sus dos monosacáridos constitutivos: glucosa y galactosa.

La glucosa ingresa de inmediato en la ruta de Embden-Meyerhof (EM) o en la Warburg-Dickens (WD) (figuras I.1. y I.2.).

La galactosa se transforma en glucosa, lo que es llevado a efecto del siguiente modo (KANDLER, 1961):

La galactosa se transforma en galactosa-1-fosfato (figura I.3) bajo la acción de la galactoquinasa; la galactosa-1-fosfato da con uridín-difosfato-glucosa, uridín-difosfato-galactosa y glucosa-1-fosfato, en una reacción catalizada por la galactosa-1-fosfato transuridilasa. La uridín-difosfato-galactosa formada sufre una epimerización bajo la acción de la uridín-difosfato-galactosa-4-epimerasa y se convierte en uridín-difosfato-glucosa con lo que se cierra el ciclo. La glucosa-6-fosfato se transforma bajo la acción de la fosfoglucomutasa en glucosa-6-fosfato y como tal ingresa en la ruta EM o en la WD.

El conjunto de reacciones que transforma la galactosa en glucosa-6-fosfato representa siempre un obstáculo que es el que determina que con frecuencia se halle en el queso galactosa durante períodos de tiempo más largos que aquellos en los que es posible detectar glucosa o algunos de sus fosfatos. El producto final del metabolismo de la glucosa a través de la ruta EM es el piruvato en equilibrio con el ácido láctico, gobernado por la lactodeshidrogenasa. La ruta de WD conduce a la formación, a partir de una molécula de glucosa, de una de  $\text{CO}_2$  y otra de fosfato de pentosa (figura I.2), con muchos destinos metabólicos; uno de los cuales es la formación, catalizada por la fosfotransfosa, de acetilfosfato y 3-fosfoglicerolaldehído. Este último se incorpora a las etapas finales de la ruta EM y acaba en ácido pirúvico  $\rightleftharpoons$  láctico. El acetilfosfato tiene diversos destinos metabólicos: ácido acético, acetaldehído, etanol, acetoína, diacetilo, etc.

El piruvato puede ingresar en el ciclo de Krebs, previa transformación en acetil CoA, bajo la acción de piruvatoxidasa, condensándose con  $\text{CO}_2$ , en una reacción catalizada por el enzima málico, para dar ácido málico, condensándose con el ácido oxalacético, para dar ácido cítrico, bajo la acción de la citratosintetasa. Por retirada de algunos de los intermediarios del citado ciclo y entrada en nuevas rutas, contribuye a la síntesis de los aminoácidos aspártico y glutámico, a la de acetoína y diacetilo y a la de propionato. También puede dar origen al aminoácido alanina.

El ácido láctico puede, a su vez, en ciertos quesos, transformarse en ácido propiónico y acético.

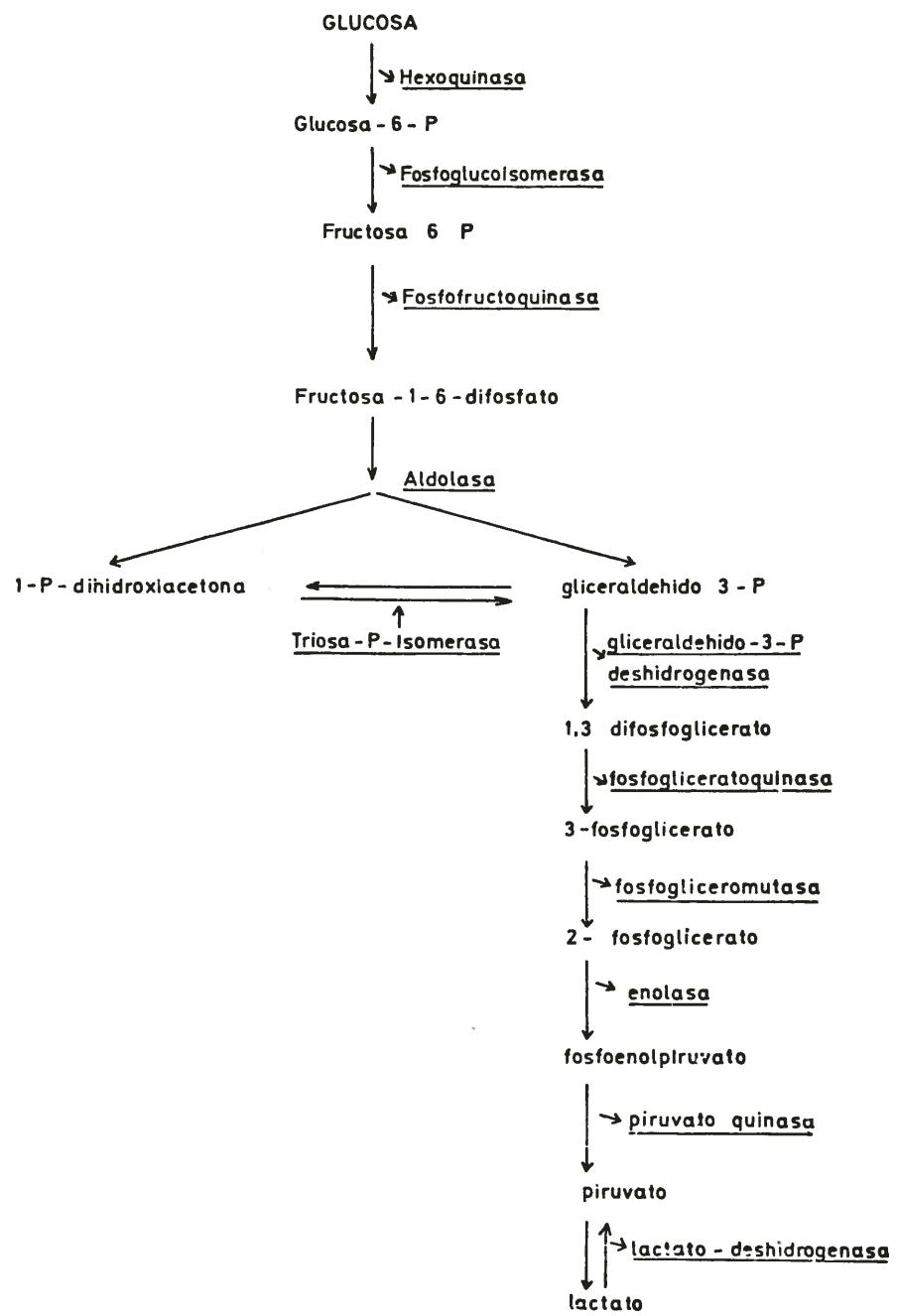


Figura I.1: Degradación de la glucosa por la ruta de Embden-Meyerhof (EM).

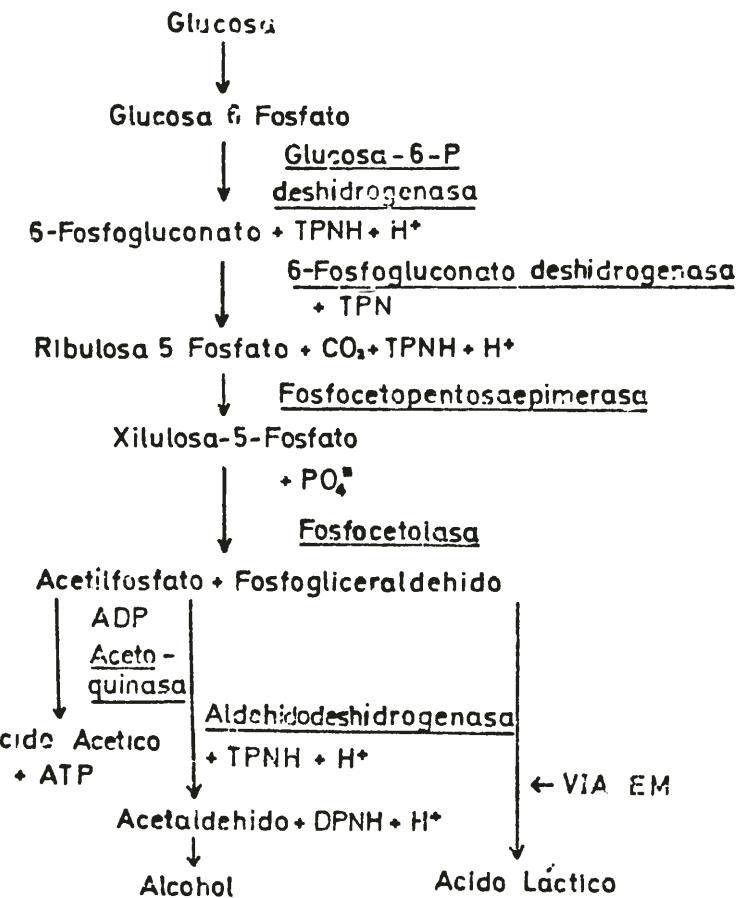


Figura I.2: Degradación de la glucosa por la ruta de Warburg-Dickens (WD).

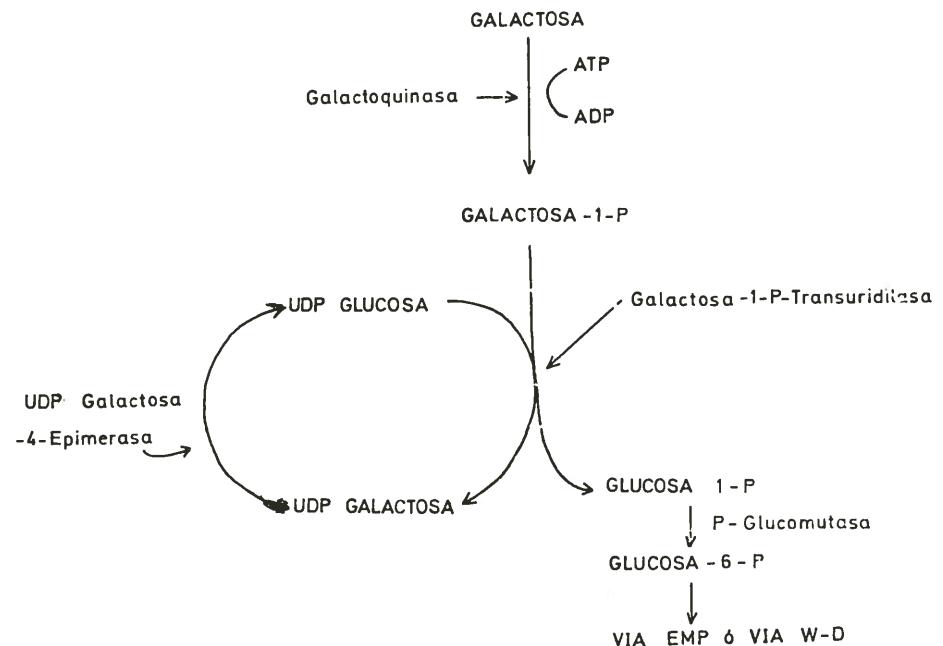


Figura I.3: Metabolismo de la galactosa por los gérmenes lácticos.

El ácido acético puede ser utilizado, en la masa en maduración, para la síntesis de ácidos grasos o, tras su entrada en el ciclo de Krebs, como acetil CoA, dar lugar a los aminoácidos antes citados. La figura I.4 recoge las principales rutas metabólicas seguidas por el acetato y piruvato, procedentes de la degradación de la lactosa.

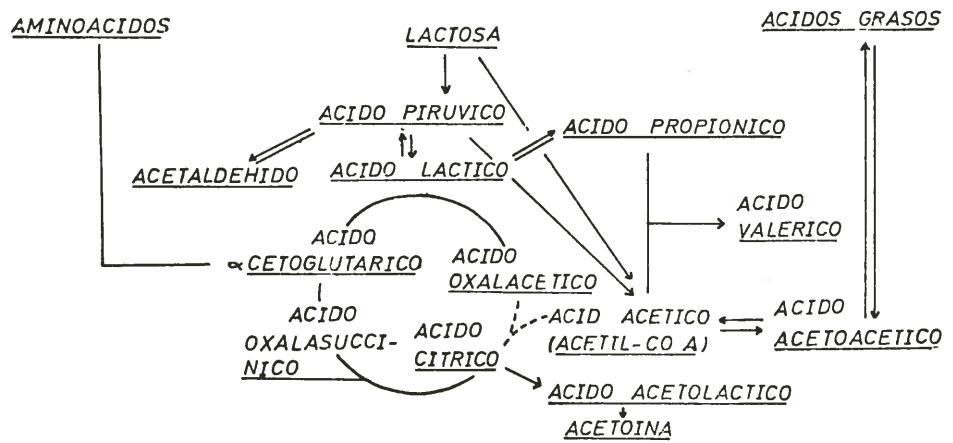


Figura I.4: Principales rutas metabólicas seguidas por el acetato y piruvato en el metabolismo de la lactosa por los gérmenes lácticos.

Cuáles sean los productos finales más abundantes del metabolismo de la lactosa, dependen de los microorganismos presentes y de las condiciones imperantes. Prácticamente, ninguno de los microorganismos clasificados como homofermentativos, rinden sólo ácido láctico a partir de la lactosa o de la glucosa. El *S. cremoris*, cuando crece en medio glucosado sin control del pH, produce además de ácido láctico, ácido acético y fórmico,  $\text{CO}_2$  y etanol; *S. lactis* da idénticos productos (excepto fórmico) más acetona. *S. faecalis*, var. *liquefaciens* tiene como productos finales del metabolismo de la glucosa, además de los citados, glicerol. Si el pH se fija en 7, *S. lactis* no produce acetona y sí 2,3 butanodiol y *S. cremoris* produce además acetona y glicerol (PLATT y FOSTER, 1958). Se han citado otros productos de degradación de la glucosa por los estreptococos lácticos, como acetona y acetaldehído (HARVEY, 1960).

La pequeña proporción de estas sustancias producida por las bacterias lácticas sugiere (KANDLER, 1961) que estos gérmenes homofermentativos posean los enzimas necesarios para la oxidación directa y descarboxilación de la glucosa-6-fosfato a ribulosa-6-fosfato y su posterior entrada en la ruta de WD, propia de los gérmenes heterofermentativos.

Sobre el metabolismo de las bacterias lácticas ejerce gran influencia el  $\text{CO}_2$ ; el crecimiento inicial de *S. lactis* y *S. cremoris* en la leche, depende de la proporción de  $\text{CO}_2$  presente. Si se extrae constantemente el  $\text{CO}_2$  de la leche, todas las cepas de estas especies ven retrasado su crecimiento. Para lograr un crecimiento inicial óptimo, los estreptococos lácticos requieren la presencia de  $\text{CO}_2$  disuelto en la leche en una concentración comprendida entre 0,2 - 0,3 % (WHITEHEAD y col., 1958). Un exceso de  $\text{CO}_2$  lleva consigo la inhibición del crecimiento (GARVIE, 1959).

La importancia del  $\text{CO}_2$  en la regulación del crecimiento de las bacterias lácticas se explica teniendo en cuenta: a) que su condensación con ácido pirúvico, catalizada por el enzima málico, da ácido málico, intermediario del ciclo de Krebs y b) que por condensación, con el fosfoenolpiruvato da origen a fosfoenoloxalacetato que a su vez pasa a oxalacetato. Debe tenerse en cuenta que las bacterias lácticas no pueden recurrir para la síntesis de los ácidos málicos y oxalacetato al ciclo de Krebs.

Prescindiendo de los productos sintetizados durante la maduración, puede decirse que todos los productos finales del metabolismo, por la flora láctica, de la lactosa contribuyen al «bouquet» de los quesos (FORSS y PATTON, 1966), aunque el fin fundamental, de la misma sea otro: la producción de ácido láctico.

Es posible, sin embargo, que el que más frecuente e intensamente contribuye al «bouquet» sea el acetato. OHREN y TUCKEY (1969) sugieren que un queso Cheddar de seis meses con un buen sabor deberá contener de 60 a 140  $\mu$  moles de ácidos grasos libres más acetato por cada 5 gr. de queso y que la relación entre ambas fracciones deberá ser de 0,55 a 1. El acetato existente en el queso suele provenir del metabolismo de la lactosa por los gérmenes lácticos y el *S. faecalis*, var. *liquefaciens* cuando interviene en la maduración (PLATT y FOSTER, 1958), aunque puede proceder del metabolismo de los aminoácidos (NAKAE y ELLIOT, 1965) o del citrato (FRYER, 1970).

Cuando en la flora de un queso abunda *S. diacetilactis*, *L. plantarum* y *L. brevis* la relación lactosa/citrato resulta factor de suma importancia en la determinación de las concentraciones finales de acetato. Debe tenerse en cuenta que *L. casei*, *L. plantarum* y *L. brevis* son capaces de utilizar el citrato como fuente de energía, en ausencia de carbohidratos (FRYER, 1970).

#### I.4.2. Metabolismo lipídico.

Las modificaciones sufridas por el material lipídico no afectan a la textura del queso pero sí al «bouquet» final del producto madurado.

La primera de las transformaciones sufridas por la materia grasa consiste en la hidrólisis de sus triglicéridos con liberación de ácidos grasos que se acumulan en el medio dando lugar a un incremento en su acidez que constituye un buen índice de maduración. Así PATTON (1963) considera que la base del aroma del queso Cheddar lo forman los ácidos grasos volátiles de bajo peso molecular y, en particular, el ácido acético. FORSS y PATTON (1966) sugieren que el «bouquet» del Cheddar se debe fundamentalmente a los ácidos acético, butírico y caproico.

La fracción ácidos grasos volátiles es muy distinta en los diversos tipos de quesos, así el queso suizo tiene una elevada proporción de ácido propiónico, mientras que en el queso

Provolone el ácido graso mayoritario es el butírico y en los quesos de vena azul predominan los ácidos grasos de cadena media y larga, superiores al C-5 (HARPER, 1959). En el queso Gorgonzola los ácidos grasos mayoritarios son el acético y el isobutírico que se encuentran en una proporción del 24,7 y 11,2 % de los ácidos totales (SCHORMÜLLER y LANGNER, 1960). En el Roquefort y Camembert el que se encuentra en mayor proporción es el isobutírico: 12,2 y 10,9 % de la acidez total, respectivamente (SCHORMÜLLER y LANGNER, 1960). En los quesos Edam, Parnesean, tilsiter, Rodamur (SCHORMÜLLER y LANGNER, 1960) y Cheddar (DIXON y DEMAN, 1968) es el acético el que se encuentra en mayor proporción.

La liberación de los ácidos grasos está catalizada por enzimas específicas, lipasas, de dos procedencias: la leche y los microorganismos.

La leche está provista de una actividad lipolítica que resulta de la suma de la acción de diversas lipasas con distinto grado de especificidad a pH óptimos variables entre 6,5 y 9.

TARASSUK y FRANKEL (1957) demostraron la presencia de una lipasa asociada a la caseína y otra a los glóbulos grasos y llamaron a la primera «lipasa de la leche normal» y a la segunda «naturalmente activa», admitiendo un incremento en la tasa de ésta durante la lactación tardía o cuando las vacas no consumen forraje seco, que es la responsable de la «lipolisis espontánea». La lipasa de la leche normal ha sido la más estudiada; es inseparable de la k-caseína (YAGUCHI y col., 1964), pero puede separarse en condiciones especiales en cinco fracciones de diverso peso molecular y especificidad (DOWNEY y ANDREWS, 1969). Su acción es ejercida fundamentalmente sobre las porciones  $\alpha$  y  $\alpha'$ ; y su actividad recae en la serie triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, y actúa preferentemente sobre los triglicéridos cuyos ácidos grasos son de cadena corta, especialmente butírico (JENSEN, 1964; JENSEN y col., 1960; JENSEN y col., 1962; JENSEN y col., 1963; JENSEN y col., 1964).

La actividad lipolítica de la leche se acentúa con ciertas manipulaciones térmicas (calentándola a 30°C y enfriando, posteriormente, a 10°C) (KRUOKOVSKY y HERRINGTON, 1939), con la agitación, etc.; se destruye por el calor siguiendo una cinética de primer orden, en una extensión que depende del tiempo y temperatura de calentamiento, dándose cifras para la destrucción de 60°C durante 30 minutos (STADHOUDERS y col., 1959), pero la leche que ha sido pasterizada sigue teniendo actividad lipolítica porque luego se reactiva la lipasa (HARPER y GOULD, 1959; NILSSON y WILLART, 1961; REITER y SHARPE, 1971).

Entre los diferentes microorganismos, son los hongos los que más frecuentemente se hallan dotados de una considerable actividad lipolítica, habiéndose puesto de manifiesto lipasas en muy diversas especies: *Aspergillus niger* y *Penicillium roqueforti* (SHIPE, 1951), *Candida lipolytica*, *Geotrichum candidum* y también en *Penicillium roqueforti* y en *P. camemberti* (WILCOX y col., 1955) y en muchas otras especies (HARPER y LONG, 1955; LONG y HARPER, 1956; HARPER, 1956; etc.).

También tienen actividad lipolítica ciertas levaduras que en el curso de la maduración se asientan sobre la superficie del queso (*Debaryomyces*) (STADHOUDERS y MULDER, 1959).

Entre las bacterias presentes en la leche cruda, las de mayor actividad lipolítica son los microorganismos pertenecientes a los géneros *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*, así como las del grupo coliforme (FRYER y col., 1967) pero es dudoso que estos gérmenes participen en la hidrólisis de la materia grasa en los quesos, ya que las condiciones que imperan en los mismos son adversas para esta flora.

De los gérmenes que participan en la maduración de los quesos de tipo similar al que es objeto de este estudio, ha sido demostrada actividad lipolítica en las bacterias lácticas (REITER y col., 1966; FRYER y col., 1967; SATO y col., 1968; UMEMOTO y col., 1968; OTERHOLM y col., 1968) y en mayor extensión en los enterococos *S. durans*, y *S. faecalis*, var. *liquefaciens*, sobre todo en el primero (DOVAT y col., 1970). También se han detectado lipasas en diversas especies del género *Micrococcus* (MABBITT, 1961; PETERSON y JOHNSON, 1949).

Se ha prestado gran interés a la importancia relativa de las lipasas microbiana y de la leche en la lipolisis del queso en maduración. REITER y col. (1967) y REITER y col. (1969) opinan que en el Cheddar la contribución de las lipasas bacterianas es menos importante que la de la leche. UMEMOTO y SATO (1973) sugieren que los enzimas lipolíticos de las bacterias lácticas participan activamente en la lipolisis del queso después de haber sido autolisadas y quedar en libertad sus enzimas.

REITER y SHARPE (1971) elaboraron quesos a partir de leche cruda estéril y leche pasterizada, con y sin la adición de lipasas bacterianas; no observaron incremento alguno de los ácidos grasos libres en los quesos debido a la adición de lipasas bacterianas parcialmente purificadas. Apenas observaron diferencias en la tasa de ácidos grasos libres de los quesos fabricados con leche pasterizada y cruda.

Las diferencias en la composición en ácidos grasos libres de los distintos quesos no han sido suficientemente correlacionadas con las que se observan en los lípidos de la leche utilizada para su elaboración. Aunque ésta pudiera explicar parte de tales diferencias, es evidente que la causa fundamental debe residir en la especificidad de las lipasas microbianas actuantes, como en cierto grado demostraron HARPER y LONG (1956), HARPER (1955) y HARPER (1957).

A partir de los ácidos grasos libres aparecen en el queso en maduración otros compuestos aromáticos de considerable importancia: metil cetonas y aldehídos.

Las metil cetonas se producen por descarboxilación de los  $\beta$ -cetoácidos. El  $\beta$ -cetoácido precursor puede proceder, en algunos casos, de la hidrólisis de un triglicérido (DAY, 1966; KINSELLA y col., 1967). Estos  $\beta$ -cetoácidos se elaboran en la glándula mamaria como ácidos grasos «no acabados», es decir, incorporados a los triglicéridos sin haber sufrido la etapa reductora final de su biosíntesis a partir de acetato (KINSELLA y col., 1967; LAWRENCE y HAWKE, 1966).

No parece sin embargo, que la leche contenga cantidad suficiente de estos  $\beta$ -cetoácidos como para dar cuenta de la formación de todas las metil cetonas que aparecen en algunos quesos, especialmente en los madurados por hongos. En estos quesos y probablemente también en una extensión variable de otros, los microorganismos deben metabolizar los ácidos grasos por  $\beta$ -oxidación que normalmente rinde  $nC/2$  unidades de acetil CoA (figura I.5) con numerosos destinos metabólicos posteriores: entrada en el ciclo de Krebs, síntesis de aminoácidos, síntesis de otros ácidos grasos, etc., pero que en menor extensión, puede ser origen de  $\beta$ -cetoácidos libres por transferencia del CoA de los  $\beta$ -cetoacil CoA a un acceptor adecuado, catalizada por una  $\beta$ -cetoácido-CoA-transferasa. Esto explicaría la existencia frecuente en los quesos de metil cetonas, predominantemente, de número impar de átomos de carbono.

La capacidad de ciertos microorganismos (sobre todo de *P. roqueforti*) para producir metil cetonas a partir del ácido caprílico ha sido repetidas veces puesta de manifiesto (HAMMER y BRYANT, 1937; SJÖSTRÖM y MALM, 1952; BERRIDGE y col., 1953). No siempre, sin embargo, es este el origen de las metil cetonas. SCARPELLINO y KOSIKOWSKI (1962) demostraron que en el queso Cheddar aparecen las metil cetonas por deshidratación del butilenglicol.

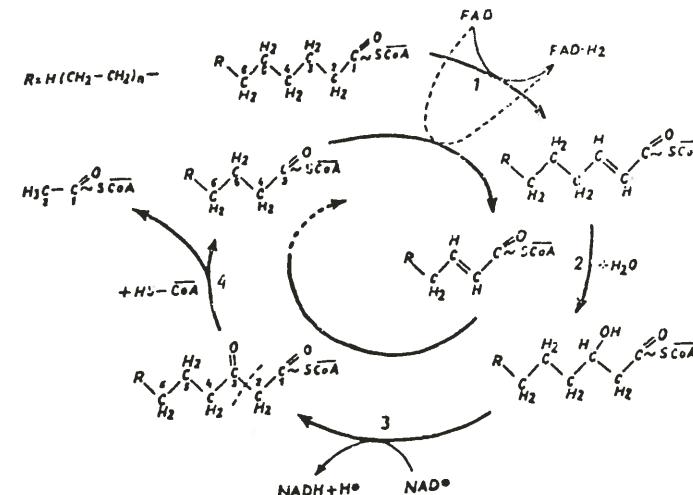


Figura I.5: Metabolismo de los ácidos grasos por  $\beta$ -oxidación.

Los ácidos grasos libres provistos de dobles enlaces pueden probablemente, sufrir también, durante la maduración del queso, una autoxidación en la que se forma primero hidroxiperóxidos sobre el grupo metilénico en posición  $\alpha$ , respecto al doble enlace, que por dismutación y excisión puede originar diversos aldehídos saturados o monoinsaturados, vía sus respectivos alcoxi-radicales. A partir de los ácidos grasos provistos de dos y tres dobles enlaces pueden formarse, por este mecanismo, dienales y trienales. Los mono, di y trienales, por posterior oxidación, pueden dar lugar a otros carbonilos saturados (KINSELLA, 1969).

La figura I.6 recoge las transformaciones más importantes sufridas por los ácidos grasos durante la maduración del queso.

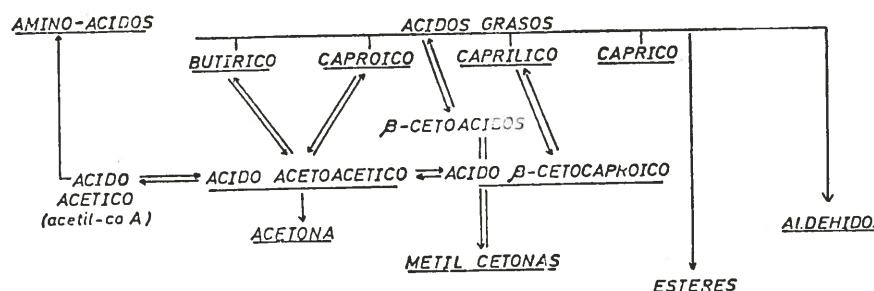


Figura I.6: Transformaciones más importantes sufridas por los ácidos grasos durante la maduración de los quesos.

La importancia de la contribución de las metil cetonas y otros carbonilos al «bouquet» de los quesos madurados por hongos es universalmente admitida. Numerosas metil cetonas han sido también detectadas en el queso Cheddar por diversos autores (DAY y col. 1960; SCARPELLINO y KOSIKOWSKI, 1962; WALKER, 1961, HARVEY y WALKER, 1960; etc.). HARVEY y WALKER (1960) afirman que la aparición del aroma típico en este tipo de queso coincide con la de las metil cetonas pero JACKSON (1958) y FORSS (1969) ponen en duda la importancia de las mismas en el citado queso.

Es muy escasa la atención que hasta hoy se ha prestado a la evolución en los quesos de la fracción lipídica y menos aún a la de los componentes polares durante el proceso madurativo.

FUJISHIMA y col. (1970) afirman que los lípidos polares constituyen el 0,7 % del total de los lípidos del queso Gouda e identifican fosfatidilcolina (30,3 % del total de lípidos polares), fosfatidiletanolamina (22,4 %), esfingomielina (27,5 %), cerebrósidos (18,3 %) y lisofosfolípidos (1,5 %). NAKANISHI y KAYA (1971) han estudiado los fosfolípidos de diferentes variedades de quesos comerciales, observando que su contenido varía entre el 0,3 y 1 % de los lípidos totales; detectan 8 lípidos polares de los cuales identifican 6. BOLCATO y col (1969) han prestado considerable atención a la presencia en ciertos tipos de quesos de gránulos de lipoproteínas que al parecer están compuestas por lípidos que contienen colina, fosfato cálcico y proteínas.

Más recientemente, UMEMOTO y SATO (1973) indican que los lípidos del queso Cheddar provienen de dos fuentes: la mayor parte derivan de los de la leche, pero una pequeña cantidad de los ácidos grasos que forman parte de los lípidos complejos es de origen bacteriano. Afirman de los glicolípidos proceden exclusivamente de la leche y que los fosfolípidos tienen el doble origen, detectan, por ejemplo, ácido lactobacílico formando parte de fosfatidilcolina, ligado a una base nitrogenada no presente ordinariamente en los gérmenes lácticos (IKAWA y col., 1972) y, por tanto, de procedencia láctea.

#### I.4.3. Proteolisis y tasa de aminoácidos libres.

La proteolisis es quizás el fenómeno más importante de la maduración de numerosos quesos, ya que afecta de una forma muy acusada tanto al sabor como a la textura. La primera manifestación de la proteolisis consiste en la solubilización progresiva de las caseínas que se pone de

manifesto por un aumento del nitrógeno soluble desde un 4-8 %, recién desueroado, hasta un 50 % en algunos quesos, al final de la maduración, y se traduce en la aparición de una masa blanda y untuosa y de numerosas sustancias sápidas. La proteolisis es un proceso gradual; la ruptura de una molécula proteica puede alcanzar profundidades muy diversas, fragmentación de la molécula original en polipéptidos de distinto tamaño y separación de oligopéptidos y aminoácidos libres, bajo la acción catalítica de los enzimas apropiados. En el queso en maduración hay múltiples proteasas y peptidasas de dos orígenes fundamentales: el cuajo y los microorganismos.

La renina o enzima del cuajo ofrece además de su actividad específica (liberación del caseínglicopéptido de la  $\kappa$ -caseína), una actividad proteolítica inespecífica, no muy profunda pero trascendente en cuanto prepara el camino para la acción de los enzimas microbianos.

Los microorganismos están provistos de proteasas «verdaderas», carboxipeptidasas, amiopeptidasas y di y tripeptidasas específicas o inespecíficas que actúan en condiciones diversas de pH, según su procedencia.

A la degradación de la caseína contribuyen también las fosfatasas ya que los enlaces éster fosfato establecidos con la serina y treonina de la caseína ejercen un efecto protector sobre los enlaces péptidos adyacentes. La leche está provista de dos fosfatasas, una alcalina y otra ácida; esta última parece ofrecer particular importancia en el aspecto que comentamos (BINGHAM y ZITTEL, 1963); son muy abundantes también en los microorganismos.

La acción conjunta, y con frecuencia, alternante, de endopeptidasas, carboxipeptidasas, amiopeptidasas y fosfatasas determina finalmente la liberación progresiva de aminoácidos libres.

La degradación proteica sirve de base a numerosos índices de maduración: nitrógeno soluble, nitrógeno no proteico, nitrógeno de aminoácidos, etc.

Por su sabor específico (tabla I.2) se ha venido prestando especial consideración al contenido de los diversos quesos en aminoácidos libres y a su evolución durante el proceso madurativo. Los aminoácidos libres se han investigado en numerosas variedades de quesos: en el suizo (HINTZ y col. 1956), en el de Cabrales (SALA y BURGOS, 1972), en el Provolone (HARPER y LONG, 1956), en el queso Edam (ALI, 1960), en el Romano (LONG y HARPER, 1956), etc.

La tasa alcanzada por cada aminoácido en particular fluctúa a lo largo de la maduración; la presente en un momento cualquiera es el resultado del equilibrio establecido entre las ya citadas reacciones degradativas, ciertos procesos de síntesis de aminoácidos y rutas catabólicas que los transforman en otros productos.

Las reacciones biosintéticas de aminoácidos que se dan en el queso en maduración, son dos

**TABLA I.2**  
Olores y sabores originados por la degradación térmica de los aminoácidos y su interacción con los azúcares

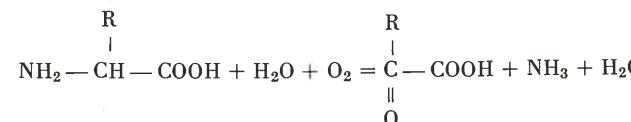
Probable aminoácido precursor	Olores y sabores típicos
Fenilalanina, glicocola	a caramel.
Leucina	a pan tostado.
Glicocola, cistina	a ahumado.
Alanina	a nuez.
Ácido $\alpha$ -aminobutírico	a nogal.
Fenilalanina	a nuez tostada, almendra
Prolina	a pastas, galletas.
Ornítina	a galletas saladas.
Glutámico, lisina	a mantequilla.
Arginina	a «palomitas de maíz»
Metionina	a caldo de carne, alubias
Leucina, arginina, histidina	a pan.

De JOHNSON y col. (1966); HODGE, (1966) y KIELY y col. (1960).

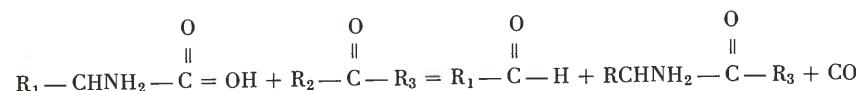
fundamentalmente: la catalizada por la aspartasa (aspartato-amonio-liasa) que rinde ácido aspártico a partir de fumarato e iones amonio y la que cataliza la glutamato deshidrogenasa, en la que se produce glutamato a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y amoníaco con la oxidación concomitante de NADPH<sub>2</sub>. Ambos enzimas abundan en los microorganismos (ADLER y col., 1938a; ADLER y col., 1938b; WACHSMAN, 1956).

Entre aminoácidos y cetoácidos se establecen además diversas reacciones de transaminación que dan origen a aminoácidos nuevos, las aminotransferasas que catalizan estas reacciones se encuentran en numerosas bacterias y hongos.

Las reacciones que contribuyen al descenso de la tasa de los aminoácidos libres del queso, aparecidos por cualquiera de las citadas rutas, son fundamentalmente dos: 1) la descarboxilación, catalizada por L-aminoácido descarboxilasas, generalmente muy específicas que rinden aminas, como la putrescina, cadaverina, triptamina e histamina y 2) la desaminación catalizada por aminoácido-oxidasas inespecíficas que catalizan la reacción:



rindiendo, por tanto, amoníaco y el  $\alpha$ -cetoácido correspondiente. Durante el largo período de maduración de algunos quesos parece posible (KEENEY y DAY, 1957) que se den también fenómenos de interacción entre aminoácidos y compuestos dicarboxílicos (degradación de Strecker).



lo que daría origen a nuevos aldehídos con un átomo de carbono menos que el aminoácido del que procede. Esta reacción podría, por ejemplo, por interacción entre la metionina y el ácido pirúvico (MABBITT, 1961) dar origen a uno de los aldehídos, el metional, de olor más parecido al del queso; este compuesto ha sido aislado en el queso Cheddar (DAY y KEENEY, 1958) y se le atribuye una importante contribución a su aroma (ORO y col. 1957).

La figura I.7. recoge las principales transformaciones que pueden experimentar los aminoácidos durante la maduración del queso.

Como era de esperar de los diferentes períodos de maduración que en cada queso son habituales, la multiplicidad de rutas metabólicas de que depende la tasa de un aminoácido determinado y la diversidad de los gérmenes participantes en el proceso madurativo y de los equipos enzimáticos de que se hallan provistos, los aminoácidos predominantes son distintos en cada variedad de queso; en el queso Edam lo son el glutámico y la leucina (ALI, 1950); en el queso Cabrales la lisina y la leucina (SALA y BURGOS, 1972); en el Provolone, las leucinas (HARPER y LONG, 1956); en el Romano la histidina y leucina (LONG y HARPER, 1956); en el Cheddar de tres meses de maduración, la fenilalanina y arginina (REITER y SHARPE, 1971).

LUSIANI y col. (1971) investigaron los aminoácidos liberados a partir de la leche por diversos gérmenes habitualmente participantes en la maduración del queso (lactobacilos, estreptococos lácticos y enterococos), concluyeron que el *L. bulgaricus* y los enterococos producen más aminoácidos libres que los estreptococos lácticos, y que todas las especies liberan prolina, serina, asparagina + glutamina, isoleucina y fenilalanina. La metionina libre solamente aparece bajo la acción del *L. bulgaricus* y los enterococos; la cistina sólo es capaz de producirla, entre los microorganismos que probaron, el *S. faecalis*, var. *liquefaciens* y el ácido  $\alpha$ -aminobutírico los lactobacilos.

Cuando la actividad carboxi-, amino-, di y triprotidasa en un determinado tipo de queso es baja, pueden acumularse en el medio péptidos que son responsables del sabor amargo en ciertos tipos de quesos (STORCARDS y LINDQVIST, 1953; RAADSWELD, 1959; CZULAK, 1959; EMMONS y col., 1960 y 1961).

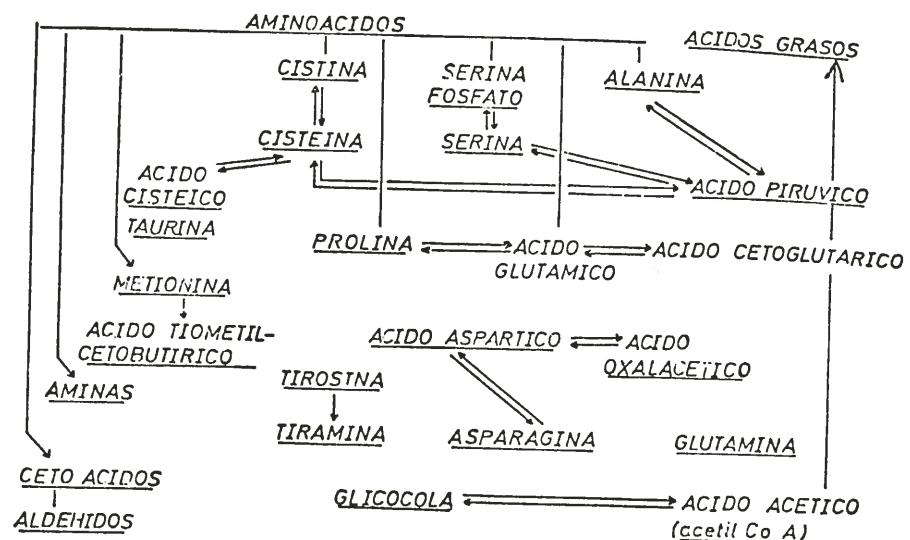


Figura I.7: Principales transformaciones que pueden experimentar los aminoácidos durante la maduración del queso.

#### I.4.3.1. Actividad proteolítica de diferentes bacterias que intervienen en la maduración de los quesos, similares al tipo «Ulloa».

##### I.4.3.1.1. Actividad proteolítica de los estreptococos lácticos.

La contribución directa de los estreptococos lácticos a la proteolisis del queso en maduración ofrece escasa importancia, ya que son numerosos los investigadores que han demostrado que estas bacterias desaparecen casi completamente en las primeras semanas de maduración (BOTAZZI, 1959; FEAGAN y DAWSON, 1959; SYRJANEN, 1965; JOHN y COLE, 1959; PERRY y SHARPE, 1960).

Sin embargo, cuando su desarrollo se detiene y las bacterias lácticas se lisan liberan al medio sus componentes intracelulares y, entre ellos, sus enzimas endógenas y, por tanto, sus proteasas, si existen.

COWMAN y SPECK (1957) describen una proteasa en *S. lactis* que opera a un pH óptimo de 6, normal en muchas variedades de queso y bastante activa a pH de 5,5. VAN DER ZANT y NELSON (1953) estudian la proteolisis de la leche por *S. lactis*, observando que durante las primeras 24 horas el nitrógeno soluble, la tirosina y el triptófano experimentan un considerable incremento, seguido luego por un aumento gradual mucho más lento que dura 80-90 horas; la actividad máxima ocurre a pH comprendidos entre 6 y 7,5.

Suele admitirse que el *S. lactis* carece de actividad proteolítica exocelular, sin embargo, WILLIAMSON y col. (1962) y (1964) purificaron una proteasa extracelular procedente del citado germe.

SORHAUG y SOLBERG (1973) han puesto de manifiesto la existencia de varias dipeptidasas en los extractos obtenidos a partir de *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. durans* y *L. acidophilus*.

##### I.4.3.1.2. Actividad proteolítica de los lactobacilos.

La actividad proteolítica de los lactobacilos ha sido objeto de numerosas investigaciones: BOTAZZI (1962) estudió la actividad proteolítica de 200 cepas de lactobacilos termófilos, demostrando que todas ellas eran capaces de degradar las proteínas, especialmente activas parecen ser algunas cepas de *L. helveticus* y *L. casei*. Se ha pensado incluso en clasificar los lactobacilos

homofermentativos basándose en su capacidad de degradar el caseinato sódico (McDONALD, 1955). ANNIBALDI (1962) demuestra, mediante estudios electroforéticos, que el *L. helveticus* ataca con igual facilidad a todas las caseínas mayoritarias, mientras que otras bacterias (género *Alcaligenes* y *Bacillus subtilis*) degradan más fácilmente la  $\beta$ -caseína; esta es la única fracción atacable por el *S. faecalis*.

La actividad proteolítica de *L. casei* ha sido estudiada por BARIBO y FOSTER (1952) y BRANDSAETER y NELSON (1956), ofrecen un pH óptimo en torno a 6 y una velocidad máxima a 40-45°C. Similares resultados se obtuvieron con *L. helveticus* y *L. lactis* (CHRISTOPHERSEN y THIELE, 1952) y con *L. plantarum* (DUCASTELLE y LENOIR, 1969).

En general, se puede afirmar que los lactobacilos son más proteolíticos que los estreptococos y las *Thermobacterium* más que los *Streptobacterium* (RAPP, 1969).

Otros muchos investigadores se han ocupado recientemente de la actividad proteolítica de los lactobacilos: (DOLEZALEK, 1966; TOFTE-JESPERSEN, 1966; MILLER y KANDLER, 1927; SATO NAKASHIMA, 1965; OHMIKA y SATO, 1968; RAPP, 1969).

TOURNER (1972) ha estudiado la actividad proteolítica de 103 cepas de lactobacilos entre las que se incluyen *L. casei* y *L. plantarum*. Demostraron que las cepas de estas dos especies carecen de actividad proteolítica exocelular. Determinaron la endocelular por la tirosina liberada a partir de la caseína de Hammersten por extractos de suspensiones celulares al 10 % la cantidad de tirosina liberada estuvo comprendida entre 0 y 12  $\mu$ g/ml. extracto/hora. Los productos de la hidrólisis fueron fragmentos protéicos de pequeño tamaño, solubles en ácido tricloroacético al 12 % y la actividad máxima se logró a pH próximos a los que se dan en los quesos en el curso de la maduración.

#### I.4.3.1.3. Actividad proteolítica de los enterococos

La actividad proteolítica del grupo D de Lancefield está ampliamente demostrada, principalmente en *S. faecalis* y sus variedades, *S. bovis* y *S. equinus*. Al *S. faecium* se le ha considerado generalmente exento de capacidad proteolítica (DEBEIL, 1964). *S. faecalis*, var. *liquefaciens* es la única especie de este grupo que licúa la gelatina y coagula la leche en «dulce» y digiere el coágulo. El *S. faecalis* posee una considerable actividad aminoácido-descarboxilasa particularmente activa sobre la tirosina, contribuyendo, de esta forma, a la aparición de un aroma pronunciado (ALAIS, 1970). El *S. faecalis* parece actuar sólo sobre la  $\beta$ -caseína (ANNIBALDI, 1962).

Los enterococos poseen fundamentalmente proteasas endocelulares. SCHMIDT y LENOIR (1972) estudian la actividad proteolítica de las especies del grupo D de Lancefield *S. durans*, *S. faecium*, *S. faecalis* y *S. faecalis*, var. *liquefaciens*, valorando la actividad por la cantidad de tirosina liberada. Tanto *S. durans* como *S. faecium* poseen proteasas endocelulares, con un pH óptimo entre 5,4 y 5,7. Según WALACE y HARMON (1970), la actividad proteolítica de *S. durans* es más xima a pH de 7,5 y ofrece un óptimo secundario a un pH de 5,5-6, siendo capaz de degradar tanto la caseína como la  $\beta$ -lactoglobulina pero no la seroalbúmina.

SCHMIDT y LENOIR (1972) describen una proteasa exocelular de actividad muy acusada en *S. faecalis*, var. *liquefaciens* a pH óptimo de 7,4 pero que es capaz de actuar también a pH de 5,6, en menor grado, (es capaz de liberar la mitad de tirosina en las mismas condiciones). El sistema enzimático exocelular de *S. faecalis*, var. *liquefaciens* libera péptidos de bajo peso molecular (SOMKUTI y BABEL, 1969). La actividad proteolítica exocelular de este germen es bastante constante en las distintas cepas y si está presente en grandes proporciones puede licuar la masa del queso o dar origen a sabores amargos (SCHMIDT y LENOIR, 1972).

## CAPITULO II

## MATERIAL, PRODUCTOS Y METODOS

### II.1. *Material*

### II.1.1. *Material generation*

Las disoluciones acuosas se prepararon en agua desionizada en un desmineralizador «Seta» o destilada en vidrio.

Las pesadas de precisión se efectuaron en balanzas analíticas «Sartorius», modelos 2400 y 2600. Para las pesadas ordinarias se emplearon granatarios «Ohaus», modelo 750-S.

Para las mediciones del pH ordinarias se utilizó un pHmetro «Radiometer» pHM. 28 y para las centesimales un pHmetro «Radiometer» pHM. 26.

Las esterilizaciones se llevaron a cabo en una olla a presión «Laster» o en autoclave «Averly», serie Nova N.º 5.

Para las centrifugaciones se empleó una centrífuga «Martin Christ» mod. Universal Junior 33.000.

Las incubaciones microbiológicas se realizaron en estufas «Tarma», «Heraeus» mod. FB-420 y en una cámara termostatada construida a este fin por un proveedor local. Las incubaciones que requirieron mayor constancia de temperatura se efectuaron en baños de agua provistos con termostato «Braum» mod. Thermomix-LL ( $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$ .).

Las siembras se efectuaron en cámara estéril equipada con lámparas ultravioleta «Philips» de 15 watos.

Las determinaciones colorimétricas y espectrofotométricas se realizaron respectivamente en un colorímetro «Bauch & Lomb» mod. Spectronic-20 y en los espectrofotómetros «Beckman» modelos DB y DBGT, equipados con registrador «long-long».

### II.1.2. *Microscopía*

Las observaciones microscópicas se efectuaron utilizando un microscopio «Nikon» mod. AFM, equipado con mecanismo de contraste de fase y dispositivo de fotografía.

### II.1.3. *Liofilizaciones*

Las liofilizaciones se efectuaron en un aparato tipo «Quickfit», provisto de una bomba de alto vacío «Edward» mod. ED-35 y condensador de nieve carbónica.

#### II.1.4. Concentraciones de volumen.

Las concentraciones de grandes volúmenes de disolventes orgánicos se efectuaron en rotovapor «Buchi» equipado con bomba de vacío de paletas «Speedvac». Si el volumen no excedía de 20-25 mls. los disolventes se eliminaron total o parcialmente mediante corriente de nitrógeno, manteniendo las muestras al baño maría a temperaturas de 30-40°C, o al vacío.

La concentración de disoluciones acuosas y acuoso-etanólicas se realizaron en un rotovapor «Buchi», equipado con bomba de alto vacío «Edward» mod. ED-35, intercalando, para la condensación de agua o agua-etanol, dos traps con acetona-nieve carbónica.

#### II.1.5. Cromatografías.

Las cromatografías de lípidos se llevaron a cabo en columnas de vidrio «Afora» de diverso tamaño, provistas de placa filtrante de vidrio y llave de teflón y en láminas finas preparadas con un aparato «Desaga», utilizando para su desarrollo cumbetas de la misma marca.

La cromatografía de aminoácidos se llevó a efecto utilizando la técnica y el dispositivo descrito por SALA y BURCOS (1972).

Las cromatografías en fase gaseosa se efectuaron en un cromatógrafo de gases «Perkin Elmer» mod. F-11, provisto de ionizador de llama y programador lineal de temperatura.

### II.2. Productos.

#### II.2.1. Reactivos.

Tanto los productos químicos utilizados en las diversas reacciones que se citan en esta tesis como los patrones, fueron de calidad reactivo, suministrados por Merck, Schuchardt, BDH o Carlo Erba.

Los productos utilizados para la fabricación de los medios de cultivo fueron suministrados por Difco u Oxoid, salvo los componentes minerales que procedieron de Probus. Los azúcares y polialcoholes empleados en las pruebas de fermentación fueron los suministrados a este fin por Difco.

#### II.2.2. Soportes cromatográficos.

Todos los soportes cromatográficos empleados en las columnas cromatográficas y en lámina fina fueron suministrados por la BDH, excepto la sílica gel que lo fue por Merck.

La sílica gel fue lavada antes de su empleo, con una mezcla de cloroformo-metanol (2/1) (v/v), con el fin de eliminar el material orgánico que contenía, siguiendo la técnica descrita por HARDY y MACKIE (1969).

Los soportes para la cromatografía en fase gaseosa fueron suministrados por «Perkin Elmer y Serva».

#### II.2.3. Disolventes y purificación de los mismos.

Los disolventes orgánicos utilizados para las extracciones y cromatografías (benceno «Probus» r. a., metanol «Panreac» y cloroformo «Abelló») fueron redestilados, antes de su uso, en el laboratorio.

El éter etílico «Abelló», se deshidrató con alambre de sodio, preparado por extrusión en una prensa y se liberó de peróxidos por destilación sobre polvo de hierro reducido.

El éter de petróleo (40-60°C), se preparó por destilación fraccionada de gasolina-éter (C.A.M.P.S.A.), utilizando una columna de Hempel, con una camisa de vacío recubierta de baño de mercurio, aislada externamente con amianto y rellenada de anillos de Rasching.

#### II.2.4. Disolventes para espectrofotometría.

Los disolventes utilizados para los análisis espectrofotométricos fueron purificados en el laboratorio a partir de productos comerciales relativamente puros.

El etanol «Merck» fue purificado hirviendo a reflujo, durante 6 horas, dos litros de etanol absoluto con 80 gr. de NaOH y 20 gr. de granalla de cinz, sometiendo el producto a destilación fraccionada.

El ciclohexano se purificó siguiendo la modificación de BURCOS del método empleado por VAN DER VEN y JONCE (1957) para la preparación de éter de petróleo espectrofotométricamente puro, descrita por SALA (1969). El ciclohexano así obtenido tiene una absorbancia de 0,03 a 220 m $\mu$ s de calidad muy superior a la vendida para fines espectrofotométricos por Merck y otras firmas especializadas en el suministro de este tipo de disolventes.

#### II.2.5. Gases.

El nitrógeno usado para la eliminación de disolventes orgánicos fue suministrado por oxígeno y acetileno de León. Para la cromatografía en fase gaseosa se utilizó nitrógeno, hidrógeno y aire de algo grado de pureza suministrados por la Sociedad Española de Oxígeno.

### II.3. Métodos microbiológicos.

#### II.3.1. Transporte y toma de muestras.

##### A) Transporte:

La leche, cuajada y quesos, procedentes de Lugo fueron transportados por

ferrocarril, durante la noche, en envases estériles y herméticos, de vidrio, recubiertos de hielo en bolsas impermeables.

#### B) *Toma de muestras de leche:*

Se efectuó siguiendo las normas de la Fédération Internationale de Laiterie International Dairy Federation (FIL-IDF), 3 : 1958, transfiriendo 1 ml. de leche a 99 ml. de diluyente, inmediatamente después de haberla mezclado correctamente, agitando las botellas de arriba a abajo 25 veces, con una oscilación de 30 cm.

#### C) *Toma de muestras de quesos:*

Se realizó de acuerdo con la norma 2 : 1958 de la FIL-IDF, usando un cuchillo flameado, haciendo dos cortes radiales a partir del centro del queso, de tal forma que el peso del sector así obtenido fuera, después de quitar la capa superficial no consumible, superior a los 50 gr.

#### II.3.2. *Preparación de la muestra para los análisis microbiológicos.*

##### A) *Leche:*

Se tomaron directamente mediante pipeta estéril.

##### B) *Queso:*

Las muestras obtenidas en II.3.1. se trituraron en homogeneizador M. S. E. estéril. Se pesaron 11 gr. de queso y se hogeneizaron con 88,3 ml. de una disolución estéril de citrato sódico al 2 % (volumen final 100 ml.) en el mismo instrumento durante 10-15 minutos. El recipiente de plástico que recubría el vaso se mantuvo durante la operación a 40°C.

#### II.3.3. *Preparación de los medios de cultivo.*

Se llevó a efecto de acuerdo con las instrucciones de las casas suministradoras (Difco y Oxoid). Se ajustaron al pH correspondiente y se esterilizaron durante 15 minutos a una presión de 1 Kg/cm<sup>2</sup>.

Los medios fuertemente selectivos no fue necesario esterilizarlos.

#### II.3.4. *Medios de cultivo utilizados.*

Agar Rogosa (ROGOSA y col. 1951): se empleó para el aislamiento y recuento de *Lactobacillus spp.*

Agar Elliker (ELLIKER y col., 1956): se utilizó para el cultivo y aislamiento de estreptococos lácticos.

Agar para recuento en placa (Difco): se usó para efectuar el recuento total, de acuerdo con las normas de «USP», «APHA» y «AOAC», fórmula de «Standard Methods for the Examination of Dairy Products» (1967).

Agar mEnterococcus (SLANETZ y BARTLEY, 1957): se usó para el recuento del grupo fisiológico Enterococos, pertenecientes al género *Streptococcus*.

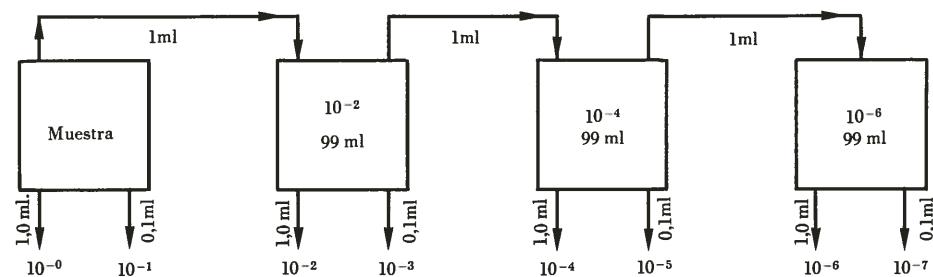
Los medios específicos para la identificación de los distintos gérmenes aislados, se describirán al hablar de las pruebas realizadas con cada uno de ellos.

#### II.3.5. *Recuentos de microorganismos viables.*

Los recuentos se realizaron siempre por el método de homogeneización en placas. El diluyente standard elegido fue Solución de Ringer (1/4) (WILSON, 1935). La solución se esterilizó antes de su empleo durante 15 minutos a 1 Kg/cm<sup>2</sup>.

#### II.3.6. *Preparación de las diluciones.*

Se prepararon a partir de las muestras obtenidas como se ha indicado anteriormente, tomando 1 ml con ayuda de una pipeta estéril y transfiriéndolo a una botella aplanada que contenía 99 ml de solución de Ringer (1/4) y agitando la botella 25 veces de acuerdo con la norma 3 : 1958 de la FIL-IDF; así se obtuvo la dilución 10<sup>-2</sup>. Las diluciones sucesivas se prepararon a partir de ésta, siguiendo la misma marcha, según el esquema siguiente:



#### II.3.7. *Siembras en placas.*

De acuerdo con el número de gérmenes viables esperados, se tomaron con pipetas estériles de las diluciones anteriores, 0,1 y 1 ml. que se depositaron repartidos por las placas; a continuación se vertió el agar y se agitaron las placas siguiendo las normas FIL-IDF 3 : 1958. Una vez solidificado, se incubaron invertidas en una cámara de incubación mantenida a 32°C.

#### II.3.8. *Recuentos.*

El recuento de colonias se efectuó después de tres días de incubación en un contador de colonias provisto de registrador. No se tuvieron en cuenta más que

aquellas placas en las que se desarrollaron entre 30 y 500 colonias, según recomendaciones de la norma FIL-IDF 3 : 1958. En aquellos casos en que los recuentos de dos diluciones sucesivas caían entre estos dos valores, se tomaron como válidos los correspondientes a las placas sembradas con 1 ml. de inóculo. Los resultados se expresan por gramo de queso.

#### II.3.9. Aislamiento de las colonias.

Se tomaron con un asa de platino de 5 a 10 colonias de cada uno de los tipos aparentemente distintos observados en las apropiadas placas de recuento y se trasladaron a tubos de ensayo con caldo y agar inclinado de la misma composición de las placas de procedencia o con un medio de cultivo apropiado para el germen que se pretendía aislar. Después de su incubación y crecimiento se mantuvieron a 2-4°C hasta su uso, resembrando cada 2-3 semanas en caso de requerirlo.

#### II.3.10. Identificación de los microorganismos.

##### II.3.10.1. Género *Streptococcus*.

###### A) Identificación del género.

Las pruebas utilizadas para la identificación de este género fueron:

—Examen microscópico (morfología, comportamiento frente al sistema de tinción de Gram y pureza del cultivo).

—Prueba de la catalasa: se sembraron las colonias aisladas en tubos inclinados de Agar Elliker (véase II.3.4.) o Agar triptosa (THATCHER y CLARK, 1968), dependiendo de si procedían de las placas que contenían Agar Elliker o Agar mEnterococcus, respectivamente. Se incubaron a 32°C y una vez observado un crecimiento abundante, se vertió sobre la superficie del cultivo 1 ml de agua oxigenada de 10 volúmenes. la efervescencia se tomó como prueba de la presencia de catalasa en el cultivo en estudio.

—Reducción del tornasol: se utilizó como sistema de diferenciación frente al género *Pediococcus* (REITER y MØLLER-MADSEN, 1963).

—Carácter homofermentativo o heterofermentativo de los cocos: se sembraron en el medio descrito por GIBSON y ABD-EL-MALEK (1945) que es un agar nutritivo bien tamponado de cuya composición forma parte la glucosa en una alta concentración; los medios inoculados se sellaron con un tapón de agar estéril, cuyo desplazamiento demuestra la producción de gas.

La identificación del género *Streptococcus* se basó, pues, en la comprobación de su carácter de cocos, Gram positivos, catalasa negativos, homofermentativos y reductores del tornasol antes de coagular la leche.

B) Género *Streptococcus*, grupos fisiológicos Enterococo (pertenecientes al grupo D de Lancefield) y Láctico (grupo N de Lancefield).

Las pruebas que se efectuaron fueron:

—Crecimiento a 10 y 45°C, que se comprobó en caldo Elliker y en caldo triptosa. Las incubaciones se efectuaron en baños de agua termostatados con una variación de  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ .

—Crecimiento en presencia de ClNa al 6,5 %: para su observación se utilizaron los mismos medios de cultivo con la concentración de ClNa indicada.

—Crecimiento a pH de 9,6, para lo que se utilizaron, de igual modo, caldo Elliker y triptosa. Después de esterilizarlos se tomó una alícuota y se ajustó el pH a 9,6 con NaOH concentrada.

—Crecimiento en leche tornasolada.

Todos los cultivos se incubaron a 32°C, salvo las pruebas de crecimiento a temperaturas límites.

Se consideraron como enterococos aquellos estreptococos que crecían a 10°C y a 45°C, a pH de 9,6, en presencia de ClNa al 6,5 % y reducían el tornasol antes de coagular la leche.

Se identificaron como estreptococos lácticos los estreptococos que crecían a 10°C pero no a 45°C, no proliferaban ni a pH de 9,6, ni en presencia de ClNa al 6,5 % y reducían el tornasol antes de coagular la leche.

###### C) Identificación de las especies del género *Streptococcus*.

###### 1) Grupo Enterococos:

Se verificaron los siguientes tests:

(Todas las incubaciones se realizaron a 32°C).

—Fermentación de hidratos de carbono y polialcoholes: se empleó el medio base descrito por THATCHER y CLARK (1968): Se disolvieron todos los ingredientes del medio base y se ajustó el pH a 7; se distribuyó en tubos un volumen de 4,5 ml, conteniendo tubitos Durham; se esterilizaron durante 15 minutos a 1 Kg/cm<sup>2</sup>. A cada tubo se le añadieron 0,5 ml. de una disolución al 5 % del carbohidrato deseado, esterilizado por filtración. La ausencia de gérmenes se comprobó incubando los tubos durante 5-6 días antes de su siembra.

Como indicador se empleó rojo de fenol al 0,0025 %.

Se usaron los siguientes azúcares y alcoholes: sorbitol, manitol, arabinosa, melibiosa y melecitosa.

—Crecimiento en telurito potásico al 0,05 %, en Agar triptosa. Las colonias que reducen el telurito ofrecen color negro.

—Reducción del cloruro de 2, 3, 4 trifénil tetrazolio: Se añadió esta sustancia a Agar triptosa en la concentración del 0,01 %. Las colonias que reducen el trifénil tetrazolio aparecen de color rojo o rosa.

—Coagulación y reducción de la leche tornasolada.

—Hidrólisis de la gelatina.

## 2) Grupo láctico:

La identificación de las especies pertenecientes a este grupo se realizó de acuerdo con REITER y MOLLER-MADSEN (1963) y por la reacción del Voges-Proskauer.

—Voges-Proskauer: la producción de diacetilo y/o acetoína se comprobó siguiendo la modificación de Barrit de este test (BARRIT, 1936).

—Crecimiento a 40°C: se comprobó en baño termostatado, con una sensibilidad de  $\pm 0,2^\circ\text{C}$ , utilizando como medio caldo Elliker.

—Producción de amoníaco a partir de la argimina: se empleó el medio descrito por ABD-EL-MALEK y GIBSON (1948), incubando los tubos sembrados a 32°C, junto con tubos control estériles. A los tubos con crecimiento abundante se les añadió 2 ml. del reactivo de Nessler, que da color rojo con los iones amonio.

## II.3.10.2. Género *Lactobacillus*.

### A) Identificación del género.

La identificación de este género se basó en el resultado de las siguientes pruebas:

—Examen microscópico (morfología, comportamiento frente al sistema de tinción de Gram y pureza del cultivo).

—Prueba de la catalasa en Agar Elliker: (véase II.3.10.1.A.).

—Producción de esporas: mediante examen microscópico.

### B) Grupo *Streptobacterium*, *Thermobacterium* y *Betabacterium*.

Los lactobacilos aislados se clasificaron con arreglo al criterio de ORLA JENSEN (1943).

—Carácter homofermentativo o heterofermentativo: deducido de la producción de gas en el medio MRS (DE MAN y col., 1960), omitiendo el extracto de carne.

—Facultad de crecer a 15 y 45°C en caldo Elliker y leche tornasolada.

### C) Especies del género *Lactobacillus*, grupo *Streptobacterium*.

Se identificaron con arreglo a las normas de ROCOSA y SHARPE (1959), basándose en:

—Fermentación de hidratos de carbono; las especies a identificar se sembraron en caldo Elliker; cuando el crecimiento fue abundante se lavaron mediante centrifugación (3.500 r.p.m.) con suero fisiológico estéril, para obtener un inóculo libre de hidrato de carbono. El medio base utilizado para las pruebas de fermentación fue el caldo MRS (DE MAN y col., 1960) sin extracto de carne ni glucosa y con púrpura de bromocresol al 0,004 % como indicador.

Los azúcares utilizados en estas pruebas fueron: arabinosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa y sacarosa a una concentración final del 2 %. Los azúcares se esterilizaron por filtración y antes de proceder a la inoculación del caldo se incubaron los tubos a 32°C durante unos 6 días para confirmar su esterilidad.

## II.3.10.3. Géneros *Micrococcus* y *Staphylococcus*.

La identificación de estos géneros se basó en:

—Examen microscópico (morfología, comportamiento frente al sistema de tinción de Gram y formación o no de grupos de 8 células —género Sarcina—).

—Prueba de la catalasa: (véase II.3.10.1.A) se efectuó en Agar nutritivo.

Se identificaron como *Staphylococcus* o *Micrococcus* los cocos Gram positivos, catalasa positivos, no formadores de paquetes de 8 células.

La distinción entre los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* se estableció siguiendo el método propuesto por el «International Subcommittee on Staphylococci and Micrococci» (1965), basado en que los micrococos no producen ácido a partir de la glucosa bajo condiciones anaeróbicas, mientras que los estafilococos sí.

### A) Identificación de las especies de ambos géneros.

Se han propuesto muchos esquemas para clasificar las especies de estos géneros (ABD-EL-MALEK y GIBSON; 1948; SHAW y col., 1951; HILL, 1959; ANDERSON, 1962; KOCUR y MARTINEC, 1962; BAIRD-PARKER, 1963 y 1965). En esta tesis se ha seguido la clasificación de Baird-Parker, para lo que se efectuaron las siguientes pruebas:

—Coagulasa: se pusieron 0,1 ml. de un cultivo en caldo infusión de corazón (Difco) incubando durante 12-16 horas, en un tubo de ensayo de  $2,54 \times 0,9$  cm. Se le añadieron 0,3 ml. de plasma de conejo (Difco). Después de su mezcla se incubaron a 37°C. El tubo fue observado periódicamente durante 24 horas. Cualquier grado de coagulación del plasma se tomó como indicativo de actividad coagulasa.

—Producción de fosfatasa: se utilizó el medio descrito por Baird-Parker (1963). A cada 100 ml. del mismo se le añadió 1 ml. de una disolución de difosfato de fenolftaleína al 1 %, esterilizada por filtración. La incubación se efectuó a 30°C durante 3 días.

La actividad fosfatasa se detectó exponiendo la placa de Petri a los vapores de amoníaco con lo que las colonias provistas de fosfatasa toman un color rosa.

—Voges-Proskauer: se utilizó el medio de cultivo descrito a este fin por BAIRD-PARKER (1963). La producción de diacetilo y/o acetoína se detectó por la modificación de BARRIT (1936).

—Fermentación de hidratos de carbono y polialcoholes: los sustratos utilizados fueron arabinosa, lactosa, manitol y maltosa. El medio base empleado fue el descrito por BAIRD-PARKER (1963).

### II.3.11. Elaboración de los cultivos lácticos.

Los cultivos lácticos «madre» utilizados para la fabricación experimental de quesos se prepararon con gérmenes aislados de quesos fabricados por procedimientos artesanos y de la leche con que se elaboraron.

Se cultivaron las cepas aisladas en leche tornasolada a la temperatura adecuada y se liofilizaron cuando la leche adquirió un aspecto pastoso, antes de su coagulación.

Los liofilizados a utilizar se regeneraron en leche esterilizada, cultivándose durante unas 16 horas (se encuentran los gérmenes en fase de multiplicación logarítmica) al cabo de las cuales se tomó un inóculo, del volumen deseado en cada caso, de estos cultivos regeneradores, sembrando con distintas combinaciones de los mismos un matraz de leche estéril; todas las combinaciones utilizadas contenían *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Lactobacillus plantarum*, que constituyeron la base del «starter». Uno de los «fermentos» estuvo constituido exclusivamente por estas especies; los demás poseían, además, cepas pertenecientes al género *Micrococcus* y/o Enterococos (*Streptococcus faecium* y *Streptococcus faecalis*, var. *liquefaciens*).

Los matraces cultivados con estos gérmenes (unas 16 horas a 32°C) se homogeneizaron por agitación y, posteriormente, el cultivo se liofilizó en ampollas adecuadas que se cerraron al vacío, una vez concluida la operación.

Los cultivos así preparados se conservaron a 2-4°C hasta su empleo en la fabricación experimental de los quesos.

## II.4. Métodos Bioquímicos.

### II.4.1. Obtención de la muestra.

Se llevó a efecto de acuerdo con las normas de la FIL-IDF 2 : 1958 (véase II.3.1.C.).

### II.4.2. Extracto seco.

Se determinó por triplicado, deshidratando las muestras en cápsulas de porcelana a 100-110°C en estufa de aire forzado hasta peso constante.

### II.4.3. Determinaciones de nitrógeno.

Las determinaciones de nitrógeno se realizaron siguiendo el método de JOHNSON (1941) y refiriendo las lecturas a una gráfica patrón preparada con seroalbúmina (figura II.1.).

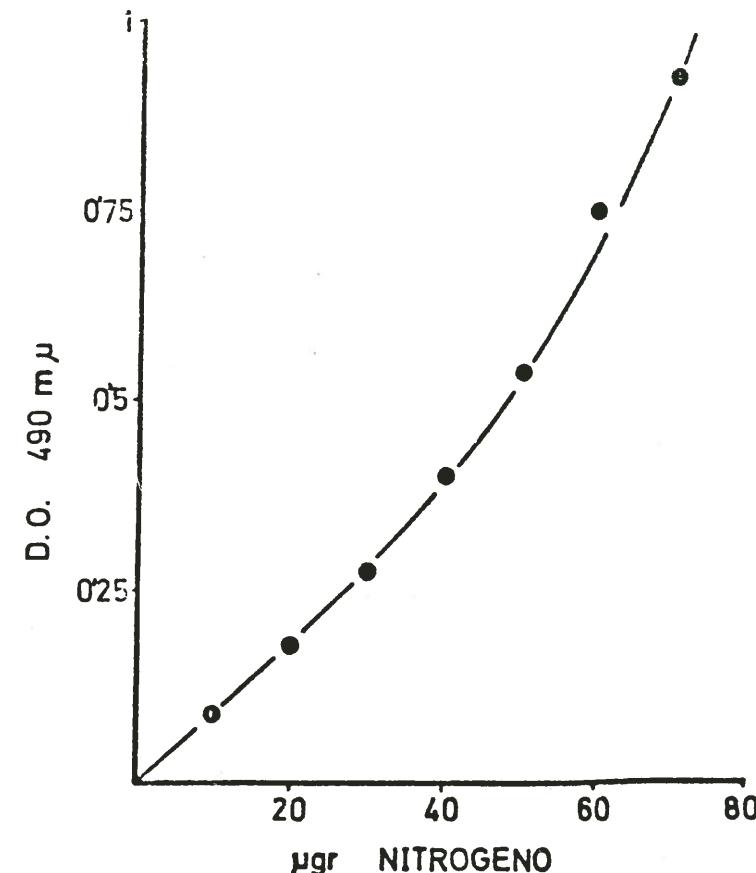


Figura II.1: Gráfica patrón para las determinaciones de nitrógeno por el método de Johnson.

### II.4.4. Fraccionamiento de los componentes nitrogenados de los quesos.

#### II.4.4.1. Obtención de la muestra.

La obtención de la muestra a partir de la cual se determinó el nitrógeno total y el nitrógeno de los componentes fraccionados, se realizó de acuerdo con la norma 2 : 1958 de la FIL-IDF (véase II.3.1.C.); se trituró la cantidad obtenida (no menos de 50 gr.) hasta lograr un homogeneizado uniforme.

#### II.4.4.2. Nitrógeno total.

Se pesó una cantidad conocida (entre 1-3 gr.) del triturado obtenido en II.4.4.1. que se pasó a un mortero; se vertió sobre él, una pequeña cantidad de una disolución de ácido acético a, 2,5 %. Se trituró bien y se pasó la disolución a un matraz

aforado de 100 ml. Se lavó el mortero varias veces más con la citada disolución de acético, incorporándose los lavados al matraz aforado; se calentó a 50°C para facilitar la disolución, se enfrió luego a 20°C y se ajustó el volumen, con ácido acético al 2,5 %, a 100 ml.

Se tomaron alícuotas con un contenido entre 10 y 70  $\mu\text{g}$  de nitrógeno, diluyendo para ello, cuando fue necesario, y se determinó, por cuadruplicado, el nitrógeno por el método de JOHNSON (1941) (véase II.4.3.).

#### II.4.4.3. *Nitrógeno soluble.*

Se pesaron entre 1 y 3 gr. del triturado inicial que se pasaron a un mortero; se vertió sobre él, una pequeña cantidad de la disolución de Sharp (55,7 ml. de ácido acético glacial; 136,1 gr. de acetato de sodio  $3\text{H}_2\text{O}$ ; 47 gr. de  $\text{ClNa}$ ; 8,9 gr. de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ; volumen 1 litro. Diluir 1/4 con agua destilada antes de su uso; su pH es de 5,5). Se trituró bien y se transfirió la disolución a un matraz aforado de 100 ml.; se lavó varias veces el mortero con más disolución de Sharp y se incorporaron los lavados al contenido del matraz aforado, ajustando finalmente el volumen a 100 ml. La suspensión se introdujo después en un baño de agua a 50°C donde se mantuvo durante 60 minutos y se filtró finalmente, a través de un papel Ederol n.º 4.

Del filtrado se tomaron alícuotas, por cuadruplicado, y se determinó el nitrógeno.

#### II.4.4.4. *Nitrógeno no proteico.*

Del filtrado de la disolución anterior (líquido de Sharp) se tomaron 20 ml. a los que se añadieron 30 ml de ácido tricloroacético al 20 %. La mezcla se dejó en reposo durante 10 minutos y se filtró a través de papel Ederol n.º 4.

Del filtrado se tomaron alícuotas, por cuadruplicado, en las que se determinó el nitrógeno.

#### II.4.4.5. *Nitrógeno amoniacial.*

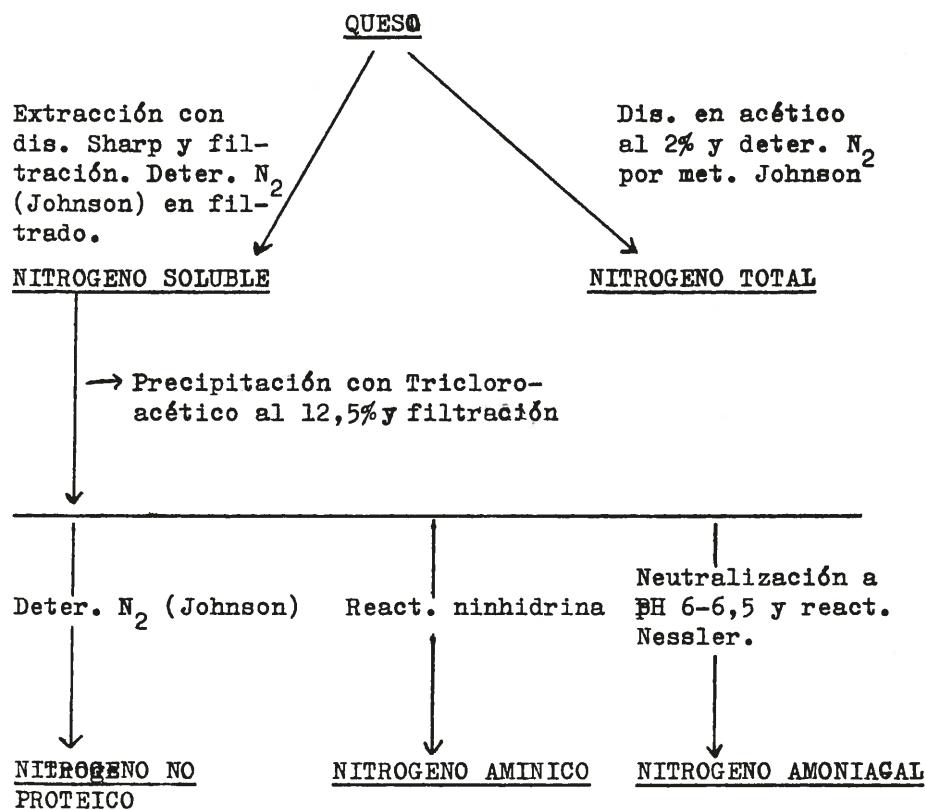
Se tomaron 20 ml del filtrado anterior y se neutralizaron con  $\text{NaOH}$  (40 %); se ajustó el volumen a 50 ml. en matraz aforado. Se tomaron 5 ml. de esta disolución y se le añadieron 2 ml. del reactivo de Nessler (4 gr. de  $\text{I}_2\text{Hg}$ ; 4 gr. de  $\text{IK}$  y 1,75 gr. de goma arábiga; agua destilada hasta 1 litro) y 3 ml. de  $\text{NaOH}$  4N; el contenido se homogeneizó por agitación y se leyó su absorbancia a 490  $\text{m}\mu$ , refiriendo las lecturas a una gráfica patrón construida con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .

#### II.4.4.6. *Nitrógeno amínico.*

Se tomó 1 ml. de la disolución neutralizada usada para la determinación del nitrógeno amoniacial (4 réplicas). Se añadieron a cada tubo 3 ml. del reactivo de

ninhidrina (Mezclas a partes iguales de una disolución al 0,16 % de  $\text{Cl}_2\text{Sn}$  en tampón citrato, 0,2 M, pH 5 y una disolución al 4 % de ninhidrina en etilenglicol-monometil-éter, preparada inmediatamente antes de su uso o conservada por no más de una semana a 2,4°C y al abrigo de la luz) y se agitaron. Se introdujeron durante 20 minutos en un baño de agua hirviendo. Terminado el calentamiento, se enfriaron los tubos al chorro y se les añadieron a cada uno, 8 ml. de alcohol n-propílico al 50 % (es necesario una agitación energética) con una pipeta terminal de 10 ml. soplando. Se agitaron de nuevo los tubos y se dejaron en reposo durante 10 minutos. Se leyó la extinción de los tubos a 570  $\text{m}\mu$  contra un blanco de agua destilada (1 ml.) tratada igualmente que la muestra. Se procedió del mismo modo con cuatro muestras de glicocola 0,001 M que sirvieron de patrón.

El siguiente esquema recoge el diagrama del sistema de fraccionamiento de los compuestos nitrogenados de los quesos.



#### II.4.5. Identificación y determinación de aminoácidos libres.

Los análisis de aminoácidos libres se efectuaron siguiendo, en esencia, la modificación del método de determinación de aminoácidos en columna de intercambio de iones de MOORE y col. (1958), descrito por SALA y BURGOS (1972).

Las resinas fueron preparadas en nuestro laboratorio siguiendo, en esencia, el método descrito por HAMILTON (1958), utilizando en su separación agua desionizada a temperatura ambiente. La resinas originales procedían de la BDH.

Para los aminoácidos neutros y ácidos se utilizaron columnas de 165 cm de altura por 0,9 cm de diámetro interno. Para los aminoácidos básicos se emplearon de 60 × 0,9 cm. Ambas columnas estaban provistas de una camisa para la circulación por ellas, de agua a 50°C.

##### II.4.5.1. Preparación y ajuste de tampones.

Los tampones se prepararon siguiendo la técnica descrita por MOORE y col. (1958), excepto el tampón 5,5 que se hizo de acuerdo con las normas de MOORE y STEIN (1954). La composición de cada uno se indica en las tablas II.1 y II.2.

**TABLA II.1.**  
Composición de los tampones de citrato sódico, utilizados para la cromatografía de los aminoácidos

pH	N	A. C. (1) gr.	NaOH 97 % gr.	ClH (2) ml.	Vol. final 1.	Fenol gr.	Brij-35 ml (3)	T. (4) ml.
2,2	0,2	21	8,40	16	1	1	—	—
3,25 ± 0,01	0,2	21	8,25	10,65	1	1	5	10
4,25 ± 0,01	0,2	21	8,25	4,70	1	1	5	10
5,28 ± 0,01	0,35	24,55	14,40	6,80	1	1	5	10

Los tampones 3,25, 4,25 y 5,28, cuando hizo falta, se ajustó el pH por adición de NaOH al 50 % o de ClH concentrado (añadiendo 1 ml. del primero ó 2 ml. del segundo, a un litro de tampón, vira el pH en ± 0,01 unidad en el sentido apropiado).

(1) A. C.: Ácido cítrico (monohidrato)

(2) ClH concentrado.

(3) De una disolución que contiene 50 gr. en 100 ml.

(4) T.: Tioglicol sin diluir.

**TABLA II.2.**  
Composición del tampón acetato sódico

pH	N	A acét. glacial (ml.)	Acetato Na <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O (gr.)	Vol. final (litros)
5,5	4	500	2.720	5

Nota: El pH final debe ser 5,5 ± 0,03. Este tampón no necesita Brij-35 ni tioglicol.

Para el ajuste de los tampones se utilizó como patrón el de ftalato (BATES, 1962), preparado de la siguiente forma: unos 2 gr. de biftalato potásico se deshidrataron en cápsula de porcelana a 100°C. Durante tres horas; tras enfriarlos en un desecador sobre Cl<sub>2</sub>Ca, se pesaron 1,012 gr. de biftalato y se disolvieron en agua destilada en vidrio, se ajustó el volumen final a 100 ml. El tampón así preparado se conservó a —15°C (este tampón tiene un pH, a 25°C, de 4,008).

Los pHs de los tampones recomendados por MOORE y col. (1958) para la cromatografía de los aminoácidos neutros y ácidos, en la columna de 165 cm, son 3,25 ± 0,01 y 4,25 ± 0,02; en nuestras condiciones de trabajo fue necesario ajustar los pHs de los tampones, tomando como referencia el tampón ftalato, a pHs de 3,19 ± 0,01 y 4,24 ± 0,01. A los pHs aconsejados por MOORE y col. (1958), los picos de la glicocola y alanina salían superpuestos, lo mismo que los de la cistina y valina. A los pHs utilizados en esta tesis la separación de estos aminoácidos es perfecta. Una variación de ± 0,03 centésimas (SALA, comunicación personal) es suficiente para que la separación de los citados aminoácidos se vea dificultada.

Para la cromatografía de los aminoácidos básicos se usó el tampón citrato al pH 5,28 recomendado por MOORE y col. (1958).

##### II.4.5.2. Preparación del reactivo de ninhidrina.

Se preparó de acuerdo con la modificación de MOORE y STEIN (1954).

a) Reactivo de hidridantina: se preparó una disolución al 4 % de ninhidrina en agua a 90°C. Se añadió, agitando, 1/5 de su volumen de una disolución al 20 % de ácido ascórbico en agua destilada a 40°C. La hidridantina cristaliza de inmediato. Se dejó enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente y una hora bajo el agua del grifo. Se filtró la disolución a través de un papel Ederol n.º 2, con ayuda de un Büchner; se lavó con agua y se secó hasta peso constante sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, y protegiéndola de la luz. La hidridantina se almacenó en frasco de color topacio.

b) Reactivo de ninhidrina: se disolvieron 20 gr. de ninhidrina y 3 gr. de hidridantina por cada 750 ml. de etilenglicolmonometíleter, exento de peróxidos. Una vez disueltos, se añadieron 250 ml de tampón acetato 4N, pH 5,5 (véase Tabla II.2.).

Este reactivo es inestable. Se preparó inmediatamente antes de su uso y durante su empleo se mantuvo al abrigo de la luz.

##### II.4.5.3. Empaquetado de las columnas.

El tamaño de las resinas aconsejado por MOORE y col. (1958) es de 56 ± 9 micras para las columnas cromatográficas de los aminoácidos neutros y ácidos y de 40 ± 7 micras para los básicos. Las resinas utilizadas en el trabajo descrito en esta tesis fueron de 48 ± 10 micras (para la columna usada para separar los aminoácidos neutros y ácidos) y de 30 ± 7 micras (para la separación de los bá-

sicos) que resultan más eficaces en las condiciones de trabajo usadas (SALA y BURGOS, 1972). En el extremo inferior de ambas columnas se colocó una pequeña fracción de resinas de  $18 \pm 7$  micras.

Las resinas se lavaron en un embudo de Büchner primero con ClH 4N (unos 500 ml.), luego con agua y después con NaOH 2N hasta que el filtrado alcanzó una reacción fuertemente alcalina. Se lavaron finalmente con agua y abundantes cantidades de tampón citrato sódico 0,2 N, pH 3,19 (sin Brij-35 ni tioglicol) hasta un pH de filtrado próximo a 3.

Las columnas se llenaron depositando sobre la placa porosa primero resinas de  $18 \pm 7$  micras hasta una altura de 3-5 cm., añadiendo tampón de pH de 3,19 hasta llenar la columna y aplicando una presión de 4-5 Kg/cm<sup>2</sup>, con ayuda de una bala de nitrógeno, con la finalidad de apretar fuertemente las partículas. Cuando había pasado casi todo el tampón de pH 3,19, se dividió en tres lotes el resto de las resinas (tamaño de  $48 \pm 10$  micras para la columna de 165 cm y de  $30 \pm 7$  para la de los aminoácidos básicos); se vertió el primero en la columna correspondiente y se aplicó una presión de 4 Kg/cm<sup>2</sup>, se depositó luego la segunda fracción a una presión de 3 Kg/cm<sup>2</sup>; el tercer lote se depositó, finalmente, sobre las resinas anteriores a 2 Kg/cm<sup>2</sup>. Este sistema de llenado resulta esencial para evitar posteriores perturbaciones del flujo (SALA y BURGOS, 1972).

Las columnas se equilibraron antes de la cromatografía pasando tampón citrato 0,2 N, pH 3,19 a la presión de trabajo usada durante la cromatografía, hasta que el nivel alcanzado por las resinas quedara definitivamente estabilizado.

La fase móvil de la cromatografía (tampones) fue impulsada por una bomba peristáltica «Büchler», mod. 2-6100.

El flujo usado en la columna de los aminoácidos neutros y ácidos fue de 80-90 ml./h. y en la de los aminoácidos básicos fue de 150 ml/h.

#### II.4.5.4. Extracción, purificación y colocación de la muestra; desarrollo de la cromatografía y análisis de las fracciones eluidas.

a) Extracción y purificación de la muestra: la extracción de aminoácidos libres se efectuó a partir de muestras tomadas de acuerdo con las normas de la FIL-IDF (2 : 1958), siguiendo, en esencia, en método de BLOCK (1956): la muestra de queso se trituró bien con el homogeneizador de cuchillas M.S.E.; una alícuota se mezcló con agua destilada en la proporción 1/1 (p/v); la mezcla se homogeneizó durante 5 minutos en el aparato citado; el homogeneizado se centrifugó a 3.500 r.p.m. durante 5 minutos; se retiró el sobrenadante y se repitió la extracción del sedimento en las mismas condiciones. Se reunieron los extractos y se trataron con 12 volúmenes de etanol absoluto durante 30 minutos a 2-4°C; se eliminó el precipitado por centrifugación y el sobrenadante se concentró en el roto-vapor a 20°C y conectado a un liofilizador tipo «Quickfit», provisto de una bomba de alto vacío. El residuo

se disolvió en un volumen conocido de agua destilada y se filtró a través de un filtro «Millipore» con ayuda de vacío.

Los extractos de aminoácidos libres así obtenidos se conservaron a —15, —20°C hasta su análisis.

La figura II.2. es un diagrama de flujo que esquematiza la técnica de extracción y purificación de los aminoácidos libres.

b) Colocación de la muestra: a una alícuota de volumen inferior a 1,5 ml.

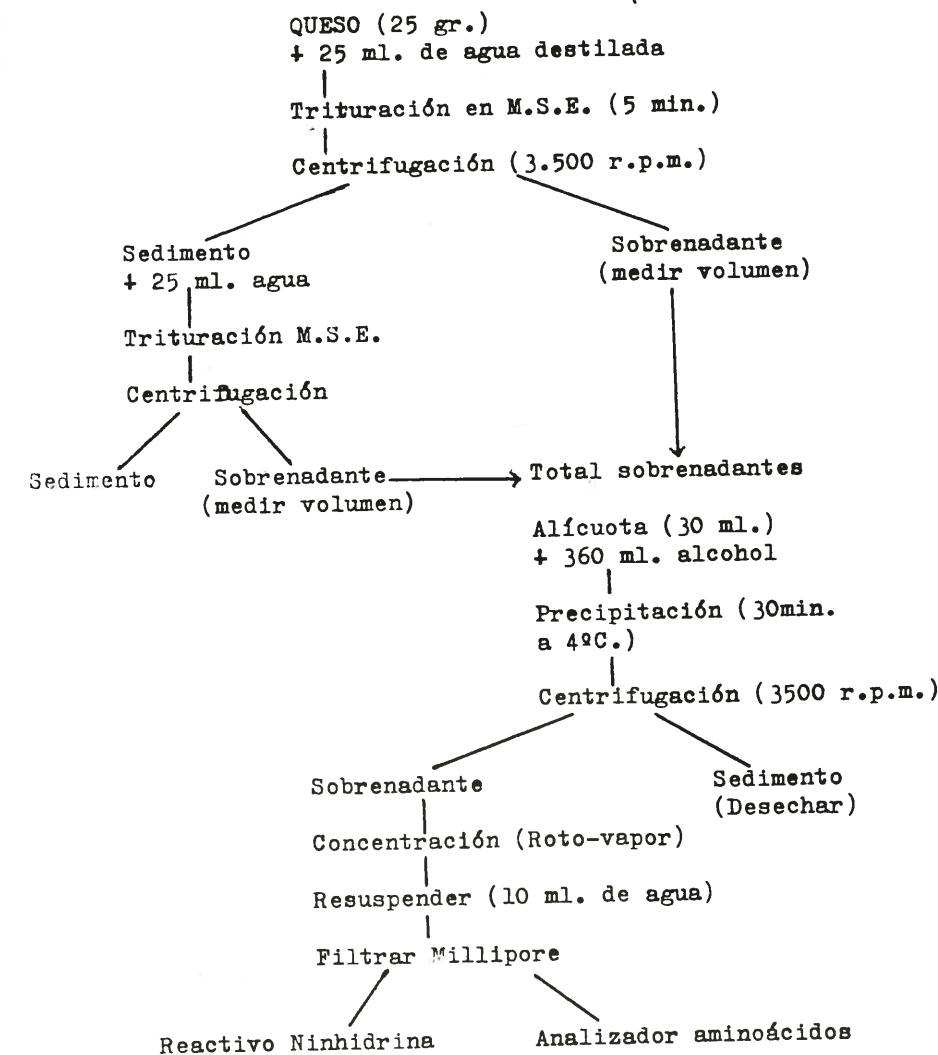


Figura II.2: Método de extracción y purificación de los aminoácidos libres del queso, ejemplarizada con una muestra de 25 gramos.

se le añadió 1 ml. de tampón citrato de pH 2,2 (Tabla II.1.) y se depositó sobre el lecho cromatográfico una vez evacuado el tampón de la columna. Se le aplicó una presión de 3 Kg/cm<sup>2</sup> hasta que la muestra penetró en las resinas y se le añadieron dos veces 0,5 ml del citado tampón citrato de pH 2,2 que se hicieron penetrar a la misma presión que la muestra. Se llenó luego la columna con tampón citrato de pH 3,19 y se conectó la bomba peristáltica operando a un flujo de 80-90 ml./h. El eluato se recogió en fracciones de 2 ml. en un colector de fracciones L.K.B. mod. Ultrorac-7.000.

Cuando se hubo recogido 2,5 veces el volumen de elución del ácido aspártico (determinado previamente en una cromatografía de aminoácidos patrón) se cambió el tampón, sustituyéndolo por el de pH 4,24 (a los 360 ml. en nuestras condiciones experimentales).

La cromatografía se dio por concluida cuando se hubo eluido la fenilalanina. (En nuestras condiciones experimentales cuando la totalidad del eluato recogido alcanzó un volumen de 640 ml.).

A lo largo del desarrollo cromatográfico, se hizo circular, por la camisa de las columnas, agua a 50°C impulsada por una bomba «Braum», mod. Thermomix-LL.

c) Análisis del eluato: A cada tubo (con 2 ml. de eluato) se le añadió 1 ml. del reactivo de ninhidrina (II.4.5.2.); los tubos se agitaron durante 10-15 segundos y se introdujeron en un baño de agua hirviendo, donde se mantuvieron durante 15 minutos. Se enfriaron luego introduciéndolos en un baño de agua fría. El contenido de cada tubo se diluyó con 5 ml. de etanol-agua (1/1) (v/v) y se agitaron enérgicamente; a continuación se leyó su extinción a una longitud de onda de 570 m $\mu$  (440 m $\mu$  para la prolina) en un sistema de flujo continuo diseñado por SALA y BURGOS (1972) (figura II.3.).

El desarrollo de la cromatografía de los aminoácidos básicos, en la columna de 65 cm, rellenada con resinas de 30  $\pm$  7 micras hasta una altura no menor de 25 cm, se llevó a cabo de forma similar, utilizando como fase móvil tampón citrato de pH 5,28  $\pm$  0,01 a un flujo de 150 ml./h.

La cromatografía se dio por concluida cuando se hubo eluido la arginina, tras haberse recogido 200 ml. en nuestras condiciones experimentales.

d) Regeneración de las columnas: terminada cada cromatografía se lavaron, regeneraron y equilibraron las resinas usadas en la columna empleada para la separación de los aminoácidos neutros y ácidos, pasando primero 200 ml. de NaOH 0,2 N, y luego, 500 ml. de tampón citrato de pH 3,19 a un flujo de 80-100 ml./h. La columna usada para la separación de aminoácidos básicos se trató pasando por ella primero 100 ml. de NaOH 0,35 N. y después 300 ml. de tampón citrato de pH 5,28 a un flujo de 100-150 ml./h.

#### II.4.5.5. Identificación y cuantificación de los aminoácidos.

Representando gráficamente la extinción a 570 m $\mu$  (ó 440 para la prolina)

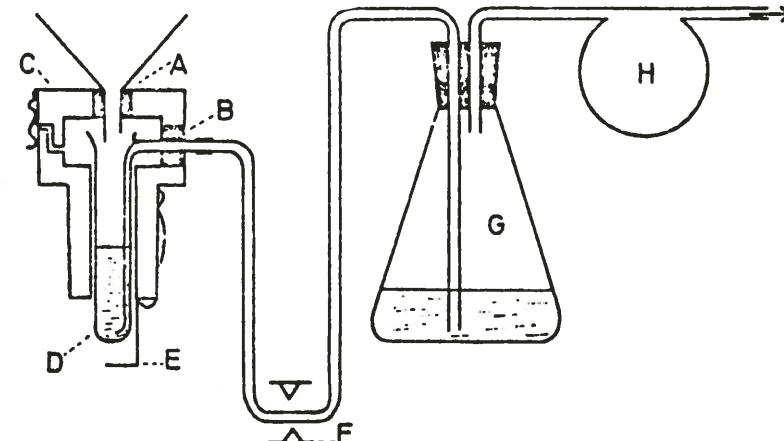


Figura II.3: Dispositivo empleado para la lectura de los tubos de la cromatografía:

- A y B = Tapones de goma perforados.
- C = Tapa del portacubetas.
- D = Tapa de ensayo de 16 mm. O, modificado para su descarga a vacío.
- E = Vástago que abre el paso de luz a través del tubo D al colocar el portacubetas en el colorímetro.
- F = Pedal para oprimir el tubo de vacío en el momento de llenar la cubeta y efectuar la lectura.
- G = Erlenmeyer para la recogida de las muestras leídas.
- H = Bomba de vacío o trompa de agua.

—Las medidas del portacubetas deben ser idénticas a las del portacubetas original del colorímetro.  
De SALA y BURGOS (1972).

en función del volumen de elución se obtuvo el aminoacidograma correspondiente a cada muestra. Los aminoácidos correspondientes a cada pico se identificaron comparando el volumen de elución con el de los patrones apropiados (B.D.H.).

La cuantificación de cada aminoácido identificado se llevó a efecto basándose en el área de su correspondiente pico que fue referida a la del mismo aminoácido de un aminoacidograma patrón preparado con muestras conteniendo 0,70  $\mu$  moles de cada uno de ellos.

En la figura II.4 se representa el aminoacidograma patrón de mezclas de aminoácidos neutros y ácidos y en la II.5 el correspondiente a los aminoácidos básicos.

#### II.4.5.6. Determinación del nitrógeno peptídico en la disolución acuosa final obtenida en la extracción y purificación de los aminoácidos libres del queso.

Se llevó a efecto por el método del biuret (CHANCE y REDFEARN, 1961). Las lecturas se refirieron a una gráfica patrón (figura II.6) preparada con seroalbúmina.

## II.4.6. Extracción, fraccionamiento, identificación y cuantificación de los lípidos.

### II.4.6.1. Determinación de la materia grasa total.

Se realizó por el método de Gerber, siguiendo la técnica descrita en los British Standard, parte 2. 696 : 1955, utilizando el butirómetro de Van Gulik.

### II.4.6.2. Extracción de los lípidos.

La extracción de la materia grasa del queso no es tarea fácil; el sistema de extracción puede afectar significativamente las propiedades de los lípidos extraídos (BURTON y col., 1955). Se han preconizado extracciones en medios ácidos, alcalinos y neutros, por procedimientos físicos y químicos (VAN GINKEL y Roos, 1964). El procedimiento seguido en esta tesis consta de dos fases: una extracción física y otra química efectuada sobre el residuo de la primera. El porcentaje total extraído se obtuvo por referencia a la determinación de grasa total por el método de GERBER (II.4.6.1).

#### a) Método físico:

Extracción: se efectuó siguiendo el método de SCARPELLINO y KOSIKOWSKI (1961). Se tomó una cantidad conocida de queso (alrededor de 100 gr.) desprovisto de corteza. Se trituró en un mortero y se le añadieron 2 volúmenes de agua destilada a unos 20°C; se mezclaron perfectamente con un agitador mecánico y se ajustó el pH a 4,1 con CIH 2N., con lo que los glóbulos grasos ascienden a la superficie; se mantuvo la mezcla a 4°C durante 30 minutos y se calentó luego a 40°C al baño maría; se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 r. p. m. separándose tres capas de densidades crecientes: materia grasa, agua y caseína. Se retiró la grasa, que lleva siempre consigo cierta cantidad de caseína, por lo que se volvió a centrifugar previa adición de una pequeña cantidad de agua destilada; tras el calentamiento a 48-50°C una vez retirada el agua, se decantó la grasa sobre un erlenmeyer previamente tarado.

Purificación: el extracto lipídico obtenido por centrifugación se liberó de material no lipídico disolviéndolo en unos 100 ml. de cloroformo-metanol 2/1 (v/v) y lavándolo por el método de Folch (FOLCH y col., 1957).

La disolución de lípidos así obtenida se concentró en roto-vapor hasta un volumen de 5-10 ml. que se transfirieron a un matraz previamente tarado, donde se acabaron de liberar de disolvente mediante corriente nitrógeno, al abrigo de la luz y manteniendo el residuo en un desecador al vacío durante 2,3 horas sobre  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ . Se determinó el peso del extracto purificado y se conservó éste a —15, —20°C, hasta su análisis.

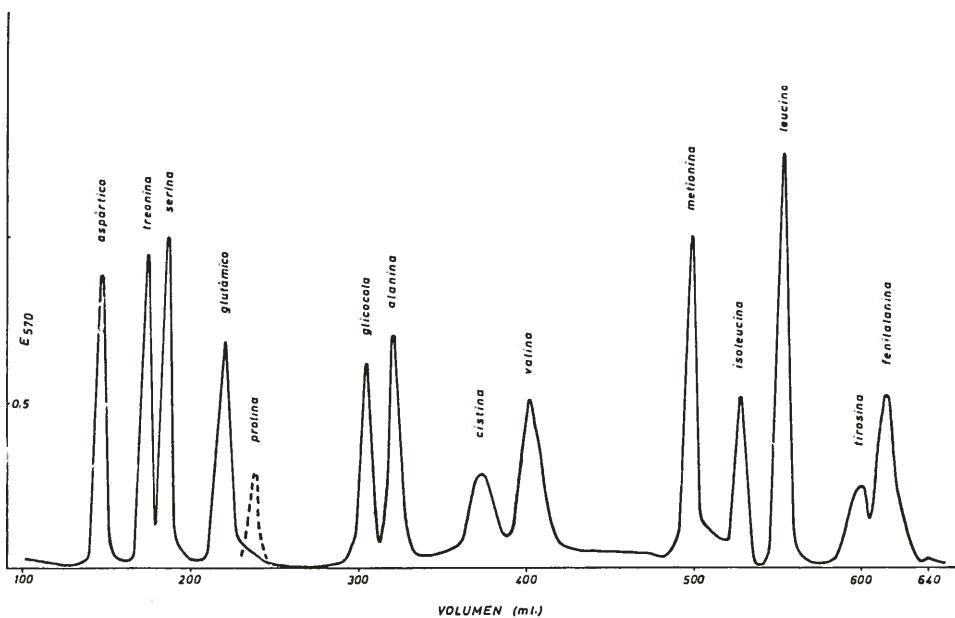


Figura II.4: Cromatografía de un patrón de aminoácidos neutros y ácidos (muestra conteniendo 1/10 mol de cada uno de los aminoácidos que se indican en la figura ).

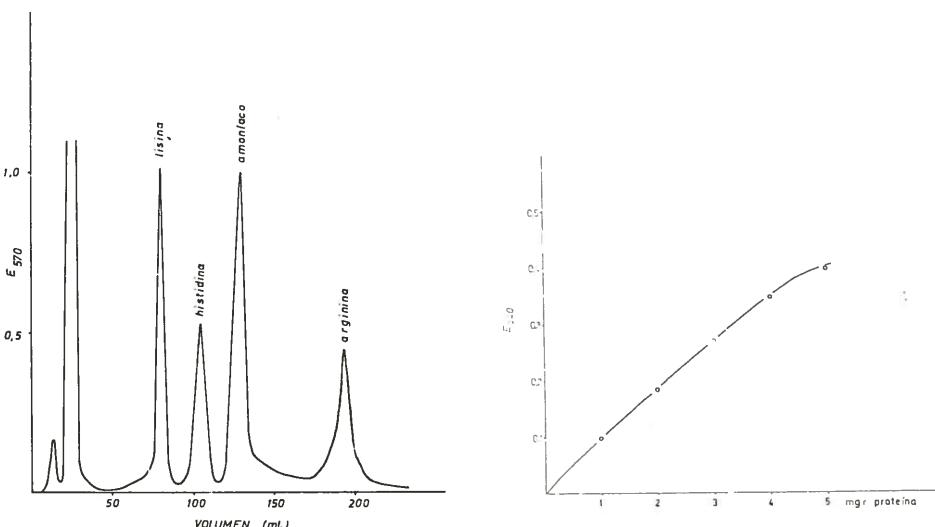


Figura II.5: Cromatografía de un patrón de aminoácidos básicos y amoníaco (muestra conteniendo 1/10 mol de amoníaco y cada uno de los aminoácidos que se indican en la figura ).

Figura II.6: Gráfica patrón para las determinaciones de nitrógeno peptídico por el método del biuret.

b) *Método químico:*

Extracción y purificación: la caseína residual del método físico se extrajo siguiendo, en esencia, el método de Folch (FOLCH y col., 1957), para productos que contienen grandes cantidades de agua. Para ello, se añadieron 5 ml. de cloroformo-metanol 2/1 (v/v) por cada gramo de caseína residual y se agitó la mezcla durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Se filtró y la fracción retenida por el filtro se extrajo de nuevo por el mismo método otras dos veces. Se reunieron los filtrados y se liberaron de disolventes. El residuo se purificó como el extracto físico. Se pesó el extracto purificado y se almacenó hasta su análisis, a —15, —20°C.

II.4.6.3. *Fraccionamiento de los lípidos purificados en columna de ácido silícico-celita.*

II.4.6.3.1. *Ácido silícico-celita 4/1.*

a) Empaquetado de la columna: se depositaron en un mortero ácido silícico (previamente activado durante 12 horas a 110°C) y celita en la proporción de 4/1. Se le añadió una mezcla de cloroformo-metanol (98/2) (v/v) y se homogeneizó con el fin de lograr una perfecta distribución del ácido silícico y la celita. La suspensión así obtenida se transfirió a una columna cromatográfica adecuada. Se mantuvo una relación altura/diámetro de la columna de 12,5.

b) Desarrollo de la cromatografía: la muestra a cromatografiar se pesó y se disolvió en la mínima cantidad posible de cloroformo-metanol (98/2) (v/v); se depositó sobre el lecho cromatográfico, en el que sobrenadaba una capa de disolvente de 1 cm. de altura. Una vez introducida la muestra en el soporte cromatográfico se añadió más disolvente y se desarrolló la cromatografía con una serie eluotrópica constituida por las siguientes mezclas de cloroformo-metanol, como fase móvil.

Fracción 1, Cloroformo 98 %, Metanol 2 %.

Fracción 2, Cloroformo 97 %, Metanol 3 %.

Fracción 3, Cloroformo 96 %, Metanol 4 %.

Fracción 4, Cloroformo 95 %, Metanol 5 %.

Fracción 5, Cloroformo 90 %, Metanol 10 %.

Fracción 6, Cloroformo 85 %, Metanol 15 %.

Fracción 7, Cloroformo 80 %, Metanol 20 %.

Fracción 8, Cloroformo 0 %, Metanol 100 %.

La muestra cromatografiada estuvo en una proporción de alrededor de 1 gr. por cada 20 de soporte.

Durante toda la cromatografía, se protegieron contra la luz la columna y las fracciones recogidas.

El paso de las fracciones eluidas se registró una vez liberadas de disolventes.

II.4.6.3.2. *Ácido silícico-celita 1/1.*

En las cromatografías en ácido silícico-celita (1/1) (p/p) sólo se usaron dos fases móviles: cloroformo (10 ml./gr de soporte) para arrastrar los lípidos apolares y metanol (5 ml./gr. de soporte) para eluir los lípidos polares.

En este caso, el soporte estuvo constituido por ácido silícico-celita en la proporción (1/1) (p/p).

La muestra a cromatografiar fue, en todos los casos, de alrededor de 1 gr./40 gr. de soporte.

II.4.6.4. *Fraccionamiento de los lípidos apolares en columna de sílica gel.*

Para el fraccionamiento de los lípidos apolares obtenidos en la columna de ácido silícico-celita 1/1 (véase II.4.6.3.2), se siguió el método descrito por SMITH y col. (1969). La fase estacionaria (sílica gel G), previamente lavada (véase II.2.2), se activó antes de la preparación de la columna a 110°C durante 30 minutos. Se depositó, en la columna, suspendida en benceno, manteniendo una relación final, entre altura y diámetro, de 7.

La muestra de lípidos apolares a cromatografiar, previamente pesada (unos 5 mg por gramo de sílica gel), se depositó, disuelta en benceno, sobre el lecho cromatográfico; como fase móvil se usó sucesivamente, benceno, éter etílico libre de peróxidos, etanol y metanol en las proporciones que se indican (para una columna de 20 gr. de sílica gel) a continuación:

Fracción	Disolvente	Volumen (ML)
1	Benceno	20
2	»	10
3	»	20
4	»	10
5	Benceno/éter/etanol (80/20/1)	10
6	» » »	40
7	» » »	50
8	« » »	40
9	» » »	30
10	» » » (30/67/3)	70
11	Éter	40
12	»	30
13	Metanol	10
14	»	40
15	»	10

El flujo de la fase móvil se estableció, en todos los casos, en 1,6 ml./min. aplicando a la columna presión con nitrógeno.

II.4.6.5. *Obtención de la fracción insaponificable.*

Se hirvió a reflujo durante 45 minutos una disolución etanólica de la muestra

(6 ml. de etanol, con 0,25 % de pirogalol, por cada 0,1 gr. de muestra) junto con 1/2 de su volumen de KOH al 60 %.

Se enfrió el producto y se le añadió 3 volúmenes de agua destilada. El insaponificable se extrajo 5 veces con éter etílico libre de peróxidos. El extracto se lavó con agua destilada cuantas veces fue necesario para que la fase inferior (agua de lavado) alcanzara la neutralidad. Se concentró hasta un volumen de unos 10 ml. que se transfirieron a un erlenmeyer pequeño, se adicionó sulfato sódico anhidro y se mantuvo así 4-5 horas; se filtró a través de una placa de vidrio y el filtrado se recogió sobre un matraz, previamente tarado, donde se evaporó el disolvente bajo corriente de nitrógeno. El insaponificable se pesó tras mantenerlo en un desecador con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  al vacío durante 2 horas.

#### II.4.6.6. *Cromatografía en lámina fina.*

Se utilizaron placas de  $20 \times 20$  cm y de  $20 \times 5$  cm. de un espesor de 0,25 mm. Se prepararon con sílica gel G para cromatografía en lámina fina, previamente purificada de la forma que se describe en II.2.2. Las placas se activaron a  $110^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos y se almacenaron en un desecador, sobre  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ .

La cromatografía se desarrolló colocando la muestra cuidadosamente, disuelta en el disolvente apropiado, sobre la superficie de la lámina con ayuda de un capilar e introduciendo la placa en una cubeta con la adecuada fase móvil. Para facilitar la saturación de la cámara se recubrió, en su parte interna, con una hoja de papel de filtro empapada en la fase móvil.

Se dio por concluido el desarrollo cuando el frente de la fase móvil se hallaba a 2-4 cm de la parte superior de la placa.

#### II.4.6.7. *Reactivos empleados para el revelado de las láminas finas.*

##### II.4.6.7.1. *Reactivos generales.*

a) *Ácido sulfúrico*: se rociaron las placas con una disolución acuosa de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  al 50 % y se expusieron a  $100^\circ\text{C}$  durante 1/2-1 hora.

b) *Reactivo del Iodo*: se rociaron las placas con iodo al 1 % en cloroformo o se colocaron en una cubeta sobresaturada de iodo.

##### II.4.6.7.2. *Reactivos específicos.*

a) *Reactivo de la ninhidrina para pulverizaciones*: se utilizó para detectar los grupos amina y se preparó siguiendo la técnica descrita por WAGNER y col. (1961). Se disolvió la ninhidrina, a una concentración del 0,2 %, en una mezcla de 95 ml. de butanol y 5 ml. de ácido acético al 10 %; las placas pulverizadas se expusieron a  $110^\circ\text{C}$  hasta que se pusieron de manifiesto las manchas (algunos minutos) que adquirieron un color violáceo, demostrativo de los grupos amina.

b) *Reactivo de iodo-ioduro potásico*: este reactivo se empleó para detectar los grupos colina. Se preparó disolviendo iodo, a una concentración del 0,3 %, en una disolución de ioduro potásico al 5 %. Se pulverizaron las placas y se mantuvieron a la temperatura ambiente. Los fosfolípidos con grupos colina adquieren color castaño.

c) *Reactivo del azul de molibdeno*: los ésteres fosfóricos se evidenciaron mediante la modificación de DITTMER y LESTER (1964) de la técnica original de Zinzadze. Las placas se rociaron con una mezcla que contiene un volumen de la disolución I, un volumen de la II y 2 volúmenes de agua.

Disolución I:  $\text{MoO}_3$  al 4,011 % en ácido sulfúrico 25N (es necesario calentar a la llama de un Bunsen para disolver todo el  $\text{MoO}_3$ ).

Disolución II: molibdeno en polvo al 0,365 % en la disolución I. Para disolver todo al molibdeno es necesario calentar.

El reactivo es estable durante meses a la temperatura ambiente. Las manchas que contienen ésteres fosfóricos adquieren de inmediato un color azul.

d) *Reactivo periodato-Schiff*: se empleó para detectar la presencia de hidratos de carbono en los lípidos. Está constituido por (SHAW, 1968):

- disolución acuosa de periodato sódico al 1 %;
- dióxido de azufre, obtenido haciendo reaccionar  $\text{SO}_4\text{H}_2$  con bisulfito sódico.

c) *reactivo de Schiff*: disolución acuosa de para-rosanilina al 1 %, decolorada haciendo burbujear  $\text{SO}_2$  sobre la disolución durante 30-40 minutos.

Las placas, tras el desarrollo de la cromatografía, se rociaron primero con periodato; al cabo de los 10 minutos se eliminó el exceso de periodato mediante  $\text{SO}_2$ . Finalmente, se pulverizaron con el reactivo de Schiff.

Los glicolípidos toman un color azulado que aumenta a medida que pasa el tiempo.

e) *Rodamina 6G*: este reactivo se utilizó para confirmar la existencia de ácidos grasos libres que dan una fluorescencia azul, tras rociar las placas con el reactivo, al exponerlos a la acción de los rayos ultravioleta.

El reactivo se preparó disolviendo rodamina 6G en agua, al 0,005 %.

#### II.4.6.8. *Cromatografía en papel de los productos de hidrólisis de los cerebrósidos y glicosilglicéridos.*

a) *Hidrólisis*: se llevó a efecto sometiendo a  $110^\circ\text{C}$  durante 2 horas, en tubos cerrados a la llama, muestras de los posibles cerebrósidos y glicosilglicéridos en  $\text{ClH}$  2N. Terminada la hidrólisis, las muestras se enfriaron al chorro y se liberaron de  $\text{ClH}$  a presión reducida.

b) *Cromatografía*: la muestra hidrolizada se disolvió en un pequeño volumen de agua destilada y se aplicó sobre dos tiras de papel Whatman n.º 1. La cromatografía se desarrolló en sentido descendente con una fase móvil constituida por n-butanol/

piridina/agua (6/4/3) (v/v/v). Se dio por concluida cuando esta fase había corrido unos 40 cm.

c) *Revelado*: los papeles se secaron en corriente de aire caliente y se revelaron, uno con el reactivo de periodato-Schiff (véase II.4.6.7.2.d) y otro con el reactivo de nitrato de plata (TREVELYAN y col., 1950); para ello, se pasó el papel 1.<sup>o</sup> por una cubeta que contenía 0,5 ml. de una disolución acuosa saturada de nitrato de plata, diluidos en 100 ml. de acetona; a esta disolución se le había añadido agua, gota a gota, hasta redisolver el precipitado 2.<sup>o</sup>) por otra cubeta que contenía 5 ml. de NaOH al 40 % en 100 ml. de etanol y 3.<sup>o</sup>) por un recipiente con tiosulfato sódico al 5 %. El papel se lavó, finalmente, con abundante agua destilada. Los azúcares que contienen grupos reductores adquieren una tonalidad negruzca.

#### II.4.7. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos por cromatografía en fase gaseosa.

##### II.4.7.1. Cromatografía de los ácidos grasos solubles en agua.

Se usaron columnas de vidrio con fase estacionaria constituida por Porapak Q (80-100 mallas) preparadas en el laboratorio siguiendo la técnica de MAHADEVAN y STENROOS (1967). Para ello, se mezcló el Porapak Q con un 2 % de ácido fosfórico del 85 % previamente disuelto en etanol del 70 %. La mezcla se agitó durante 30 minutos y se evaporó después hasta sequedad en roto-vapor; se mantuvo luego una hora en una estufa a 110-120°C para eliminar los restos de etanol y se empaquetó la columna con la mezcla. Las columnas se expusieron finalmente a 220°C en el cromatógrafo durante 12-16 horas.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo a efecto en las siguientes condiciones:

Nitrógeno (gas portador) a un flujo de 60 ml./min.; flujo de aire: 500 ml./min.; flujo de hidrógeno: 60 ml./min.; Velocidad de la carta: 5 mm./min.; temperatura de la columna: 212°C; bloque de inyección: 275°C; detector de llama: 280°C.

##### II.4.7.2. Metilación de los ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos libres fueron metilados con diazometano, por el procedimiento descrito por SCHLENK y GALLERMAN (1960), para lo que se usaron los siguientes reactivos:

—Reactivo de M.N.S.A. (n-metil-n-nitroso-paratoluensulfonamida. Se preparó disolviendo 2 mmoles de M.N.S.A. por mequivalente de ácido graso a metilar en 1 ml de éter etílico libre de peróxidos.

—Disolución de carbitol, preparada mezclando 0,7 ml de carbitol con 0,7 ml. de éter etílico y 1 ml. de KOH al 60 %.

—Éter etílico-metanol (9/1).

Se distribuyeron los reactivos en los lugares apropiados del dispositivo de

Schlenk y Gallerman (figura II.7); se hizo pasar por el sistema una corriente de nitrógeno con un flujo de 6 ml/min. El diazometano se desprendió al ponerse en contacto el reactivo de M.N.S.A. con el carbitol. El diazometano, arrastrado por la corriente de nitrógeno, saturó el éter y se le hizo circular por el tubo en forma de W que se representa en la figura. El diazometano burbujeó en el tubo de ensayo final donde estaba colocada la muestra de los ácidos grasos, disuelta en 3 ml. de éter etílico-metanol (9/1).

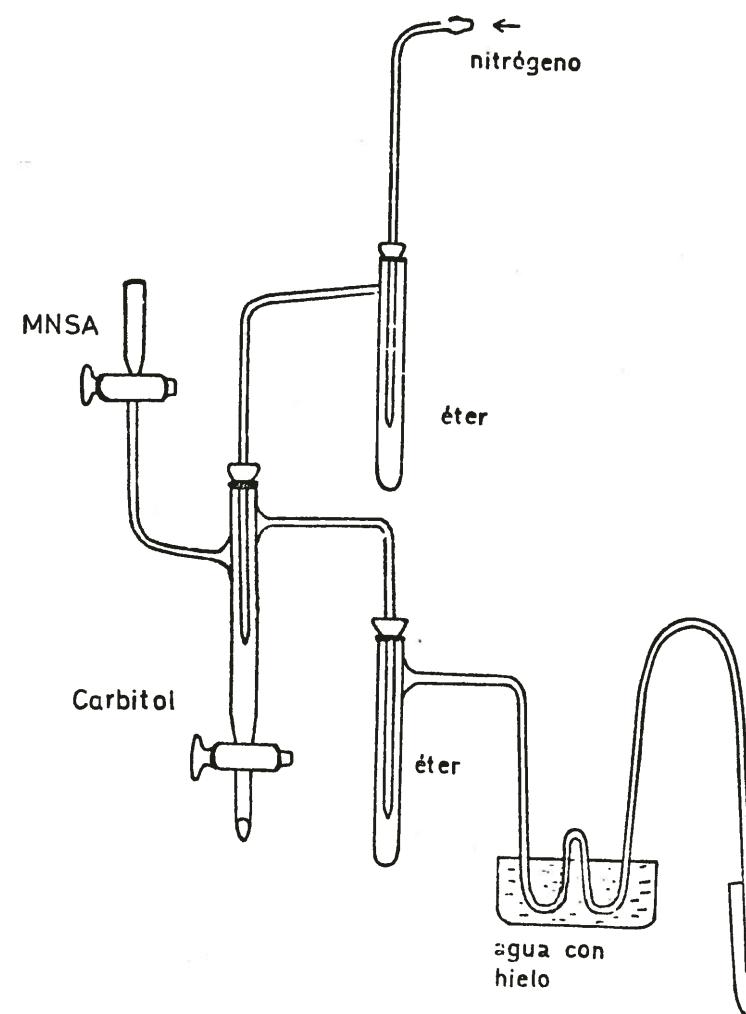


Figura II.7: Dispositivo empleado en la metilación de los ácidos grasos libres, siguiendo el procedimiento de Schlenk y Gallerman (1960).

La metilación se dio por concluida cuando el diazometano en exceso confirió un color amarillo al éter donde estaba disuelta la muestra.

#### II.4.7.3. *Transesterificación de los ácidos grasos esterificados.*

Para la formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos que forman parte de los glicéridos y lípidos polares, se utilizó el método de transesterificación de SHEATA y col. (1970).

Se disolvió alrededor de 1 mg. de la muestra en un disolvente apropiado y se depositó en el fondo de un tubito de  $30 \times 3$  mm; el disolvente se evaporó bajo corriente de nitrógeno. Con una micropipeta se añadieron  $25 \mu$  l. del reactivo de metilato sódico recientemente preparado (1,5 ml. de metilato sódico 0,5N en metanol, mezclados con 6 ml. de éter de petróleo y 2,5 ml. de éter etílico deshidratado y libre de peróxidos) y se tapó rápidamente el tubo; se agitó intensamente para conseguir una mezcla perfectamente homogénea. Al cabo de 2-3 minutos se añadieron  $25 \mu$  l. de éter de petróleo (de 40-60°C). Se mantuvo unos minutos a la temperatura ambiente y se procedió a la inyección en el cromatógrafo de gases.

#### II.4.7.4. *Cromatografía de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.*

Se emplearon columnas de vidrio, llenadas con dietilenglicol-succinato sobre Cromosorb (80-100 mallas) lavado al ácido y tratado con hexametildisilazano, suministradas por Pekin-Elmer.

Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes:

Gas portador nitrógeno a un flujo de 35 ml./min; flujo de aire: 300 ml./min; flujo de hidrógeno: 32 ml./min.; velocidad de la carta: 5 mm./min.; programa de temperatura: 50-180°C, con un incremento de 8°C/min; bloque de inyección: 215°C; detector de llama: 210°C.

#### II.4.7.5. *Identificación de los ácidos grasos.*

La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo basándose en sus tiempos de retención (o los, de los ésteres metílicos cuando fueron así cromatografiados) a cuyo efecto se compararon con patrones apropiados suministrados por BDH o Merck.

#### II.4.8. *Identificación del colesterol.*

Se basó:

- A) En el  $R_f$  y comportamiento frente al reactivo de  $SO_4H_2$ , en las láminas finas.
- B) En el tiempo en que las muestras tardan en desarrollar su color máximo

frente al reactivo de Liberman-Burchard (véase II.4.9.3.). Para ello, se fueron tomando muestras a lo largo del tiempo y leyendo su extinción a  $620 \text{ m}\mu$ .

C) En los tiempos de retención de la fracción esteroles (aislada por cromatografía en lámina fina) sometida a cromatografía líquido-gas. Para ello, se usaron columnas de vidrio, llenadas con SE-30 al 1% sobre Gas-Chrom Q (80-100 mallas). Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes: Gas portador nitrógeno a un flujo de 95 ml./min.; flujo de aire: 200 ml./min.; flujo de hidrógeno: 90 ml./min.; bloque de inyección: 230°C; detector de llama: 235°C; temperatura de las columnas: 211°C.

#### II.4.9. *Cuantificación de los distintos componentes lipídicos caracterizados.*

##### II.4.9.1. *Ácidos grasos libres.*

Se llevó a efecto basándose en los cromatogramas gas-líquido, teniendo en cuenta el principio de que los pesos de cada uno de los ácidos grasos identificados son proporcionales a las áreas de sus picos en el registro gráfico. Cuando fue necesario operar con atenuaciones diferentes, se tuvo en consideración el factor atenuación. En todos los casos, se comparó el área de cada pico con la de cantidades conocidas del oportuno patrón. Así se obtuvo el % (en peso) de cada ácido graso de la muestra cromatografiada sobre el total de los ácidos grasos presentes en la misma.

El dato % en peso de los distintos ácidos grasos en muestras de ácidos grasos libres purificados por lámina fina permitió calcular el peso molecular del ácido graso libre medio, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{P. m. de ácido graso medio} = \frac{100}{\sum \% \text{ (en peso) / p. m.}}$$

Una alícuota del total de lípidos polares se disolvió en una mezcla, previamente neutralizada, en benceno-etanol (1/1) (v/v) y se tituló con una disolución acuosa de NaOH 0,01 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

##### II.4.9.2. *Triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, hidrocarburos y glicosilglicéridos.*

Se efectuó por pesada.

##### II.4.9.3. *Colesterol.*

Se llevó a efecto por la técnica descrita por MOORE y BAUMMAN (1952), utilizando el reactivo de Liebermann-Burchard, anhídrido acético redestilado-ácido sulfúrico del 95,5% (19/1) (v/v). Se añadieron 4 ml. del reactivo de Liebermann-

Burchard a la muestra disuelta en 2 ml. de ácido acético. Se introdujeron los tubos en un baño de agua a 25°C, durante exactamente 30 minutos y se leyó su extinción a 620 m $\mu$  contra un blanco de ácido acético. Las lecturas se refirieron a una curva patrón elaborada con colesterol a diferentes concentraciones, en el rango 0,2-1,2 mg (figura II.8).

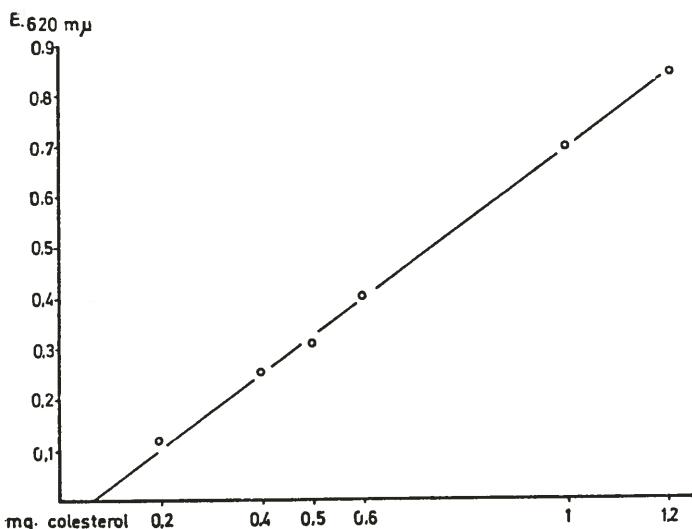


Figura II.8: Gráfica patrón para las determinaciones de colesterol por el método de Moore y Baumman (1952).

#### II.4.9.4. Fosfolípidos y cerebrósidos.

Se cuantificaron sobre la base del contenido en nitrógeno de las muestras purificadas por lámina fina y el peso molecular medio de la molécula correspondiente, calculado teniendo en cuenta su estructura y el peso molecular medio de sus ácidos grasos (véase II.4.9.1.).

#### II.4.10. Ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor.

La medida del total de ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor constituye uno de los procedimientos más frecuentes de determinar el grado de maduración de los quesos. Los arrastres en corriente de vapor se ven muy considerablemente afectados por los detalles de la técnica utilizada. A continuación se describe la empleada a lo largo de esta tesis, en la que se han identificado y cuantificado, además, los componentes de esta fracción de ácidos grasos.

##### II.4.10.1. Destilación.

La destilación de ácidos grasos se efectuó basándose en la técnica descrita por DIXON y DEMAN (1968). Se pesaron alrededor de 40 gr. de cuajada ó 15 de queso. Se trituraron en un mortero con una pequeña cantidad de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> al 10 % hasta formar una emulsión completa. Se transfirió la emulsión a un matraz de 500 ml. El mortero se lavó con más SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> al 10 %, hasta totalizar una cantidad de ácido sulfúrico de 50 ml. (incluido el usado para formar la primera emulsión). Se añadieron unos 35 gr. de SO<sub>4</sub>Mg, unas perlas de vidrio y 250 ml. de agua. El matraz se conectó a un aparato de destilación de Reichert-Meissl, conforme a las especificaciones de la AOAC (Official Methods of Analysis) (p. 364, 9.<sup>a</sup> ed.).

Se destiló hasta recoger 280 ml. ajustando el ritmo de destilación de modo que la operación se completara en 55-60 minutos.

Sobre la boca del matraz en que se recogió el destilado se colocó un embudo con un papel Whatman n.<sup>o</sup> 2; el extremo inferior del condensador se hizo contactar con el papel de filtro.

Se consideraron como ácidos grasos libres solubles en agua los que pasaron a través del papel Whatman. Los ácidos grasos libres insolubles en agua quedaron depositados sobre el mismo y a lo largo del condensador; se recogieron lavando el condensador con sucesivos volúmenes de alcohol etílico (15 ml.), y colocando el extremo del condensador sobre el papel de filtro, para lavar éste también. Se completó así un volumen total de lavado de 50 ml.

##### II.4.10.2. Titulación y saponificación.

###### A) Ácidos grasos solubles:

Inmediatamente después de la destilación, se titularon los ácidos grasos solubles con una disolución valorada de NaOH 0,1 N, usando fenolftaleína como indicador. Las sales formadas, disueltas en agua, se pasaron a un matraz, que se conectó a un roto-vapor y se concentraron hasta un volumen de unos 8 ml., que se transfirieron al tubo diseñado por DIXON y DEMAN (1968). En él se evaporaron hasta sequedad en baño de vapor y corriente de nitrógeno. Se tapó herméticamente el tubo y se conservó a -15, -20°C hasta su empleo.

###### B) Ácidos grasos insolubles:

Después de la recogida, se titularon con NaOH 0,1 N, descontando del título, el correspondiente al etanol. Una vez efectuada la titulación, se concentraron las jabones hasta sequedad en baño de vapor y corriente de nitrógeno y se conservaron en el mismo matraz a -15, -20°C hasta su análisis.

II.4.10.3. *Preparación de la muestra para el análisis cromatográfico de los ácidos grasos solubles e insolubles.*

A) *Ácidos grasos solubles:*

Los ácidos grasos componentes de los jabones conservados en el tubo de Dixon y deMan se disolvieron en una pequeña cantidad de agua conocida (entre 0,6 y 1 ml.). Se cerró herméticamente el tubo que se mantuvo así hasta el final de los análisis.

Los ácidos grasos se liberaron mediante una hidrólisis ácida, con ácido fosfórico al 85 % que se introdujo a través del tapón del tubo de Dixon y deMan con ayuda de una jeringa. La cantidad exacta de ácido fosfórico a utilizar se calculó teniendo en cuenta el título experimentalmente determinado del ácido fosfórico y el NaOH empleado para saponificar los ácidos grasos. Fue necesario añadir entre 0,05 ml. y 0,15 de ácido fosfórico, según el volumen de las muestras analizadas. La fenolftaleína que acompañaba a los jabones sirvió, en cualquier caso, de indicador. Se agitaron luego los tubos enérgicamente durante 5-10 minutos, etapa que resulta fundamental para la completa liberación de los ácidos grasos (DIXON y DEMAN, 1968).

Parte de los ácidos grasos no se disolvieron en el agua, sin duda, por hallarse a saturación y quedaron sobrenadando.

Una alícuota de la fracción acuosa se inyectó en el cromatógrafo equipado como se describe en II.4.7.1. El resto se extrajo (4 veces) con éter etílico libre de peróxidos, en un tubo de vidrio con tapón esmerilado y se procedió a metilar sus ácidos grasos por el procedimiento del diazometano (véase II.4.7.2).

B) *Ácidos grasos insolubles:*

Las sales sódicas formadas en la titulación de los ácidos grasos insolubles se disolvieron en unos 20 ml. de agua destilada; la disolución se acidificó luego con ClH 2N, al rojo congo y se extrajo 3 veces con un volumen igual de éter etílico libre de peróxidos. La disolución etérea se concentró hasta un volumen final de 4 ml. y se procedió a su metilación con diazometano (véase II.4.7.2).

II.4.11. *Determinación de la relación molar de los glicosilglicéridos.*

II.4.11.1. *Determinación de glucosa.*

Se efectuó siguiendo el método que a continuación se describe, basado en el de DUBOIS y col. (1956): a 2 ml. de una disolución acuosa del hidrato de carbono se le añadió otro ml. de fenol al 5 %; luego se le adicionaron, rápidamente, 5 ml. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  del 95,5 %, de densidad 1,84 (Merck). La mezcla se dejó a la temperatura ambiente durante 10 minutos y se expuso luego, durante 20 minutos, al baño maría (25-30°C).

Se leyó la extinción a 490 m $\mu$  y las lecturas se refirieron a una curva patrón confeccionada con glucosa (figura II.9).

II.4.11.2. *Determinación de glicerol.*

Se realizó siguiendo, en esencia, el método de HANAHAM y OLLEY (1958): a 1 ml. de una disolución acuosa de glicerol se le añadió primero una gota de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  10 N. y luego 0,2 ml. de periodato sódico 0,1 M. Despues de 5 minutos a la temperatura ambiente se le añadieron 0,2 ml de una disolución acuosa al 10 % de  $\text{S}_2\text{O}_5\text{Na}_2$  y 5 ml del reactivo de ácido cromotrópico (1 volumen de una disolución acuosa al 1 % de ácido cromotrópico —sal disódica— y 4,5 volúmenes de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  24 N.). La mezcla se calentó durante 30 minutos en un baño de agua hirviendo. Posterior-

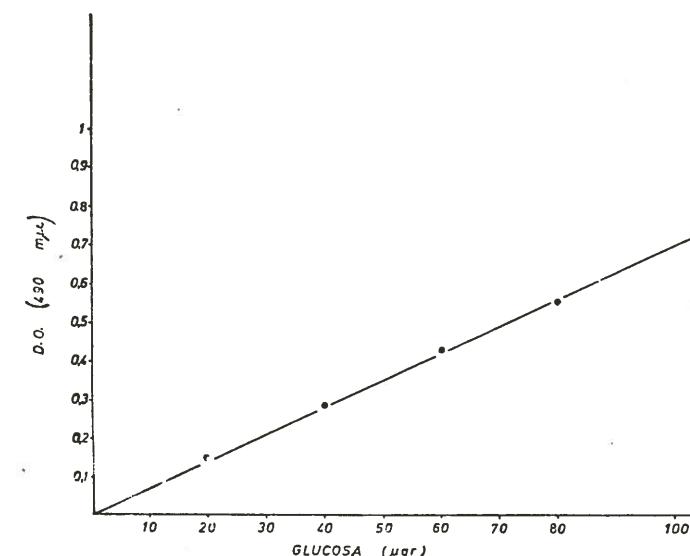


Figura II.9: Gráfica patrón para las determinaciones de glucosa por el método de Dubois y col. (1956).

mente, se enfrió y se le añadieron 0,2 ml de tiourea a semisaturación. Finalmente, se agitaron los tubos enérgicamente y se leyó la extinción a 570 m $\mu$ , refiriendo las lecturas a una curva patrón construida con glicerol (figura II.10).

La relación molar entre el glicerol y la glucosa se estableció teniendo en cuenta los resultados de las determinaciones anteriores y los respectivos pesos moleculares de la glucosa y glicerol.

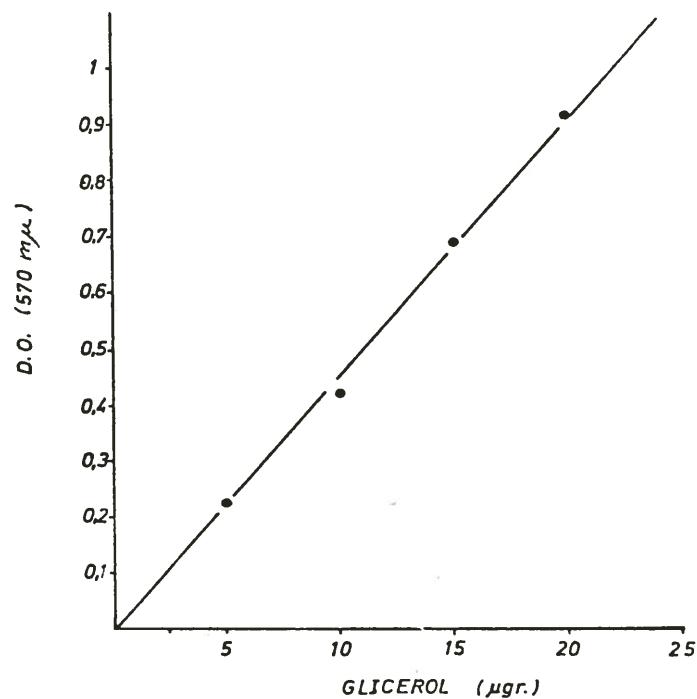


Figura II.10: Gráfica patrón para las determinaciones de glicerol por el método de Hanaham y Olley (1958).

## CAPITULO III

### RESULTADOS

#### III.1. *Flora microbiana de la leche y el queso y evolución de la misma a lo largo del proceso de maduración.*

Los estudios que se recogen en este apartado están encaminados al esclarecimiento de la flora más significativa de la leche utilizada para la fabricación del queso por procedimientos artesanos, y de las modificaciones experimentadas por la misma a lo largo de la maduración del queso con el objeto de diseñar un cultivo láctico que permita la fabricación de un producto con características similares, a partir de leche pasterizada.

Para ello, fue preciso ponerse de acuerdo con dos fabricantes a pequeña escala, de queso tipo «Ulloa» a partir de leche cruda, de gran reputación por la alta calidad de sus productos y una explotación ganadera de gran tamaño con una fábrica de quesos y facilidades para la pasterización de la leche, todos ellos localizados en la provincia de Lugo.

#### III.1.1. *Flora de la leche. Recuentos.*

Se tomaron muestras representativas de las leches utilizadas por los fabricantes de queso a partir de leche cruda, que habían sido obtenidas por ordeño manual y de la explotación ganadera que se obtuvo por procedimientos mecánicos.

Se efectuaron en el lugar de origen recuentos de las muestras en Agar Elliker (medio muy favorable para el desarrollo de los gérmenes lácticos), en Agar Rogosa (medio selectivo para lactobacilos), en Agar mEnterococcus (medios selectivo para enterococos) y en Agar para recuento en placa de Difco, como medio para el recuento total.

El tiempo transcurrido entre el ordeño y las siembras no fue, en ningún caso, superior a las tres horas.

Los resultados obtenidos (gérmenes/ml. de leche), así como los valores del pH en el momento de la toma de muestras para los análisis bacteriológicos se expresan en la tabla III.1. Las muestras 1 y 2 corresponden a las leches ordeñadas manualmente y la 3 a la obtenida por procedimientos mecánicos en la explotación ganadera.

Los recuentos obtenidos de la muestra número 3 y en los medios Elliker y de Recuento total manifiestan una mayor proliferación en ellos, de los gérmenes lácticos, corroborada por las medidas de pH.

Sin embargo, el recuento en Agor m-Enterococcus refleja, sin duda, una mayor higiene en la obtención de la leche (por métodos mecánicos).

TABLA III.1

Recuentos de la leche utilizada por los fabricantes de queso «Ulloa» para la elaboración de sus productos sin pasterización previa (1 y 2) y de la leche obtenida en una explotación ganadera de gran tamaño (3)

MUESTRAS	1	2	3
pH Leche	6,7	6,7	6,6
Rec. A. Elliker	$1,28 \times 10^6$	$1,10 \times 10^5$	$3,23 \times 10^6$
Rec. A. Rogosa	$4,50 \times 10^3$	$3,00 \times 10^3$	$2,40 \times 10^2$
Rec. A. mEnterococcus	$1,08 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$7,00 \times 10^3$
Rec. total	$2,30 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$

Los resultados se expresan en gérmenes / ml de leche.

### III.1.2. Identificación de los gérmenes responsables de los recuentos.

#### III.1.2.1. Agar Elliker: género *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*.

Aunque es frecuente admitir que los recuentos en Agar Elliker al cabo de 2 días a 32°C están enteramente constituidos por la flora láctica (DEMETER, 1969), las observaciones microscópicas y el test de la catalasa revelaron la existencia adicional de cocos Gram positivos, catalasa positivos y, por ello, se tomaron 30 colonias (5-10 de cada tipo morfológico) de cada una de las placas con aproximadamente un centenar; se aislaron y propagaron en tubos inclinados de Agar Elliker y se sometieron a la tinción de Gram y a la prueba de la catalasa.

En la tabla III.2 se muestran los porcentajes que del recuento en Agar Elliker representan los cocos Gram positivos, catalasa positivos y los Gram positivos, catalasa negativos (estreptococos lácticos).

Una vez más, los resultados reflejan las superiores condiciones higiénicas en la obtención de la leche de la muestra número 3.

TABLA III.2.

Porcentaje de los cocos Gram +, catalasa + y — de las tres muestras de leche

Muestra	Catalasa +	Catalasa —
1	33,33	66,66
2	25,92	74,07
3	0,00	100,00

Los cocos Gram positivos, catalasa positivos se sometieron a la prueba de fermentación de la glucosa en anaerobiosis; aquellos en los que fue positiva se encuadraron en el género *Staphylococcus* y los que dieron resultados negativos se consideraron como *Micrococcus*.

En la tabla III.3 se expresan los porcentajes de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* respecto al total de los cocos Gram positivos, catalasa positivos en cada muestra de leche.

TABLA III.3

Porcentaje de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* respecto al total de cocos Gram positivos, catalasa positivos

Muestra	<i>Staphylococcus</i>	<i>Micrococcus</i>
	1	62,49
2	57,13	42,86
3	0,00	0,00

Los cocos Gram positivos, catalasa negativos se clasificaron como pertenecientes al género *Streptococcus*, grupo N de Lancefield; todas las colonias catalasa negativas manifestaron las siguientes características: cocos Gram positivos, catalasa negativos, crecimiento a 10°C pero no a 45°C, reducción del tornasol antes de coagular la leche, falta de crecimiento a pH 9,6 o en presencia de ClINA al 6,5 %.

Se clasificaron en especies basándose en su crecimiento a 40°C y en su comportamiento frente a la reacción de Voges-Proskauer (negativo en todos los casos) y en la producción de NH<sub>3</sub> a partir de la arginina (positiva en unas cepas que proliferaron además a 40°C y fueron, por tanto, identificadas como *Streptococcus lactis* y negativa en otras que además no crecieron a 40°C, identificadas como *Streptococcus cremoris*).

En la tabla III.4 se muestran los porcentajes de *S. lactis* y *S. cremoris* respecto al total de estreptococos lácticos.

TABLA III.4

Porcentaje de *S. lactis* y *S. cremoris* en la flora perteneciente al género *Streptococcus*, grupo N de Lancefield.

Muestra	<i>S. lactis</i>	<i>S. cremoris</i>
	1	62,50
2	55,00	45,00
3	66,66	33,33

En la tabla III.5 se recoge la contribución de los distintos gérmenes identificados al recuento en Agar Elliker.

TABLA III.5

Porcentaje de los distintos gérmenes identificados en Agar Elliker

Muestra	<i>S. lactis</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> spp.
1	41,66	24,99	12,50	20,83
2	40,73	33,33	11,11	14,81
3	66,66	33,33	00,00	00,00

Se observa claramente el predominio de los gérmenes lácticos sobre los micrococos y estafilococos, sobre todo en la muestra número 3 que fue ordeñada y conducida a la sala de recepción por métodos mecánicos.

### III.1.2.2. Agar Rogosa: Lactobacilos.

De 5 a 10 cepas de cada tipo morfológico observado en las placas de Agar rocosa se propagaron en caldo Rogosa y se sometieron a las pruebas pertinentes para la identificación de las especies, de acuerdo con las normas de ROCOSA y SHARPE (1959) y se clasificaron con arreglo al criterio de ORLA JENSEN (1943).

Todas las cepas procedentes de las tres muestras respondieron a las siguientes características: formas bacilares, Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativas, no productoras de gas a partir de la glucosa. Se identificaron por tanto, como pertenecientes al género *Lactobacillus*, grupo homofermentativo.

Todas las cepas aisladas crecieron abundantemente a 15°C y no crecieron o lo hicieron pobremente a 45°C. Se clasificaron pues, dentro del grupo *Streptobacterium* de Orla Jensen.

Todas las cepas fermentaron también la glucosa con producción de ácido, lactosa, melecitosa, arabinosa, sacarosa, melibiosa y celobiosa. Se identificaron por tanto, como *Lactobacillus plantarum*.

### III.1.2.3. Agar mEnterococcus: Enterococos.

Las colonias que crecieron en Agar mEnterococcus se aislaron y propagaron en Agar triptosa y se sometieron a las pruebas oportunas para la identificación de especies, de acuerdo con las normas de SHERMAN (1937) y THATCHER y CLARK (1968).

Todas las cepas aisladas a partir de este medio ofrecieron las siguientes características: forma cocoide, Gram positivas, catalasa negativas, crecieron bien a 10°C y 45°C y en presencia de ClNa al 6,5 %, proliferaron a pH de 9,6 y redujeron el tornasol antes de coagular la leche. Se incluyeron por tanto, dentro del grupo fisiológico *Enterococcus*, pertenecientes al grupo serológico D de Lancefield.

Se identificaron las especies presentes basándose en las pruebas de fermentación de sorbitol, manitol, arabinosa, melibiosa y melecitosa; crecimiento en caldo

triptosa con 0,05 % de telurito potásico; reducción del cloruro de 2, 3, 4 trifénil tetrazolio; coagulación y reducción de la leche tornasolada e hidrólisis de la gelatina.

Se observaron dos grupos de colonias, A y B, cuyas características y porcentaje que representan del total de enterococos se indican en la Tabla III.6.

TABLA III.6

Identificación y porcentaje de las cepas de Enterococos aisladas a partir de las muestras de leche analizadas

Cepas	% del total	Características						Identificación		
		sorbitol	manitol	arabinosa	melecitosa	melibiosa	T. F. T. A.	Telurito	gelatina	
A	57	—	± (1)	±	+	± (2)	—	—	—	<i>S. faecium</i> .
B	43	+	+	—	—	±	+	+	+	<i>S. faecalis</i> , <i>v. liquefaciens</i>

(1): ±, la mayoría dieron un resultado positivo frente a la prueba.

(2): —, la mayoría dieron un resultado negativo frente a la prueba.

Las colonias tipo A se identificaron como *Streptococcus faecium* y las tipo B como pertenecientes a la especie *Streptococcus faecalis*. Todas las cepas identificadas como *S. faecalis* reducían el tornasol, producían ácido a partir de la lactosa y coagulaban la leche con separación del suero e hidrolizaban la gelatina; se consideraron por tanto, como cepas pertenecientes a la variedad *liquefaciens* de *S. faecalis*.

### III.1.3. Evolución de la flora más significativa en el queso.

Con las mismas partidas de leche de las que se tomaron las muestras para los análisis microbiológicos descritos en III.1.1, se fabricaron sendos lotes de quesos. Periódicamente se fueron retirando muestras (unos 150 grs. de cada uno de tres quesos) de cada fabricante que tras su mezcla a partes iguales por homogeneización, se sometieron al mismo esquema de análisis microbiológicos señalado para la leche; se determinó también el pH con electrodos de punción (mcd. K 4011 de «Radiometer»).

La evolución de la flora se recoge en las tablas III.7 y III.8 y en las gráficas III.1 y III.2. Los resultados se expresan en ger/ml. (para la leche) y en ger/gr. (para el queso).

De las tablas III.7 y III.8 y gráficas III.1 y III.2 se deduce que tanto el recuento total como los lactobacilos, enterococos y los gérmenes que crecen en Agar Elliker, aumentan bruscamente en las primeras 24 horas para seguir proliferando luego con más lentitud.

TABLA III.7

Evolución de la flora microbiana en el queso elaborado por el fabricante N.º 1, a lo largo de la maduración

DIAS	Leche (1)		Queso (2)		
	1	7	14	25	
Rec. A. Rogosa	$3,00 \times 10^4$	$4,10 \times 10^5$	$7,10 \times 10^5$	$8,30 \times 10^5$	$2,80 \times 10^6$
Rec. A. Elliker	$1,28 \times 10^6$	$9,26 \times 10^7$	$3,18 \times 10^8$	$2,68 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$
Rec. A. mEntero- rococcus	$5,80 \times 10^5$	$1,60 \times 10^7$	$4,90 \times 10^7$	$9,20 \times 10^7$	$1,10 \times 10^8$
Rec. total	$9,00 \times 10^5$	$6,70 \times 10^7$	$4,50 \times 10^8$	$3,74 \times 10^8$	$4,00 \times 10^8$
pH	6,7	6,0	6,0	5,9	5,4

(1): Los resultados de los recuentos se expresan en gérmenes/ ml. de leche.

(2): Los resultados de los recuentos se expresan en gérmenes/ gr. de queso.

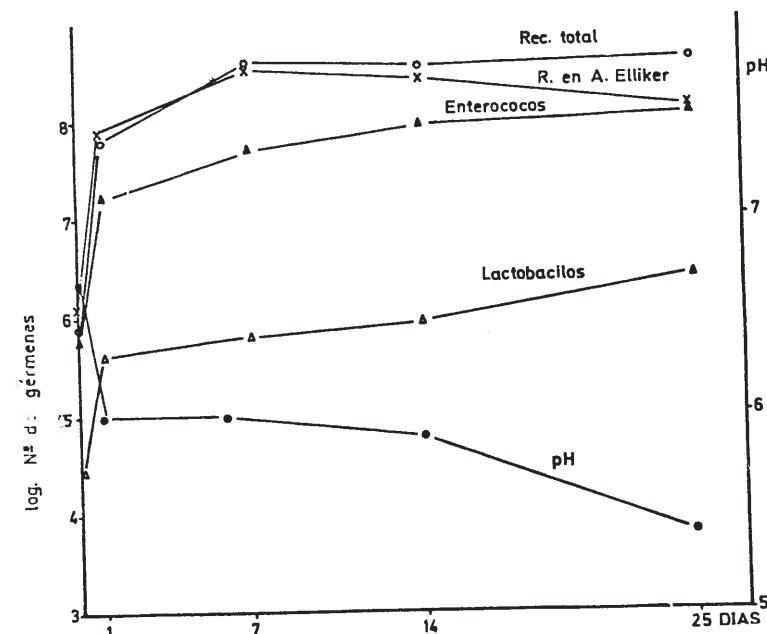


Figura III.1: Evolución de la flora microbiana en el queso elaborado por el fabricante N.º 1, a lo largo de la maduración.

TABLA III.8

Evolución de la flora microbiana en el queso elaborado por el fabricante N.º 2, a lo largo de la maduración

DIAS	Leche (1)		Queso (2)		
	1	7	14	25	
Rec. A. Rogosa	$3,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^4$	$2,19 \times 10^4$	$1,73 \times 10^5$	$3,00 \times 10^6$
Rec. A. Elliker	$9,60 \times 10^4$	$1,33 \times 10^7$	$2,00 \times 10^8$	$1,05 \times 10^8$	$3,36 \times 10^8$
Rec. A. mEntero- rococcus	$5,00 \times 10^4$	$1,80 \times 10^6$	$1,20 \times 10^7$	$1,76 \times 10^7$	$3,20 \times 10^7$
Rec. total	$8,80 \times 10^4$	$3,10 \times 10^7$	$1,53 \times 10^8$	$1,25 \times 10^8$	$8,65 \times 10^8$
pH	6,8	6,4	6,4	6,0	5,5

Los resultados de los recuentos se expresan en gérmenes/ ml. de leche.

Los resultados de los recuentos se expresan en gérmenes/ gr. de queso.

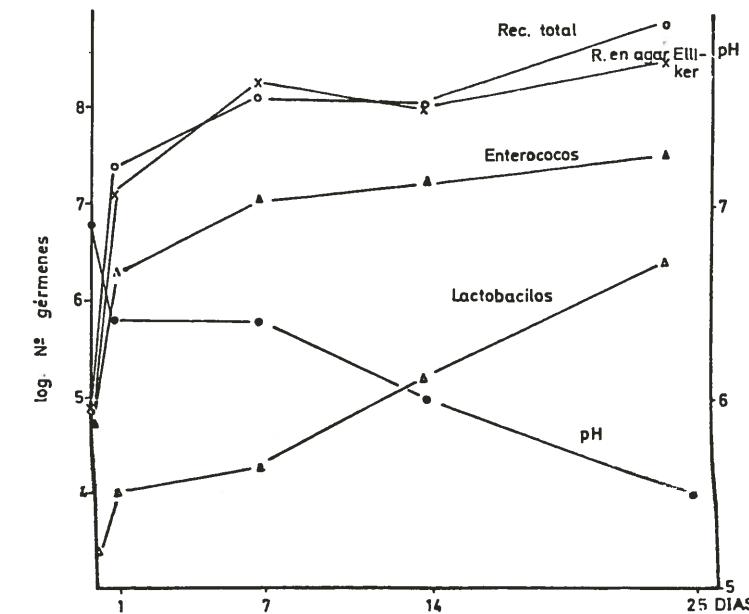


Figura III.2: Evolución de la flora microbiana en el queso elaborado por el fabricante N.º 2, a lo largo de la maduración.

De la casi superposición de las gráficas que representan la evolución de la flora total y los recuentos en Agar Elliker, excepto en los últimos nueve días, se infiere que la mayor parte de la flora del queso está constituida, en los primeros días, por los gérmenes que crecen en Agar Elliker. En los últimos nueve días el ligero aumento del recuento total sobre los gérmenes presentes en Agar Elliker se debe, sin duda, al incremento experimentado por los lactobacilos y enterococos.

El pH sigue, igualmente, un curso similar en ambas muestras, estabilizándose en 6,6,2 hasta que los lactobacilos alcanzan cifras considerables, descendiendo después hasta un valor en torno a 5,5 ml final del proceso (25 días).

### III.1.3.1. Evolución de los Micrococos y Estafilococos (cocos Gram positivos, catalasa positivos) y de los estreptococos lácticos (Gram positivos, catalasa negativos).

Los gérmenes que crecieron en Agar Elliker, al igual que en las muestras de leche, como se indica en III.1.2.1, se separaron en dos grupos.

- 1) Cocos Gram positivos, catalasa positivos.
- 2) Cocos Gram positivos, catalasa negativos.

En los gérmenes lácticos (catalasa negativos) se diferenció el *S. lactis* del *S. cremoris* por la capacidad de aquel de producir NH<sub>3</sub> de la arginina y crecer a 40°C.

En la tabla III.9 se recogen los porcentajes que *S. lactis* y *S. cremoris* representan respecto del total de estreptococos lácticos.

**TABLA III.9**  
Porcentaje de *S. lactis* y *S. cremoris* a lo largo de la maduración del queso elaborado por el fabricante núm. 2

DIAS	1	7	14	25
<i>S. lactis</i> %	66,66	60,00	80,00	60,00
<i>S. cremoris</i> %	33,33	40,00	20,00	40,00

Al igual que ocurría en las muestras iniciales de leche, el *S. lactis* se encuentra siempre dominando sobre el *S. cremoris*.

En esta fase del trabajo se estudió conjuntamente la evolución de todos los cocos Gram positivos, catalasa positivos sin distinguir entre los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*.

La tabla III.10 y figura III.3 recogen la evolución de todos los cocos Gram positivos, catalasa positivos y negativos que crecen en Agar Elliker.

Del análisis de la tabla III.10 y de la gráfica III.3, se deduce que los cocos Gram positivos, catalasa positivos que crecen en Agar Elliker, van disminuyendo

**TABLA III.10**

Porcentaje de los gérmenes que crecieron en Agar Elliker, a lo largo de la maduración

DIAS	1	7	14	25
Catalasa + (%)	70,00	47,35	12,00	0,00
Catalasa — (%)	30,00	52,63	88,00	100,00
<i>S. lactis</i> %	19,99	31,58	70,40	60,00
<i>S. cremoris</i> %	9,99	21,05	17,60	40,00

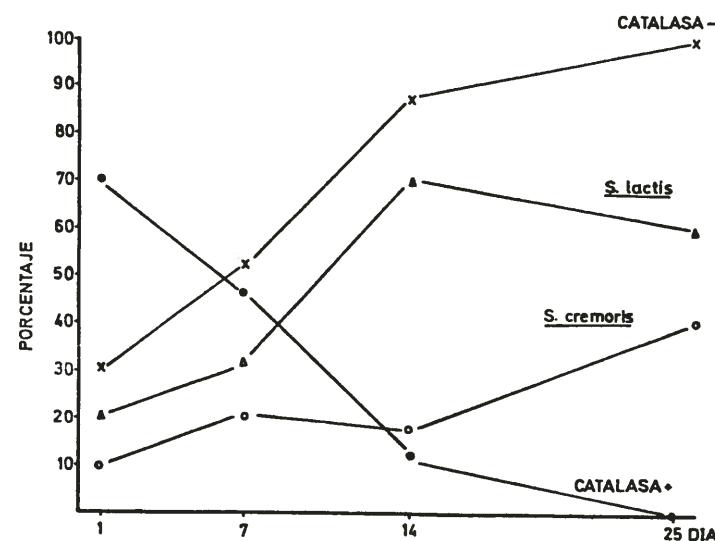


Figura III.3: Evolución de la flora que creció en Agar Elliker, a lo largo de la maduración.

progresivamente y, al final de la maduración, la flora que crece en este medio, está constituida exclusivamente por los gérmenes lácticos (Gram positivos, catalasa negativos).

### III.1.3.2. Identificación de los gérmenes pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*.

Cuarenta cepas elegidas al azar de las clasificadas en cada uno de estos géneros, procedentes en su mitad de la leche y otras tantas de los quesos de 1 y 7 días, se sometieron a las pruebas pertinentes para su identificación (véase II.3.10.3.b).

Ninguna cepa del género *Staphylococcus* produjo ácido a partir del manitol, ni dio positiva la prueba de la coagulasa. Se identificaron como *Staphylococcus epidermidis* y se encuadraron en los grupos II y IV de la clasificación de BAIRD-PARKER (1963 y 1965).

El comportamiento de las cepas del género *Micrococcus* frente a las pruebas de fermentación de azúcares y manitol y los restantes tests realizados fue diverso, permitiendo clasificarlas en cuatro grupos que responden según se indica en la tabla III.11.

TABLA III.11

Respuestas frente a las pruebas que se expresan de las diferentes cepas aisladas del género. *Micrococcus*

GRUPO	1	2	3	4	5
Catalasa	+	+	+	+	+
Ácido de la glucosa					
1) Anaerobiosis	—	—	—	—	—
2) Aerobiosis	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	—	+	—	—	—
Nitratos a nitritos	+	+	—	—	—
Util. fosf. amón. in.	+	—	—	—	—
Hidrólisis gelatina	+	—	—	—	—
Fosfatasa	—	—	±	±	—
Producción ácido de:					
Arabinosa					
Lactosa	—	—	—	—	—
Maltosa	+	+	—	±	—
Manitol	—	—	—	—	+
Color colonias	—	—	—	—	—
	Amarillo	Blanquecina	Rosadas	Blanquecina	Blancas

±: Resultado variable.

Sólo dos de estos grupos, el 3 y 5, coinciden en las propiedades con algunos de los señalados por BAIRD-PARKER (1963 y 1965) (grupos 3 y 7, respectivamente de Cohn), que de acuerdo con el citado autor, serían sinónimos de *Micrococcus roseus* y *Micrococcus luteus*; conviene señalar sin embargo, que el grupo 5 de las cepas aquí aisladas no es pigmentado.

### III.1.3.3. Naturaleza de la flora del queso que crece en Agar Rogosa.

Se procedió como con las muestras de leche. Todas las cepas aisladas respondieron a las siguientes características: bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, no productores de gas a partir de la glucosa. Se clasificaron pues, como lactobacilos homofermentativos.

Todas las cepas crecían abundantemente a 15°C y no proliferaban o sólo pobemente a 45°C; se clasificaron por tanto, como pertenecientes al grupo *Streptobacterium* de Orla Jensen (1943).

Todos los bacilos ofrecían unas dimensiones comprendidas entre 2-3,5 × 0,8-1 micras, se asociaban de forma más frecuente en parejas y producían ácido a partir de la lactosa, melicitosa, arabinosa, sacarosa, melibiosa y celobiosa. Se identificaron pues, como *Lactobacillus plantarum*.

Como quiera que ni en la leche de origen ni en ninguna de las muestras de queso fue posible identificar en la flora que crece en Agar Rogosa otra especie que el *Lactobacillus plantarum*, la evolución de la tasa de este germen es la que en las tablas III.7 y III.8 y figuras III.1 y III.2 aparece bajo el epígrafe: «recuento en Agar Rogosa».

### III.1.3.4. Identificación de los gérmenes del queso que crecieron en Agar mEnterococcus.

De la misma forma que se hizo en las muestras de leche, se tomó un número adecuado de las colonias que crecieron en Agar mEnterococcus, se aislaron y propagaron en Agar triptosa y se sometieron a las pruebas oportunas para la identificación del género y la especie. Todas las cepas aisladas ofrecieron las siguientes características: cocos, Gram positivos, catalasa negativos, con buen desarrollo a 10°C y a 45°C, a pH 9,6 y en presencia de ClNa al 6,5 %. Se encuadraron dentro del género *Streptococcus*, grupo fisiológico *Enterococcus*, pertenecientes al grupo serológico D de Lancefield.

Las especies se identificaron de acuerdo con las normas de SHERMAN (1937) y THATCHER y CLARK (1968), descritas en II.3.10.1.c. (véase también tabla III.6).

Se pusieron así de manifiesto dos especies del género *Streptococcus*, grupo fisiológico *Enterococcus*, *Streptococcus faecalis*, var. *Liquefaciens* y *Streptococcus faecium*, en proporciones próximas a 1 : 1.

### III.2. Proteolisis durante el proceso madurativo de los quesos fabricados en origen, con leche cruda.

Siguiendo los procedimientos descritos en II.4.3. se fue controlando la evolución de la proteolisis en los quesos de ambas procedencias, determinando la distribución del nitrógeno en las distintas fracciones a lo largo del tiempo.

Los resultados obtenidos de la muestra número 1 se recoge en la tabla III.12 y en la figura III.4 y los de la muestra número 2 se muestran en la tabla III.13 y en la figura III.5.

### III.3. Fabricación de quesos con leche pasterizada y distintos «fermentos».

Al objeto de valorar la contribución de las distintas especies aisladas a las características organolépticas del queso tipo «Ulloa», se procedió a la elaboración en el laboratorio de quesos de esta naturaleza con leche pasterizada y distintos fermentos preparados con los citados gérmenes.

Dada la especial significación de los lactobacilos y de los estreptococos lácticos en la acidificación de la leche y el queso de tan considerable importancia tanto por su influencia sobre las propiedades físicas y químicas de la cuajada y el queso como por controlar el desarrollo del resto de la flora, se incluyeron en todos ellos estrep-

TABLA III.12

Evolución de las fracciones nitrogenadas más representativas a lo largo de la maduración del queso N.º 1, fabricado con leche cruda

DIAS	1	7	14	25
N. TOTAL mg/g E. seco	92,16	88,16	90,90	90,46
N. SOLUBLE mg/g E. seco % de N. total (1)	10,52 11,63	13,77 15,21	33,44 25,90	21,00 23,21
N. NO PROTEICO mg/g E. seco % de N. soluble	2,82 17,30	3,18 23,07	5,58 23,80	8,60 37,32
N. AMONIACAL mg/g E. seco % de N. soluble	1,41 13,40	2,37 17,30	2,79 11,90	3,38 16,09
N. AMINICO mg/g E. seco % de N. soluble	1,06 10,07	1,25 9,07	2,14 9,14	2,93 13,96

(1) Para calcular el % del N. total, se tomó como valor de esta fracción la media de las determinaciones al cabo de 1, 7, 14 y 25 días. (90,44 mg/g E. seco).

TABLA III.13

Evolución de las fracciones nitrogenadas más representativas a lo largo de la maduración del queso N.º 2, fabricado con leche cruda

DIAS	1	7	14	25
N. TOTAL mg/g. E. seco	78,44	80,47	76,92	79,94
N. SOLUBLE (1) mg/g E. seco % de N. total	10,52 13,33	18,92 23,95	33,48 42,38	34,19 43,28
N. NO PROTEICO mg/g E. seco % de N. soluble	1,79 17,01	3,60 19,03	8,14 4,31	14,76 43,17
N. AMONIACAL mg/g E. seco % de N. soluble	1,30 12,35	2,42 12,78	2,52 7,53	4,27 12,50
N. AMINICO mg/g E. seco % de N. soluble	1,00 9,50	1,58 8,32	2,53 7,56	3,23 9,45

(1) Para calcular el % de N. total, se tomó como valor de esta fracción la media de las determinaciones al cabo de 1, 7, 14 y 25 días (78,94 mg/g E. seco).

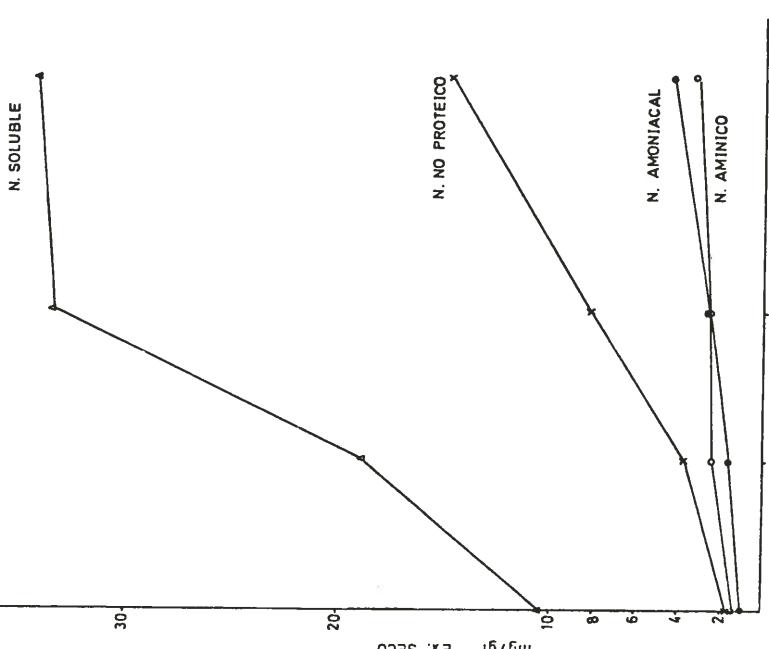


Figura III.5: Evolución de las fracciones nitrogenadas más representativas a lo largo de la maduración del queso N.º 2, fabricado con leche cruda.

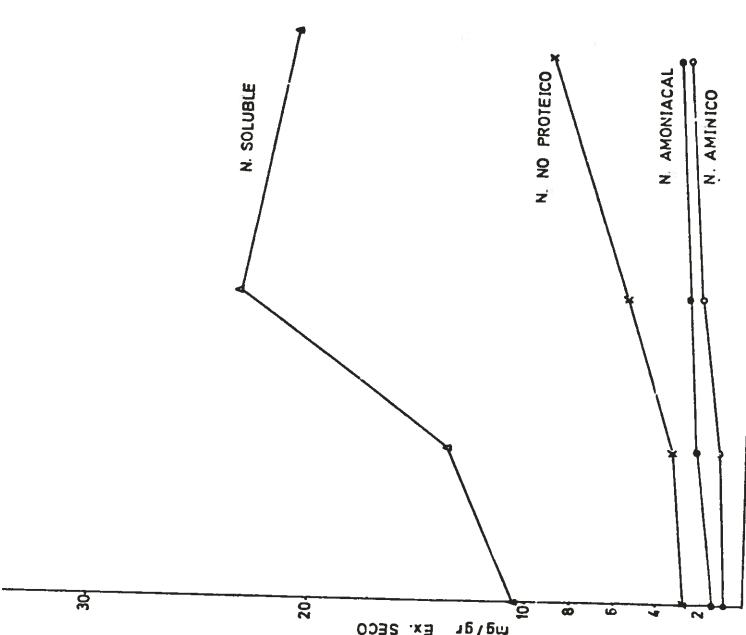


Figura III.4: Evolución de las fracciones nitrogenadas más representativas a lo largo de la maduración del queso N.º 1, fabricado con leche cruda.

tococos lácticos (*S. lactis* y *S. cremoris*) y lactobacilos (*L. plantarum*) y, teniendo en cuenta el interés de los enterococos como gérmenes proteolíticos, se incluyeron éstos en algunas combinaciones; en otras se incorporaron micrococos, tanto para confirmar su desaparición a lo largo de la maduración como por su posible intervención en el proceso madurativo, dado que las opiniones al respecto son contradictorias (HARRIS y HAMMER, 1940; DEANE y ANDERSON, 1942; ROBERTSON y PERRY, 1961; ALFORD y FRAZIER, 1950; FEAGAN y DAWSON, 1959; etc.).

### III.3.1. *Elaboración de los quesos experimentales en el laboratorio*

Para la elaboración de estos quesos se utilizó leche procedente de la Estación Pecuaria de la provincia de León, con un 3,5 % de grasa y un pH de 6,7 al comenzar las experiencias.

La leche se pasterizó a 65°C durante 15 minutos el control de la pasterización se llevó a cabo mediante la prueba de la fosfatasa, realizada por el método de ASCHAFFENBURG y MULLEN (1949).

Una vez enfriada la leche a 32°C, se añadieron los cultivos lácticos 30 minutos antes que la adición del cuajo; transcurrido este período, por cada 10 litros de leche se le adicionaron 1,5 ml. (diluidos en 2-4 de agua) de cuajo de título 1 : 10.000. La leche estuvo constantemente mantenida a la citada temperatura de 32°C y coaguló en 30 minutos. Al cabo de este tiempo la cuajada se cortó y desmenuzó con un cuchillo y se agitó durante 10 minutos con una varilla de vidrio; posteriormente se transfirió a una gasa para proceder, por torsión, de la misma, al desuero; se colocó la masa en un molde adecuado y se prensó suavemente. A continuación se introdujo en salmuera de 18°B durante 24 horas, a 4°C. Al cabo de este tiempo se colocó en una cámara a 12-13°C sin control de humedad relativa, donde se mantuvieron hasta 25 días, en el transcurso de los cuales se fueron tomando muestras cuando así procedía.

En un primer ensayo se pretendió exclusivamente seguir la evolución de la flora añadida constituida por la totalidad de los microorganismos con posible significación en los procesos madurativos, aislados de la leche de origen y quesos con ella elaborados por los dos fabricantes lucenses, así como la del pH y las de las fracciones nitrogenadas más características (nitrógeno soluble, no proteico, amoniacal y amónico) y compararlas con las de los quesos que se pretendía imitar.

Mas adelante, se fabricaron lotes diversos con participación en todos los casos de las especies *S. lactis*, *S. cremoris* y *L. plantarum* y diferentes combinaciones de micrococos y enterococos, determinando en ellos, al final de la maduración, las fracciones nitrogenadas más significativas.

Los datos obtenidos en estas experiencias previas permitieron finalmente, producir, con la leche de la explotación ganadera de Lugo a que se hizo referencia en III.1 y a escala semiindustrial, quesos con los gérmenes seleccionados en las ex-

periencias previas. Los productos obtenidos se sometieron, en algunos casos, a controles bioquímicos más detallados y en todos a un jurado de catadores.

### III.3.1.1. *Ensayo con un cultivo constituido por todos los gérmenes aislados de posible significación en la maduración del queso.*

Se preparó un fermento, añadiendo a 100 ml de leche esterilizada durante 15 minutos a 1 Kg/cm<sup>2</sup> 1 ml de cada uno de los siguientes cultivos de 16 horas en leche estéril: *S. lactis*, *S. cremoris*, *Micrococcus spp.* *S. faecium* y *S. faecalis*, var. *liquefaciens* y se incubó a 32°C. Transcurridas 5 horas, se adicionó 1 ml. de un cultivo en leche estéril de *L. plantarum*. El fermento así preparado se mantuvo en incubación hasta que la leche adquirió un aspecto pastoso y se empezaron a formar los primeros flóculos, momento en que se añadió a la leche pasterizada en una proporción del 0,2 %.

El número de gérmenes en el momento del comienzo de la fabricación del queso (obtenido por crecimiento en Agar para recuento en placas) fue de  $1,53 \times 10^6$  ger/ml de leche. Se elaboraron así dos unidades, de unos 600 gr, al salir de la salmuera.

Se tomaron muestras en los días 1, 7, 14 y 25 y de la misma forma que en los quesos fabricados a partir de leche cruda, se hicieron recuentos en Agar Elliker, Agar Rogosa, Agar mEnterococcus y en Agar para recuento en placa y se determinó el grado de proteolisis midiendo las fracciones nitrogenadas más significativas.

En la tabla III.14 se muestran los resultados obtenidos en los recuentos, expresados, en las muestras de leche, en ger/ml y en las de queso, en ger/gr., así como los valores del pH a lo largo del período madurativo.

En la tabla III.15 se recogen las fracciones nitrogenadas más significativas determinadas a lo largo de la maduración.

Las figuras III.6 y III.7 muestran la evolución de la flora y de las fracciones nitrogenadas más significativas a lo largo del proceso madurativo, respectivamente.

**TABLA III.14**

Leche (1)		Queso (2)			
DIAS		1	7	14	25
Rec. A. Rogosa	$1,78 \times 10^4$	$2,90 \times 10^5$	$2,06 \times 10^6$	$3,80 \times 10^6$	$8,00 \times 10^6$
Rec. A. Elliker	$8,70 \times 10^5$	$3,53 \times 10^7$	$2,10 \times 10^9$	$2,05 \times 10^9$	$1,94 \times 10^9$
Rec. A. mEntero- rococcus	$6,60 \times 10^4$	$2,46 \times 10^7$	$1,00 \times 10^8$	$1,20 \times 10^8$	$1,30 \times 10^8$
Rec. total	$1,53 \times 10^6$	$5,99 \times 10^7$	$3,19 \times 10^9$	$1,30 \times 10^9$	$3,29 \times 10^9$
pH	6,7	6,4	5,9	5,5	5,5

(1) Los resultados de los recuentos se expresan en gérmenes/ ml. de lech

(2) Los resultados de los recuentos se expresan en gérmenes/ gr. de queso.

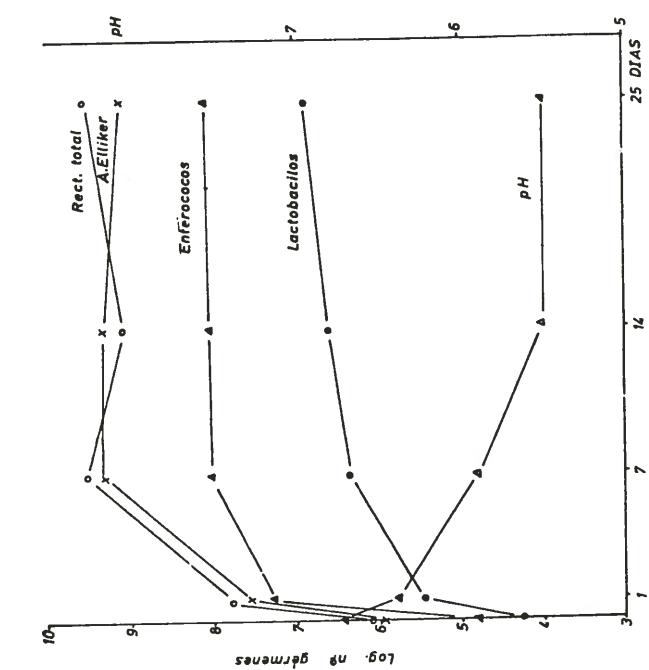


Figura III.6: Evolución de la flora microbiana, a lo largo de la maduración, en el queso elaborado en el laboratorio con un cultivo mixto, descrito en III.3.1.1.

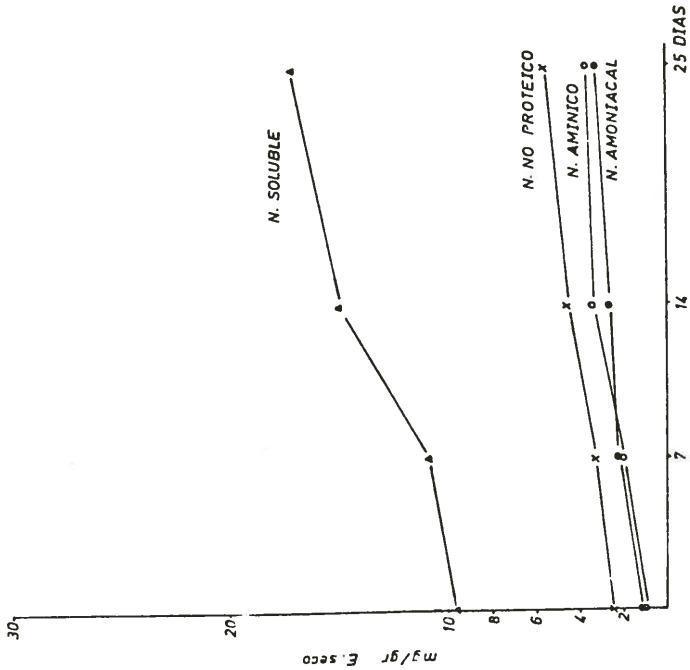


Figura III.7: Evolución de las fracciones nitrogenadas más significativas a lo largo de la maduración de los quesos elaborados en el laboratorio con el cultivo mixto descrito en III.3.1.1.

TABLA III.15

Evolución de las fracciones nitrogenadas más significativas a lo largo de la maduración de los quesos elaborados en el laboratorio con un cultivo mixto (III.3.1.1.)

DIAS	1	7	14	25
N. TOTAL mg/g E. seco	75,98	76,67	75,93	75,80
N. SOLUBLES (1) mg/g E. seco	9,80	10,89	11,40	13,06
% de N. total	12,96	14,35	15,02	17,21
N. NO PROTEICO mg/g E. seco	2,52	3,28	4,51	5,63
% de N. soluble	26,65	30,11	39,56	43,10
N. AMONIACAL mg/g E. seco	1,10	2,14	2,61	3,15
% de N. soluble	13,22	19,65	22,89	24,11
N. AMINICO mg/g E. seco	1,09	2,00	3,59	3,60
% de N. soluble	11,12	18,36	31,49	27,56
EXTRACTO SECO %	39,90	49,56	55,48	60,20

(1) Para calcular el % de N. total, se tomó como valor de esta fracción la media de las determinaciones al cabo de 1, 7, 14 y 25 días (75,87 mg/g E. seco).

III.3.1.2. *Cultivos constituidos por la flora láctica habitual y combinaciones diversas de la misma con los micrococos y enterococos aislados de los quesos que se pretendió imitar.*

Se fabricaron en el laboratorio siguiendo, en líneas generales, la misma marcha descrita en el apartado III.3.1.1., cinco «fermentos» diferentes, con los que se elaboraron quesos a partir de 8 litros de leche en cada caso, de acuerdo con la técnica descrita en III.3.1, obteniendo dos unidades de unos 600 gr., al salir de la salmuera, por lote. La carga microbiana aportada por el cultivo se mantuvo en los mismos límites (aproximadamente  $10^6$  ger/ml. de leche).

Al final de la maduración (25 días) se determinaron en todos ellos, el extracto seco y las fracciones nitrogenadas más significativas.

*Lote N.º 1:* El «fermento» utilizado en este lote estuvo constituido por las especies *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Lactobacillus plantarum*.

*Lote N.º 2:* «fermento» utilizado: mezcla de las especies *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus plantarum* y *Micrococcus sp.*

*Lote N.º 3:* «fermento» utilizado: constituido por una mezcla de las especies *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecium* y *Streptococcus faecalis*, var. *liquefaciens*.

Lote N.º 4: «fermento» utilizado: las especies existentes fueron *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecium* y *Micrococcus spp.*

Lote N.º 5: «fermento» utilizado: las especies que entraron a formar parte de él fueron *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecalis*, var. *liquefaciens*.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.16.

En la figura III.8 se representan los datos, en términos de mg de nitrógeno/gr de extracto seco, de las fracciones de nitrógeno soluble y nitrógeno no proteíco de estos quesos y en la figura III.9 los nitrógenos amoniácal y amínico. En estas figuras se representan con el N.º 6 las fracciones nitrogenadas, al final de la maduración, del queso experimental descrito en III.3.1.1.1 y con los 7 y 8 las de los quesos N.º 1 y N.º 2 fabricados con leche cruda (véase III.2)

TABLA III.16

Valores de las fracciones nitrogenadas más significativas, al final de la maduración, de los quesos fabricados en el laboratorio con cultivos constituidos por la flora láctica habitual y diversas combinaciones de micrococos y enterococos

LOTE DE QUESO	1	2	3	4	5
<b>N. SOLUBLE</b>					
mg/g E. seco	10,76	5,57	16,78	10,87	16,86
% de N. total	13,79	7,14	21,1	19,33	21,61
<b>N. NO PROTEICO</b>					
mg/g E. seco	4,09	1,43	11,66	4,53	7,83
% de N. soluble	38,04	25,64	69,44	41,66	46,42
<b>N. AMONIACAL</b>					
mg/g E. seco	2,92	1,07	1,38	1,55	2,40
% de N. soluble	27,13	19,23	8,21	14,21	14,23
<b>N. AMINICO</b>					
mg/g E. seco	2,56	1,13	2,99	1,80	1,85
% de N. soluble	23,77	20,25	17,79	60,69	62,28
<b>EXTRACTO SECO</b>					
	64,14	70,00	58,98	60,69	62,28

### III.3.2. Fabricación de quesos a escala semiindustrial con leche pasterizada.

A la luz de los resultados expuestos se consideró que los microorganismos que jugaban un papel fundamental en la maduración de este tipo de queso era su flora típicamente láctica (*S. lactis*, *S. cremoris* y *L. plantarum*) y los enterococos, pero que era necesario confirmar esta hipótesis, elaborando los quesos con leche de la misma procedencia que los que se pretendían imitar y en condiciones tan rigurosamente parecidas a las utilizadas por los fabricantes a pequeña escala como fuera posible. Debe tenerse en cuenta, por ejemplo, que todos los quesos fabricados en el laboratorio ofrecían un extracto seco mucho más elevado que los originales a imitar.

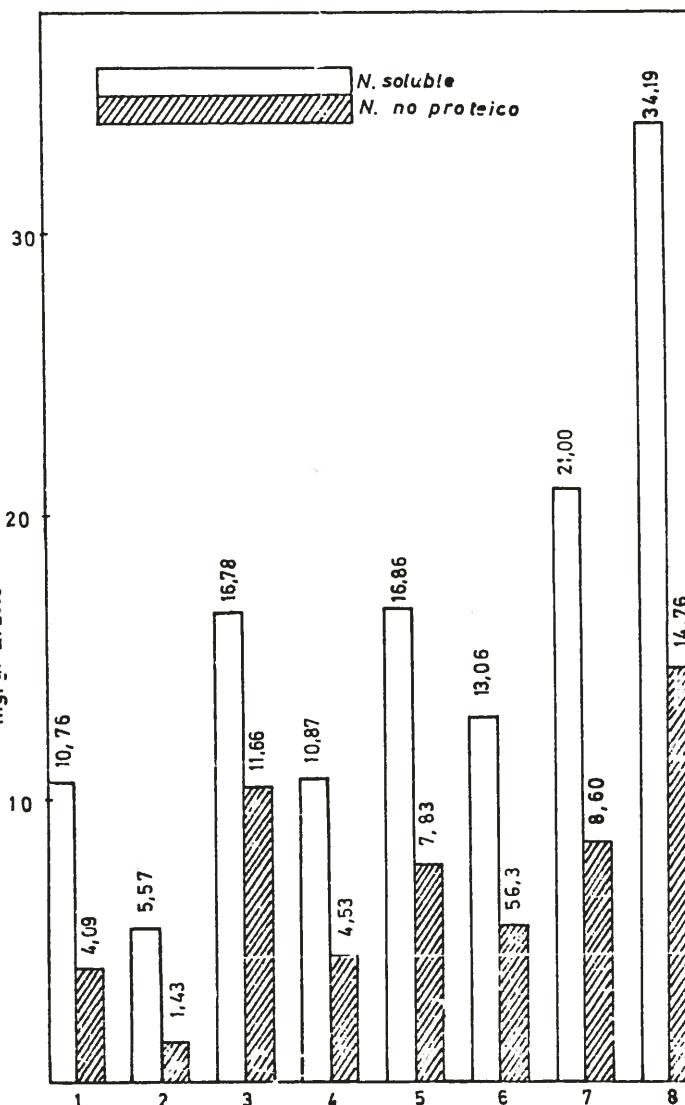


Figura III.8: Valores alcanzados por el nitrógeno soluble y no proteíco, al final de la maduración, en los quesos fabricados en el laboratorio con cultivos constituidos por la flora láctica habitual y diversas combinaciones de micrococos y enterococos.

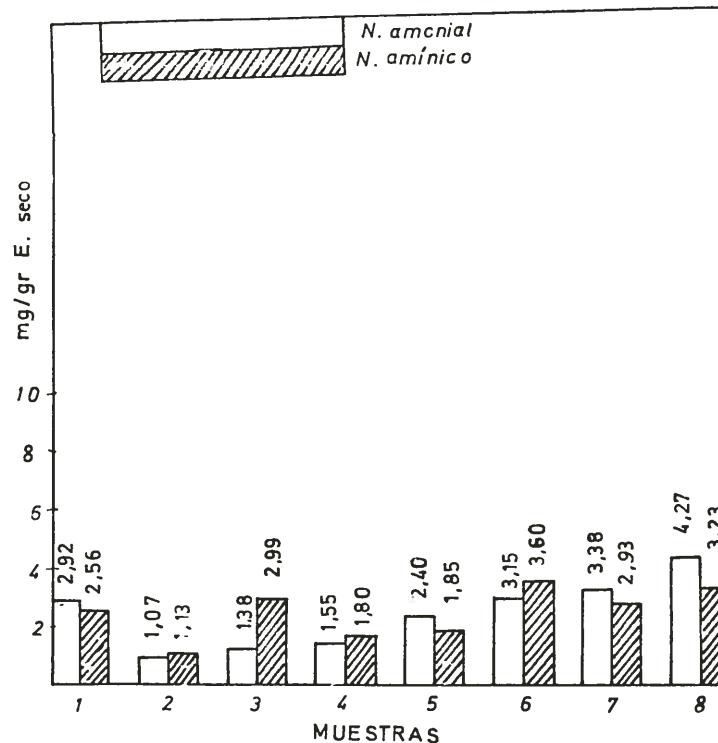


Figura III.9: Valores alcanzados por el nitrógeno amoniacal y amínico, al final de la maduración, en los quesos fabricados en el laboratorio con cultivos constituidos por la flora láctica habitual y diversas combinaciones de micrococos y enterococos.

La fabricación se llevó a efecto con la leche de la explotación ganadera de gran volumen a que se hizo mención en III.1. y en la quesería de la misma.

La leche se pasterizó en la instalación de pasterización con cambiadores de calor de placas de que la citada quesería está provista, a 74°C; su contenido en grasa fue de 3,5 % y su pH de 6,7.

Se fabricaron cinco lotes de quesos con 60-80 litros de leche cada uno. Se siguió la misma marcha de elaboración que la utilizada por los fabricantes de pequeño volumen ya citados y es, en líneas generales, similar a la descrita en III.3.1.

El corte de la cuajada se llevó a efecto con «lira», durante unos 15 minutos, hasta un tamaño de grano similar a los del maíz. La cuajada se lavó con abundante agua caliente a 34°C (dos más que la de coagulación) y el desuero se efectuó por filtración a través de gasa y en un molde cilíndrico de 20 cm de diámetro por 10 cm de altura, por suave presión mecánica durante 5 ó 6 horas. Sacados del molde se introdujeron en una salmuera de 18°B durante 24 horas a 11-13°C. Seguidamente, se introdujeron los quesos en una cámara de maduración a 11-13°C, con una humedad relativa de 85-90 % y con una renovación abundante del aire. Durante los 25 días de permanencia en la sala de maduración se voltearon los quesos diariamente.

Al término de la maduración, se determinaron las distintas fracciones nitrogenadas más significativas y se sometieron a un jurado de catadores para su degustación.

Los fermentos utilizados en los cinco lotes de quesos fabricados fueron los siguientes:

Lote N.º 1: Se añadieron 100 ml de leche estéril 1,5 ml de los siguientes cultivos madre, también en leche estéril, incubados hasta el punto de coagulación: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus faecium* y *Streptococcus faecalis*, var. *liquefaciens*; cuatro horas mas tarde, se añadió al fermento 1 ml de un cultivo de *L. plantarum*, también a punto de coagular la leche. Cuando los 100 ml de leche, incubados a 32°C, alcanzaron una consistencia pastosa se añadieron a 800 ml de leche estéril que se mantuvieron a 32°C durante el tiempo necesario para que alcanzase igualmente, un aspecto pastoso, momento en que se pasó al frigorífico (2-4°C) donde se mantuvo hasta que se fabricaron los quesos.

Lote N.º 2: Se preparó el fermento de igual modo que el lote anterior pero el inóculo *S. faecalis*, var. *liquefaciens* fue 1/20 del lote N.º 1 y carecía de la especie *S. faecium*.

Lote N.º 3: El fermento fue igual al del lote N.º 2 pero el inóculo de *S. faecalis*, var. *liquefaciens* quedó reducido al 1/1.000 del del lote N.º 1.

Lote N.º 4: El fermento utilizado fue idéntico al del lote N.º 3 pero los quesos se fabricaron añadiendo a la leche 0,5 gr. de ClNa por litro y se pasaron directamente de la prensa a la sala de maduración, suprimiendo la salmuereación.

Lote N.º 5: Se suprimió en el fermento el *S. faecalis*, var. *liquefaciens*. Por lo demás fue idéntico al del lote N.º 1.

### III.3.2.1. Valores de las fracciones nitrogenadas más significativas, al final de la maduración, de los quesos fabricados a escala semiindustrial con leche pasterizada.

Al final de la maduración (25 días), se determinaron en todos ellos el extracto seco y las fracciones nitrogenadas más significativas.

La tabla III.17, recoge los datos relativos a la distribución del nitrógeno en las distintas fracciones en cada uno de estos quesos. En la figura III.10 se comparan las fracciones de nitrógeno soluble y nitrógeno no proteico con las de los quesos originales a imitar y en la figura III.11. se comparan los nitrógenos amoniacal y amínico, de estos quesos y de los procedentes de la fabricación artesana con leche cruda. En esta figura los lotes 6 y 7 se refieren a los quesos N.º 1 y N.º 2, respectivamente, fabricados con leche cruda (véase III.2).

### III.3.2.2. Jurado de catadores.

Un jurado constituido por 10 expertos catadores elaboró primero un baremo

TABLA III.17

Valores de las fracciones nitrogenadas más significativas, al final de la maduración, de los distintos quesos fabricados a escala semiindustrial

LOTE DE QUESO	1	2	3	4	5
<b>N. SOLUBLE</b>					
mg/g E. seco	21,73	24,29	28,92	22,62	18,17
% de N. total	26,10	26,35	29,78	24,75	19,05
<b>N. NO PROTEICO</b>					
mg/g E. seco	8,97	12,75	8,78	7,54	5,06
% de N. soluble	41,20	52,40	30,29	33,32	27,84
<b>N. AMONIACAL</b>					
mg/g E. seco	2,83	5,62	4,00	3,77	1,87
% de N. soluble	13,00	23,09	13,80	16,66	10,33
<b>N. AMINICO</b>					
mg/g E. seco	3,09	8,31	5,75	5,31	2,13
% de N. soluble	14,25	34,15	19,83	23,47	11,76
<b>EXTRACTO SECO (%)</b>	<b>52,66</b>	<b>41,17</b>	<b>48,40</b>	<b>46,42</b>	<b>45,40</b>

de la contribución de cada una de las características organolépticas más importantes (sabor, olor, consistencia y color) a la calidad final del queso (tabla III.18).

Cada uno de los componentes del jurado valoró luego, sobre 10 puntos, cada una de las propiedades organolépticas citadas, de los quesos de cada lote. En las tablas III.19, III.20, III.21 y III.22 se muestran los valores obtenidos por cada

TABLA III.18

Baremo elaborado por el jurado de catadores de la contribución de las propiedades organolépticas a la calidad

Catador	Sabor	Consistencia	Color	Total
N.º 1	6	2	1	10
» 2	3	2	3	10
» 3	4	1	1	10
» 4	7	1	2	10
» 5	7	1	1	10
» 6	4	2	3	10
» 7	5	2,5	1,5	10
» 8	6	2	2	10
» 9	5	2	2	10
» 10	4	2	3	10
<b>MEDIA</b>	<b>5</b>	<b>1,8</b>	<b>2</b>	<b>10</b>
Factor contribución a calidad final	0,5	0,18	0,2	0,12
				1,0

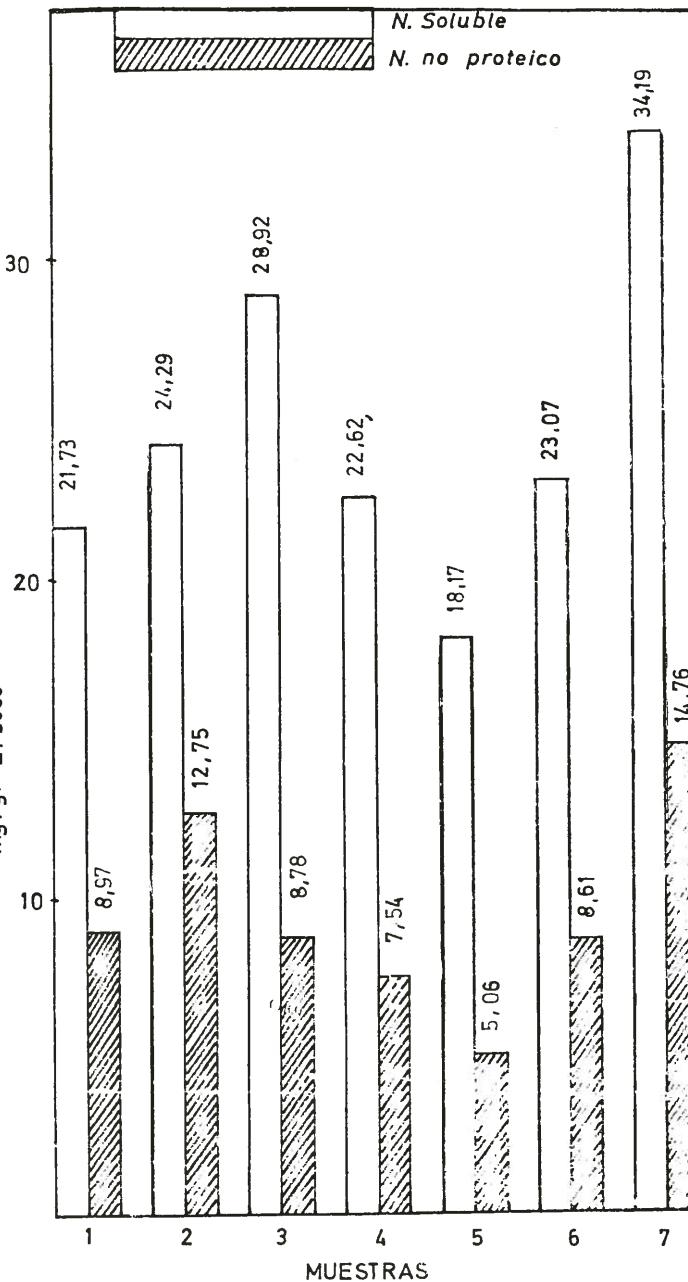


Figura III.10. Valores alcanzados por el nitrógeno soluble y no proteico, al final de la maduración, en los distintos quesos fabricados a escala semiindustrial.

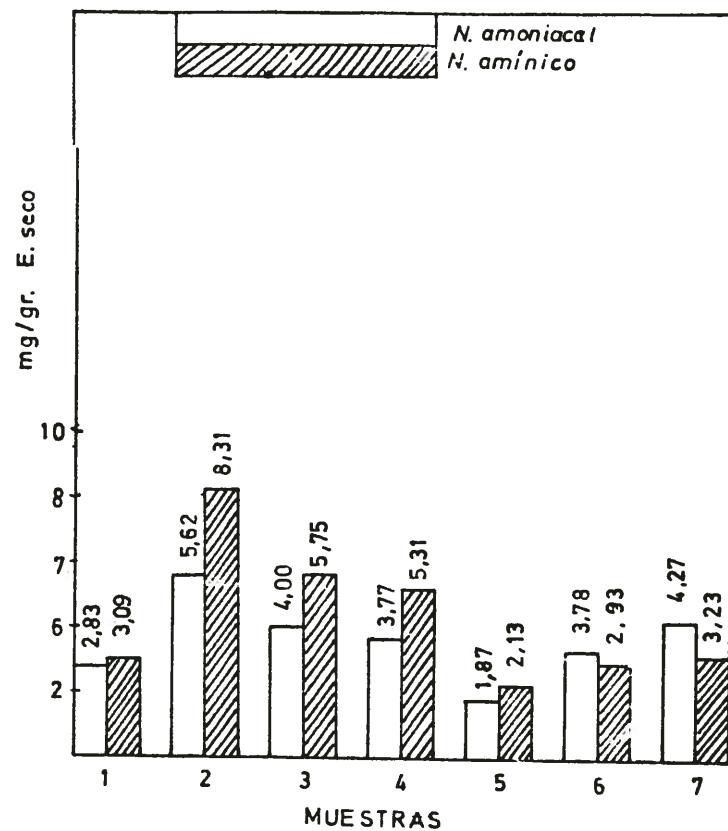


Figura III.11. Valores alcanzados por el nitrógeno amoniacial y amínico, al final de la maduración, en los distintos quesos fabricados a escala semiindustrial.

TABLA III.19

Valoración de cada una de las características organolépticas del lote N.º 1, cuyo «fermento» estuvo constituido por las especies: *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum*, *S. faecium* y *S. faecalis*, var. *liquefaciens*

Catador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEDIA
Sabor	6	7	5	7	2	0	0	4	8	5	4,4
Olor	2	6	2	7	1	—	0	5	3	5	3,4
Consistencia	4	6	7	7	1	0	0	5	5	6	4,1
Color	2	5	10	3	2	0	0	0	3	7	3,2

TABLA III.20

Valoración de cada una de las características organolépticas del lote N.º 2, cuyo «fermento» estuvo constituido por las especies: *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum* y *S. faecalis*, var. *liquefaciens* 1/20

Catador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
Sabor	7	8	10	8	6	9	8	10	6	3	7,5
Olor	3	6	3	5	5	—	5	5	3	3	4,22
Consistencia	1	6	3	0	6	3	8	0	5	2	3,4
Color	4	7	7	3	8	8	5	10	10	4	6,8

TABLA III.21

Valoración de cada una de las características organolépticas del lote N.º 3 cuyo «fermento» estuvo constituido por las especies: *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum* y *S. faecalis*, var. *liquefaciens*. (1/1.000)

Catador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
Sabor	5	8	8	8	8	7	10	6	9	5	7,4
Olor	3	7	2	8	5	—	5	5	3	6	5,0
Consistencia	6	6	7	9	6	7	10	5	5	7	6,8
Color	5	7	8	8	2	7	5	10	10	8	6,9

TABLA III.22

Valoración de cada una de las características organolépticas del lote N.º 5, cuyo «fermento» estuvo constituido por las especies: *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum* y *S. faecium*

Catador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
Sabor	2	2	5	2	0	0	0	0	3	0	1,4
Olor	1	1	2	2	1	0	0	0	3	1	1,1
Consistencia	0	0	3	2	0	0	0	3	3	1	1,2
Color	3	5	5	2	1	0	0	2	9	2	2,9

TABLA III.23

Puntuación total de cada propiedad organoléptica y calificación global de cada lote de queso

LOTE DE QUESO	PUNTOS SOBRE 100			
	N.º1	N.º2	N.º3	N.º5
Sabor	44	75	74	14
Olor	34,44	42,22	50	11
Consistencia	41	34	68	12
Color	32	68	69,66	29
Calidad organoléptica global	40,24	60,06	68,00	14,86

característica organoléptica en los lotes 1, 2, 3 y 5 que se corresponden con los descritos en III.3.2 y en la tabla III.17.

La tabla III.23 recoge la puntuación total de cada propiedad organoléptica, sobre 100 puntos, otorgada por el jurado a cada lote de quesos y la calificación global obtenida sumando el producto de la puntuación de cada propiedad por el factor con que el jurado había decidido que contribuía a la calidad final.

#### III.4. Aminoácidos libres.

Al objeto de obtener un conocimiento más profundo de las características del queso tipo «Ulloa» y de comparar más detalladamente los quesos experimentales que lograron la puntuación más alta por el jurado de catadores con los fabricados con leche cruda se procedió al análisis de sus aminoácidos libres.

Para ello, se fabricaron en la factoría de la explotación ganadera citada en III.1 un lote de quesos con leche pasterizada y el cultivo con que se elaboró el lote n.º 3 del apartado III.3.2. (el de mejor resultado tanto en las pruebas organolépticas como en las de determinación del grado de proteolisis —véase tabla III.17 y III.23—); uno de los fabricantes de los quesos que sirvieron para el estudio microbiológico inicial, elaboró con leche cruda, ordeñada manualmente, un segundo lote en sus dependencias con el mismo cuajo y en idénticas proporciones.

Inmediatamente después del desuero se tomó una muestra de la cuajada de la fabricación con leche pasterizada y se procedió a la determinación del extracto seco y extracción de los aminoácidos libres según se indica en II.4.5.4; sobre el filtrado a través de membranas Millipore se hicieron determinaciones de sustancias ninhidrina positivas, nitrógeno total y nitrógeno peptídico (biuret) y análisis de aminoácidos libres. Los dos lotes de quesos fueron sometidos a las mismas determinaciones analíticas que la cuajada.

La tabla III.24 recoge los datos de nitrógeno total, sustancias ninhidrina positivas y nitrógeno peptídico de los extractos solubles en etanol del 92 %.

La tabla III.25 muestra las concentraciones alcanzadas por cada aminoácido (neutros, ácidos y básicos), así como el amoníaco en las tres muestras.

Las figuras III.12, III.13 y III.14 muestran los aminoacidogramas de la cuajada, queso fabricado a partir de leche cruda y queso elaborado con leche pasterizada, respectivamente (aminoácidos neutros y ácidos). Los aminoácidos básicos se muestran en las figuras III.15, III.16 y III.17.

#### III.5. Composición lipídica de la cuajada y los quesos fabricados con leche cruda y leche pasterizada.

Es bien sabido que la fracción lipídica de la leche está constituida, en su mayor parte, por lipídicos neutros y pequeñas cantidades de lípidos complejos, tales como fosfolípidos, glicolípidos y esfingolípidos; es en cambio, muy escaso el co-

TABLA III.24

Nitrógeno total, peptídico y de las sustancias ninhidrina positivas y aminoácidos libres totales de los extractos solubles en etanol (92 %) de la cuajada y quesos fabricados con, leche cruda y pasterizada, expresados en mg / 100 gr. de extracto seco

	Nitrógeno total	Nitrógeno peptídico	Sust. ninhi-drina + (1)	Aminoácidos libres
Cuajada	30,20	0,31	17,63	71,48
Queso leche cruda	76,99	35,04	28,90	86,84
Queso leche past.	82,08	23,68	33,17	126,67

(1): Usando para los cálculos el coeficiente de extinción molar de la glicocola.

TABLA III.25

Aminoácidos libres de la cuajada y quesos fabricados con leche cruda y pasterizada

Aminoácido	Cuajada		Queso leche cruda		Queso leche pasterizada	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Aspártico	1,03	2,27	—	—	3,70	—
Treonina	2,22	4,90	1,34	2,50	3,14	6,32
Serina	1,60	3,53	—	—	5,14	5,36
Glutámico	1,98	4,37	3,02	5,64	7,24	12,38
Prolina	—	—	—	—	3,00	5,13
Glicocola	0,07	0,15	0,31	0,57	0,41	0,70
Alamina	1,21	2,67	0,58	1,08	2,08	3,55
Cistina	—	—	0,42	0,78	Trazas	Trazas
Valina	3,16	6,98	2,65	4,95	4,69	8,01
Metionina	1,41	3,11	2,36	4,41	3,20	5,40
Isoleucina	1,47	3,24	3,86	7,21	7,14	12,20
Leucina	7,50	16,57	12,01	22,45	7,41	12,67
Tirosina	0,61	1,34	0,83	1,55	0,91	1,55
Fenilalanina	2,83	6,25	8,00	14,96	5,44	9,30
Lisina	3,86	8,53	4,91	9,18	7,51	12,84
Histidina	—	—	—	—	7,47	12,77
Arginina	1,84	4,06	1,47	2,74	5,95	10,17
Amoníaco	1,59	3,51	4,72	8,82	4,87	8,32
TOTALES	32,38	71,48	46,48	86,84	77,16	126,67

(1) En términos de mg./ 100 gr. (2) Expresado en mg./ 100 gr. de extracto seco.

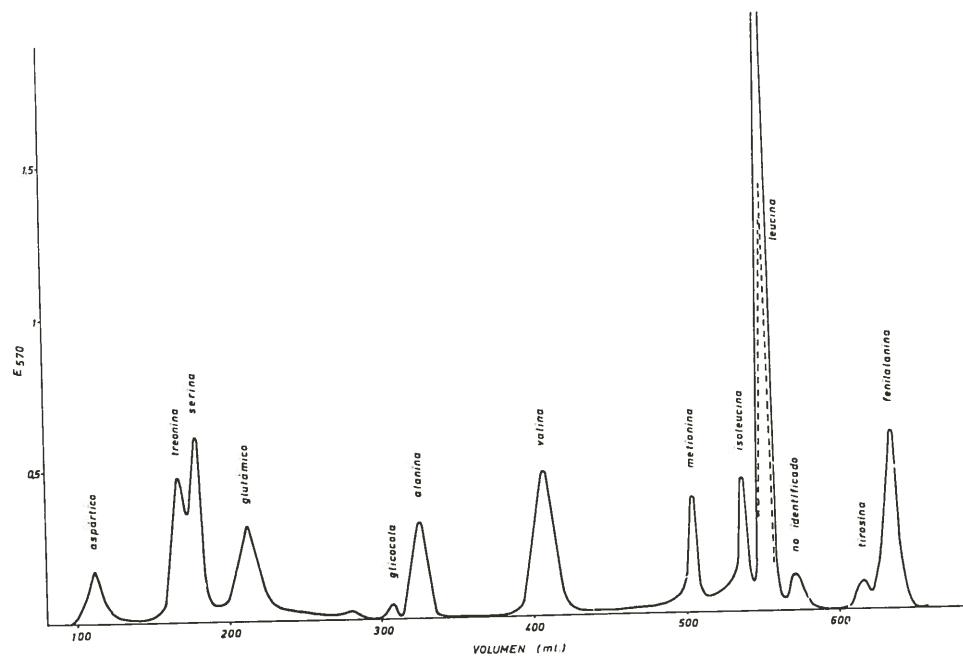


Figura III.12. Cromatografía de los aminoácidos libres, neutros y ácidos, de la cuajada.

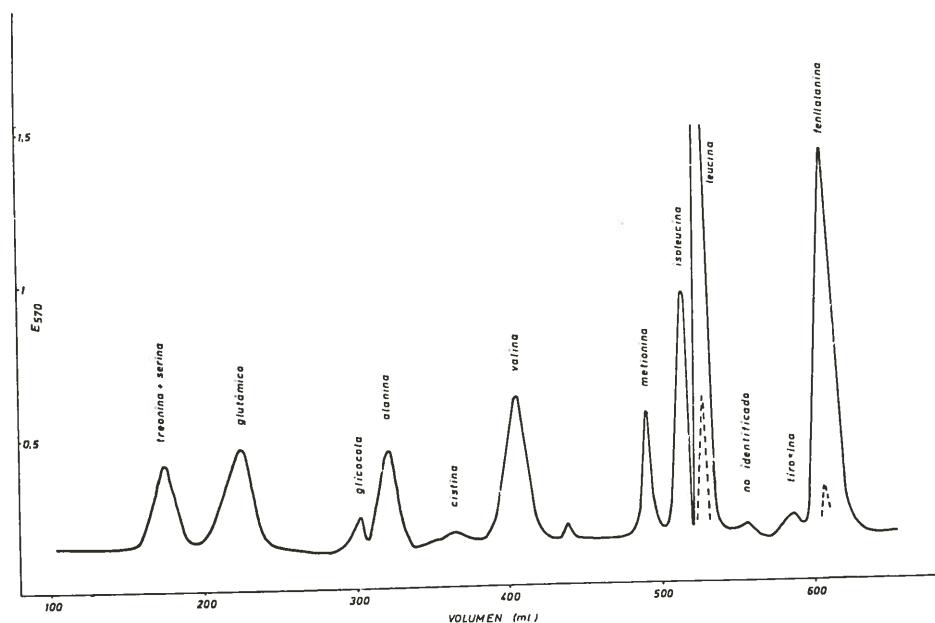


Figura III.13. Cromatografía de los aminoácidos libres, neutros y ácidos, del queso fabricado con leche cruda.

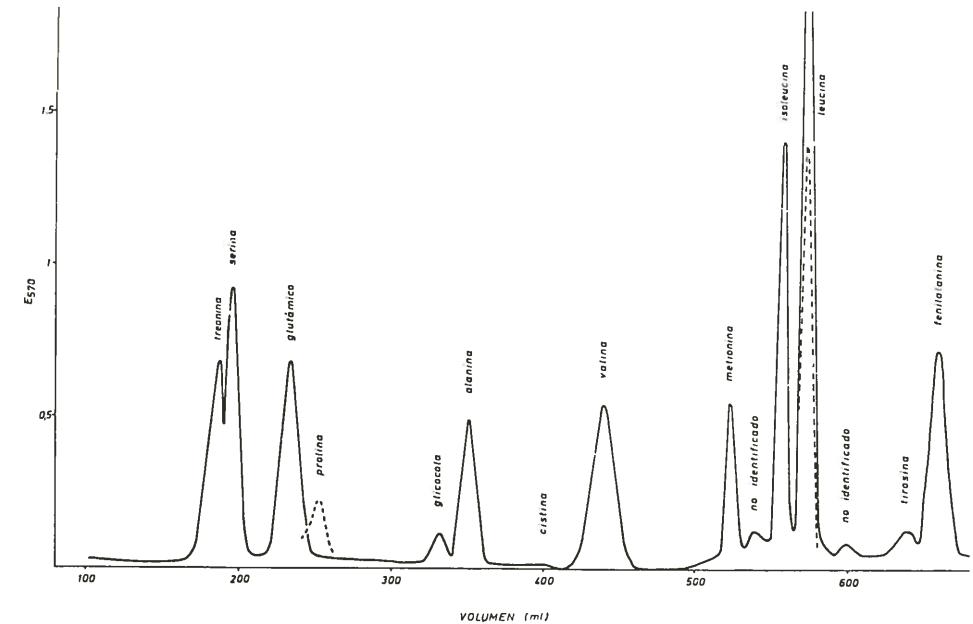


Figura III.14. Cromatografía de los aminoácidos libres, neutros y ácidos, del queso fabricado con leche pasteurizada.

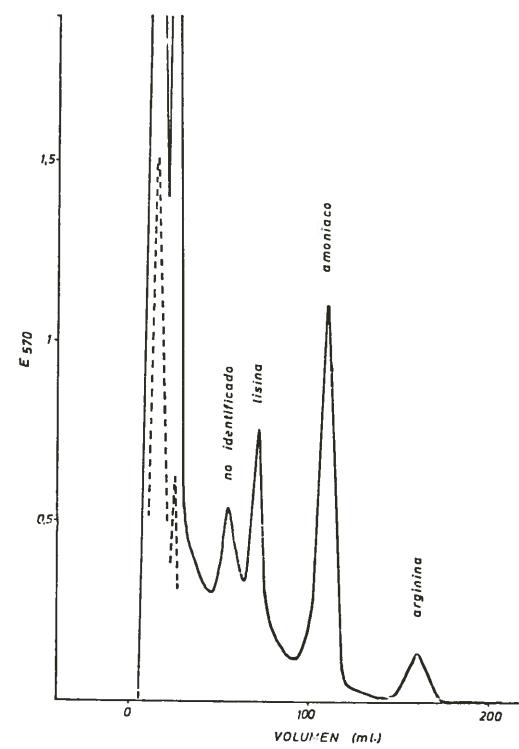


Figura III.15: Cromatografía de los aminoácidos libres, básicos, de la cuajada.

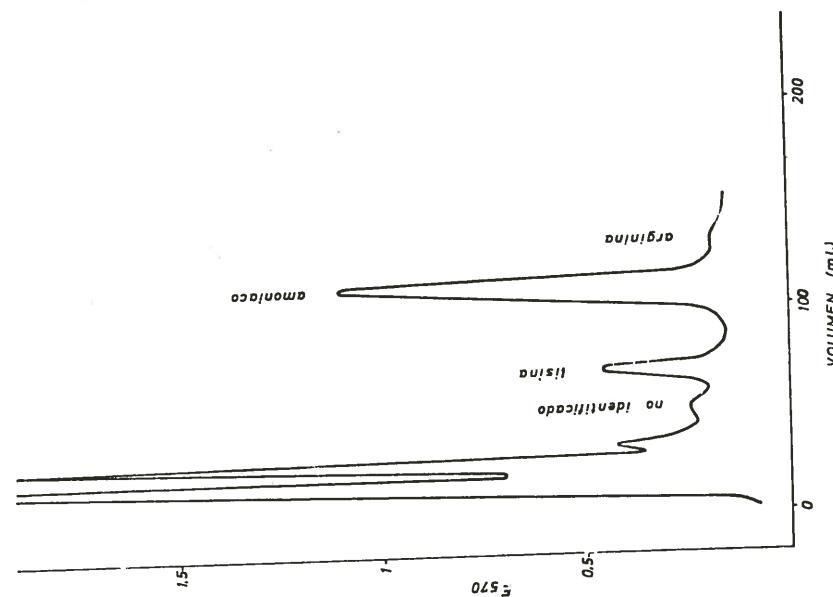


Figura III.16: Cromatografía de los aminoácidos libres, básicos, del queso fabricado con leche cruda.

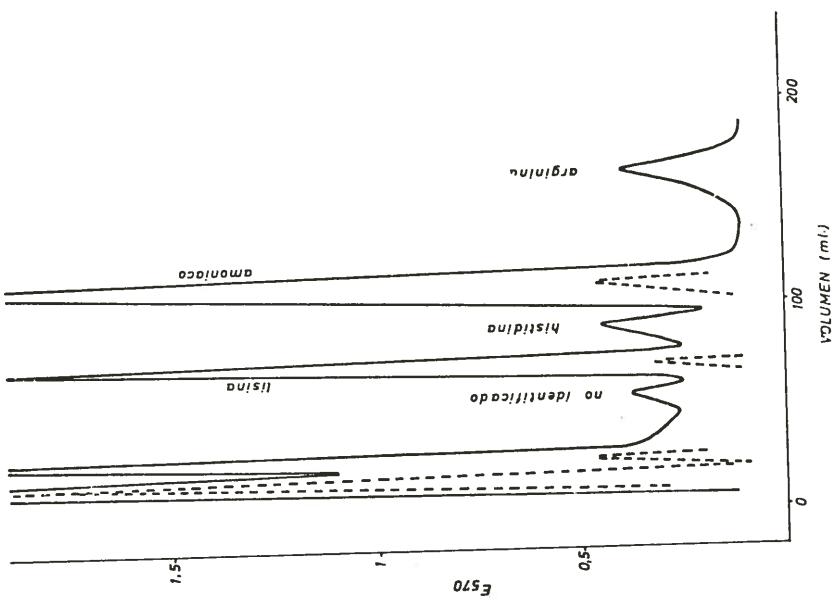


Figura III.17: Cromatografía de los aminoácidos libres, básicos, del queso fabricado con leche pasterizada.

nocimiento que se tiene sobre la composición lipídica de los quesos y en qué medida difiere de la de la grasa de la leche. El escaso trabajo recientemente realizado sobre ciertos quesos madurados por bacterias como el Cheddar, han puesto de manifiesto que en su mayor parte, los lípidos del queso ofrecen idénticas características que los de la leche pero que aparecen también en el queso ciertas sustancias lipídicas complejas de origen bacteriano (BOLCATO y col., 1959; FUJISHIMA y col., 1970; NAKANISHI Y KAYA, 1971 y UMEMOTO y SHATO, 1973).

El trabajo que se describe en el presente aparato persigue un doble objetivo: conocer a fondo la composición lipídica del queso tipo «Ulloa» que pasaría a ser el único queso español en el que se hubiera realizado un estudio de esta naturaleza y comparar más detalladamente los quesos fabricados con leche cruda y los elaborados a partir de leche pasterizada con el «fermento» que tan acusadamente permitía imitar las características organolépticas de aquellos.

### III.5.1. Extracción del material lipídico por procedimientos físicos y químicos.

Procediendo según se indica en el apartado II.4.6.2. se determinó el contenido en materia grasa de la cuajada, del queso fabricado con leche cruda y del preparado a partir de leche pasterizada y el «fermento» con el que se elaboró el lote N.º 3 a que se refiere el apartado III.3.2, constituido por los gérmenes *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum* y *S. faecalis*, var. *liquefaciens*.

Igualmente se procedió a la determinación de sus extractos secos y a una extracción por el procedimiento físico descrito en II.4.6.2.a, seguida por reextracción del residuo con cloroformo/metanol (2/1) (v/v) y liberación del material contaminante de los extractos.

La tabla III.26 recoge los resultados así obtenidos; en ella se indica los rendimientos parciales y totales de las extracciones del material lipídico efectuadas.

### III.5.2. Fraccionamientos en columnas de ácido silícico-celita.

Aunque se preveía que la purificación de los distintos componentes de la fracción lipídica tendría que descansar fundamentalmente en la cromatografía en lámina fina, se consideró necesariamente una purificación en columnas de ácido silícico-celita dada la absoluta dominancia, en la fracción grasa de la leche y el queso, de los triglicéridos.

#### III.5.2.1. Columnas de ácido silícico-celita 4/1.

Se probó inicialmente el sistema de fraccionamiento descrito por BRUNDISH y col. (1965), comprobando la eficacia del fraccionamiento mediante cromatografía en lámina fina.

Una alícuota de una mezcla de los extractos físicos y químicos de las distintas muestras constituida por aproximadamente un gramo de lípidos se cromatógrafió

TABLA III.26

Rendimiento de las sucesivas extracciones física y química de la cuajada y los quesos fabricados con leche cruda y pasteurizada.

Extracto seco %	Material lipídico total (1)	Extracción física			Extracción química			Totales (1)	(2)	(3)
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)			
Cuajada	45,20	22,00	48,67	4,71	10,42	21,41	13,60	30,09	78,65	18,31
Queso leche cruda	53,40	25,00	46,82	8,51	15,94	34,04	10,88	20,37	67,20	19,39
Queso leche pasteurizada	58,42	27,00	46,22	7,05	12,07	26,11	13,63	23,33	68,32	20,68
									35,40	76,59

(1): gr./100 gr. de muestra. (2): gr./100 gr. de extracto seco. (3): rendimiento

\* Calculado sobre el contenido graso del residuo de la extracción física.

en una columna de 25 cm de altura y 2 cm de diámetro, cargada con 16 gramos de ácido silílico y 4 de celita.

La cromatografía se desarrolló eluyendo sucesivamente con 300 ml. de cloroformo-metanol (98/2) (v/v); 150 ml de cloroformo-metanol (97/3) (v/v); 150 ml de cloroformo-metanol (96/4) (v/v); 100 ml de cloroformo-metanol (95/5) (v/v); 200 ml de cloroformo-metanol (90/10) (v/v); 200 ml de cloroformo-metanol (80/20) (v/v) y 200 ml de metanol.

Las fracciones eluidas se liberaron de disolvente, se registraron sus pesos y se cromatografiaron, por triplicado, en láminas finas de sílica gel G, que se desarrollaron con una mezcla de cloroformo-metanol-agua en las proporciones 65/24/4 (v/v/v). Una de las placas se reveló con ácido sulfúrico al 50 %, otra con yodo y la tercera con el reactivo de azul de molibdeno.

La tabla III.27 recoge los resultados obtenidos; la figura III.18 muestra las manchas detectadas en la cromatografía en lámina fina de las distintas fracciones eluidas. El análisis de los resultados revela que la casi totalidad de los lípidos neutros se eluyen con las dos primeras fases móviles utilizadas, que los lípidos polares no comienzan a ser eluidos hasta que la concentración de metanol se eleva a un 20 % (eluyente que sólo extrae parte de la mancha núm. 3 de los lípidos polares) y que la mayor parte de los lípidos polares se arrastran conjuntamente con el metanol.

Se consideró por ello conveniente sustituir este sistema de fraccionamiento por otro más simple que resolviera el conjunto de lípidos en sólo dos fracciones: apolares y polares.

TABLA III.27

Fraccionamiento de los lípidos de la cuajada y los quesos en columna de ácido silílico-celita 4/1

Soporte cromatográfico: 20 gr. Dimensiones de la columna: 25 × 2 cm. Muestras cromatografiadas: queso leche cruda 1 gr; queso leche pasteurizada: 780 mg; cuajada: 1 gr.

Fracción	Eluyente		Queso leche cruda mg	Queso leche pasteurizada mg	Cuajada mg.
	Cloroformo- metanol	ml.			
I	98/2	300	934,5	719,1	967,2
II	97/3	150	20,8	9,8	20,8
III	96/4	150	11,3	7,1	4,5
IV	95/5	100	9,4	6,5	1,9
V	90/10	200	13,6	9,9	11,2
VI	85/15	200	—	9,5	6,3
VII	80/20	200	18,3	9,8	4,9
VIII	0/100	200	25,00	23,6	28,2
Recuperación			1032,9	795,3	1045,0
Rendimiento (%)			103,29	101,96	104,5

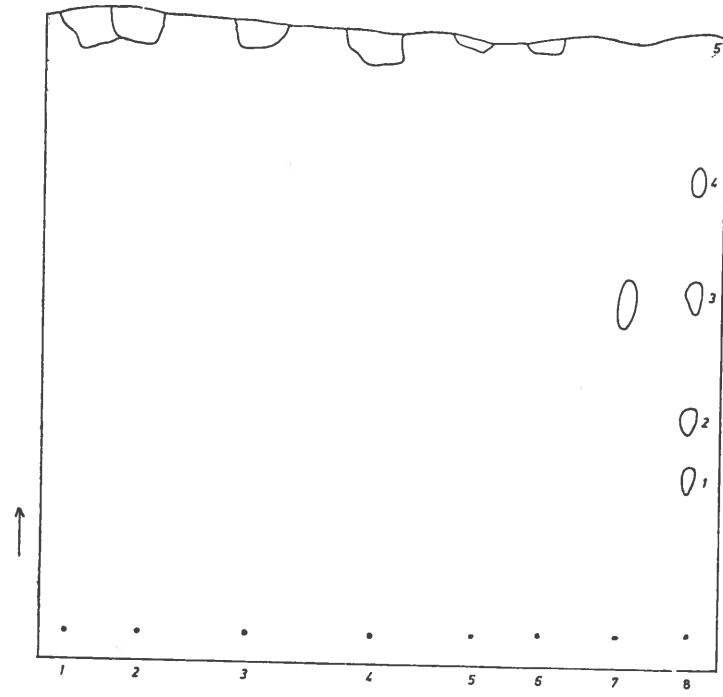


Figura III.18: Cromatografía en lámina fina de sílica gel de las distintas fracciones separadas en columna de ácido sílico-celita (4/1) a partir de los extractos lipídicos de la cuajada y de los quesos. Fase móvil. cloroformo-metanol-agua (65/25/4). Todas las manchas fueron positivas a los reactivos del iddo y del  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . Manchas 1, 2 y 3 fueron positivas también al reactivo del azul de molibdeno y la 3 al de ninhidrina.

### III.5.2.2. Separación de lípidos polares y «neutros» sobre columnas de ácido sílico-celita 1/1.

Para la separación de los lípidos en las fracciones «neutros» y polares, se utilizó, en esencia, el método de McLEOD y col (1962), incorporando al adsorbente (ácido sílico) pesos iguales de celita, eluyendo sucesivamente con cloroformo y metanol con los volúmenes indicados en II.4.6.3.2.

La marcha del fraccionamiento de las distintas muestras cromatografiadas se recogen en la tabla III.28, ejemplarizándose con dos chromatografías de los extractos obtenidos.

En la tabla III.28 bis. Se muestran los porcentajes de lípidos «neutros» y polares de la cuajada y de los quesos, que representan sobre el total del extracto lipídico. Los valores de ambos quesos se calcularon teniendo en cuenta las proporciones de los extractos físico y químico, relativas al total del extracto lipídico.

TABLA III.28  
Cromatografía de los extractos lipídicos de quesos y cuajada en columna de ácido sílico-celita (1/1)

Extracto	CUAJADA		QUESO LECHE CRUDA		QUESO LECHE PASTERIZADA	
	Total		Físico		Químico	
	1	2	1	2	1	2
Cromatografía						
Muest. chromatografiada (mg)	1082,2	2478,3	1064,4	3718,2	599,5	3723,7
Eluidos mg cloroformo %	1117,6	2243,1	1059,5	3847,9	615,0	3790,0
Eluidos mg Metanol %	98,36	98,69	99,26	99,50	98,29	98,65
Metanol mg recuperados	18,7	30,1	7,9	19,3	10,7	51,8
Rendimiento	1,64	1,31	0,74	0,50	1,71	1,35
	1136,3	2295,9	1067,4	3867,2	625,7	3841,8
	104,97	92,64	100,24	104,01	104,37	103,17
					1028,0	3381,7
					107,41	106,67
						96,00
						95,84

TABLA III.28, bis

## Porcentaje de los lípidos apolares y polares sobre el total del extracto lipídico

	Lípidos apolares	Lípidos polares
Cuajada	98,53	1,47
Queso leche cruda	98,98	1,02
Queso leche pasterizada	99,02	0,98

III.5.3. *Fraccionamiento, identificación y cuantificación de los lípidos apolares.*

Una alícuota (entre 150 y 200 mg) de la fracción eluida con cloroformo en las columnas de ácido silícico-celita 1/1, se cromatógrafió en una columna de sílica gel para fraccionar los lípidos neutros y para su posterior identificación y cuantificación.

III.5.3.1. *Comportamiento de la columna, identificación de los componentes apolares eluidos y diferencias entre los lípidos neutros de los extractos físicos y químicos.*

De acuerdo con SMITH y col. (1969), el sistema cromatógráfico empleado resuelve las mezclas de ésteres de esteroles (que deben aparecer en la fracción 3), triglicéridos (fracción 6), diglicéridos y esteroles (eluidos conjuntamente en la fracción 8) y ácidos grasos libres (eluidos en la fracción 14). En el laboratorio en que estas experiencias se han llevado a efecto, se ha demostrado que el sistema separa así los lípidos de músculo de mamífero, pero no otras mezclas de lípidos neutros en los que resulta, sin embargo, útil como sistema de purificación (LÓPEZ, 1972).

Al objeto de comprobar su utilidad en este caso y comparar los extractos físicos y químicos, se sometió a este sistema cromatógráfico una alícuota del extracto físico y otra del extracto químico del queso fabricado con leche pasterizada (tabla III.29). Los lípidos eluidos en cada fracción recogida se cromatógrafiaron en lámina fina de sílica gel G (figura III.19) y (figura III.20).

Las láminas finas revelaron: a) que la composición cualitativa de los lípidos neutros de ambos extractos es idéntica; b) que el fraccionamiento no es perfecto ni igual; c) que resulta, sin embargo, útil en cuanto permite obtener fracciones puras de algunos componentes y mezclas de varios compuestos enriquecidos en algunos de ellos.

III.5.3.2. *Fraccionamiento en columna de sílica gel e identificación de los lípidos apolares obtenidos por elución con cloroformo de las columnas de ácido silícico-celita 1/1.*

Se cromatógrafiaron del mismo modo que en el apartado anterior los cluatos clorofórmicos de las columnas de ácido silícico-celita 1/1, a que se refiere la

TABLA III.29

## Fraccionamiento sobre columna de sílica gel de los lípidos apolares de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche pasterizada

Fracción	Disolvente	ml.	Extracto físico: lípidos cromatografiados 239,7 mg. Extracto químico: 167,6 mg.		Ex. químico	
			mg	% E. L.	mg	% E. L.
1	B	20	0,0	0,00	0,9	0,37
2	B	10	2,7	1,61	2,1	0,87
3	B	20	0,8	0,48	1,1	0,45
4	B	10	0,9	0,54	0,6	0,25
5	B/EE/E (80/19/1)	10	10,2	6,08	1,4	0,58
6	B/EE/E (80/19/1)	40	130,4	77,80	175,0	73,00
7	B/EE/E (80/19/1)	50	4,4	2,63	12,8	5,34
8	B/EE/E (80/19/1)	40	3,1	1,86	5,7	2,37
9	B/EE/E (80/19/1)	30	2,0	1,19	1,6	0,66
10	B/EE/E (30/67/3)	70	3,3	1,96	2,0	0,83
11	E	40	1,3	0,77	1,2	0,50
12	E	30	0,0	0,00	2,8	1,16
13	M	10	0,0	0,00	2,8	1,16
14	M	40	3,5	2,09	8,8	3,67
15	M	10	0,0	0,00	6,8	2,83

E. L.: Extracto lipídico; B: Benceno; EE: Eter etílico; E: Etanol; M: Metanol.

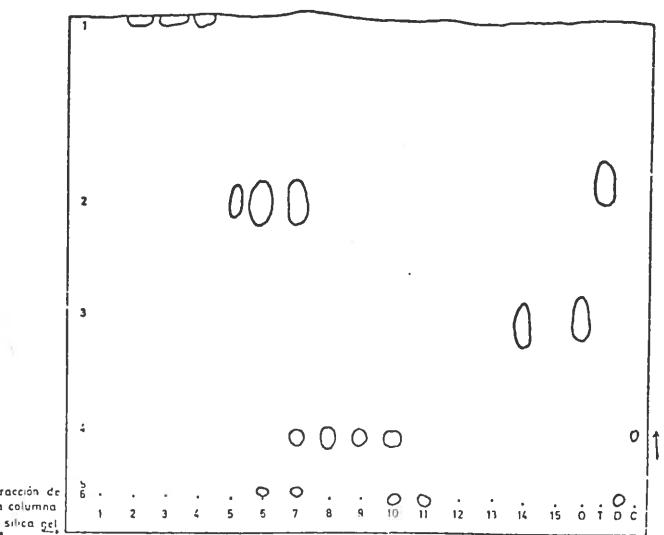


Figura III.19: Cromatografía en lámina fina de las fracciones de los lípidos apolares del queso fabricado con leche pasterizada (extracto físico) eluidas de la columna de sílica gel. Patrones: O: ácido oleico; T: tripalmitina; D: diglicéridos; C: colesterol.

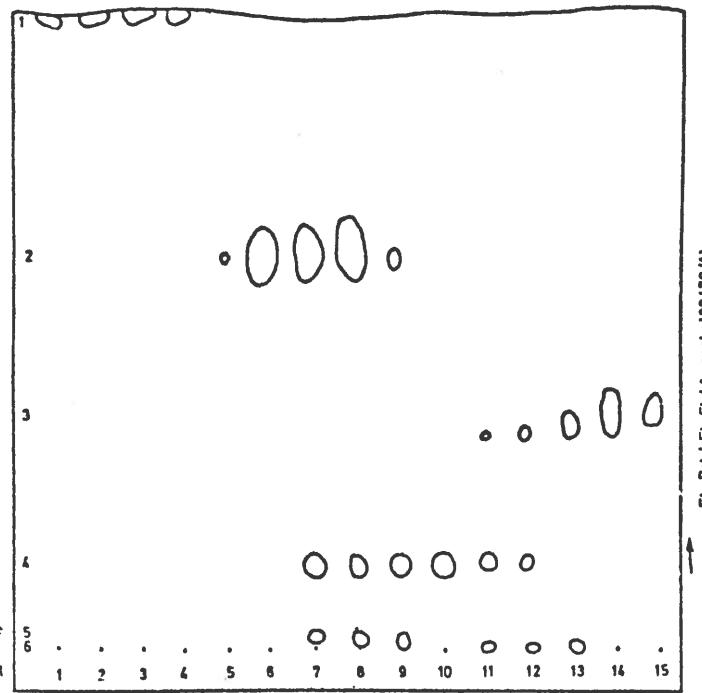


Figura III.20: Cromatografía en lámina fina de las fracciones de los lípidos apolares del queso fabricado con leche pasterizada (extracto químico) eluidas de la columna de sílica gel. tabla III.28. Para facilitar el trabajo reduciendo el número de cromatografías, se mezclaron fracciones idénticas de los eluatos pertenecientes a los extractos físico y químico de cada queso (1/4 del eluato del extracto físico del queso fabricado con leche cruda y 1/4 del eluato del extracto químico del mismo, por ejemplo) para lograr una muestra representativa del total de lípidos apolares de cada uno de ellos. En la tabla III.30 se expresan los resultados obtenidos en estas cromatografías.

Las diferentes fracciones obtenidas en las columnas de sílica gel, fueron examinadas por cromatografía en lámina fina, a las que se aplicaron también patrones de tripalmitina, ácido oléico, colesterol, mono y diglicéridos y se revelaron con iodo, ácido sulfúrico al 50 % y rodamina 6 G; los resultados obtenidos fueron similares a los mostrados en las figuras III.19 y III.20, revelando que el conjunto de los lípidos apolares de la cuajada y los distintos quesos estaba compuesto por seis tipos de sustancias:

La sustancia señalada en las figuras III.19 y III.20 con el número 1 corría con el frente de disolvente, se identificó como hidrocarburos; la mancha número 2 mostró un Rf de 0,62, idéntico al de una muestra patrón de tripalmitina cromatografiada conjuntamente y fue identificada como triglicéridos; la número 3 (de Rf 0,35, idéntico al de una muestra patrón de ácido oleico), en las placas rociadas con ro-

TABLA III.30

Fraccionamiento de los lípidos apolares de las muestras eluidas con cloroformo en la columna de á. silicico-celita 1/1

Fracción	ml	Cuajada		Queso	Leche	Cruda	Queso	Leche	Past.
		mg	% E. L.						
1	20	2,8	1,68	1,1	0,56	0,4	0,20		
2	10	3,2	1,92	2,7	1,38	4,4	2,21		
3	20	66,4	39,90	2,3	1,18	1,0	0,50		
4	10	24,1	14,48	1,6	0,82	0,7	0,35		
5	10	19,0	11,42	1,6	0,51	5,8	2,92		
6	40	45,0	27,04	147,7	75,63	152,7	76,81		
7	50	0,8	0,48	7,3	3,74	8,6	4,33		
8	40	0,3	0,18	3,6	1,84	4,4	2,21		
9	30	3,4	2,04	2,5	1,28	1,8	0,91		
10	70	3,5	2,10	2,9	1,48	2,6	1,31		
11	40	0,2	0,12	0,7	0,36	1,7	0,85		
12	30	0,1	0,06	0,2	0,10	2,4	1,21		
13	10	0,0	0,00	1,1	0,56	2,8	1,41		
14	40	7,0	4,21	6,0	3,07	6,1	3,07		
15	10	0,0	0,00	2,8	1,43	3,4	1,71		

E. L.: Extracto lipídico. Las fracciones 1-4 se eluyeron con benceno; las 5-9 con benceno-éter etílico-etanol (80/19/1); la 10 con benceno-éter etílico-etanol (30/67/3); las 11 y 12 con éter etílico y las 13-15 con metanol.

damina 6 G, dio una fluorescencia intensa, característica de los ácidos grasos libres; la mancha número 4 de Rf 0,13, idéntico al de un patrón de colesterol, mostraba en las placas rociadas con sulfúrico un color rojizo, típico de los 3 hidroxiesteroides  $\Delta^5$ , se caracterizó como fracción esteroles. Para su identificación más precisa se purificó una muestra, cromatografiándola en lámina fina preparativa (utilizando la misma fase móvil que en la cromatografía analítica), revelando con iodo los extremos de la misma y raspando la zona de la placa con la banda correspondientes y extrayéndola con éter etílico; su espectro ultravioleta en ciclohexano y etanol fue totalmente inespecífico; se sometió al test de Lieberman-Burchard, efectuando las lecturas a diversos tiempos (figura III.21); cromatografiada en fase gaseosa sobre Gas-Chrom Q en las condiciones descritas en II.4.7.1, mostró un sólo pico (figuras III.22, III.23 y III.24), con un tiempo de retención idéntico al de una muestra patrón de colesterol cromatografiada bajo las mismas condiciones. Fue pues definitivamente considerada como constituida exclusivamente por colesterol.

La mancha número 5, de Rf 0,01, idéntico al de un patrón de diglicéridos, lo que junto con su orden de elución en las columnas de sílica gel, permitió identificarla como fracción diglicéridos.

Por último, la mancha número 6, no se desplazó del origen, al igual que las muestras patrón de nonoglicéridos; habida cuenta, además, el orden de elución en las columnas de sílica gel, se caracterizó como constituida por monoglicéridos.

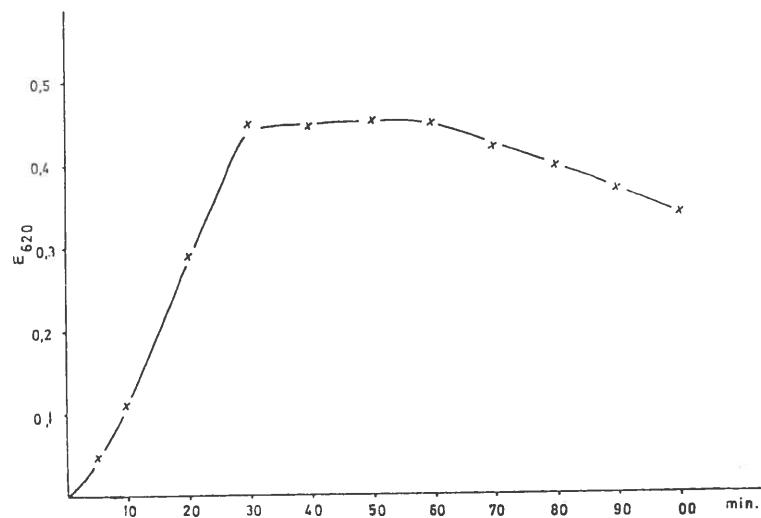


Figura III.21: Comportamiento de la fracción esteroles frente al reactivo de Liebermann-Burchard.

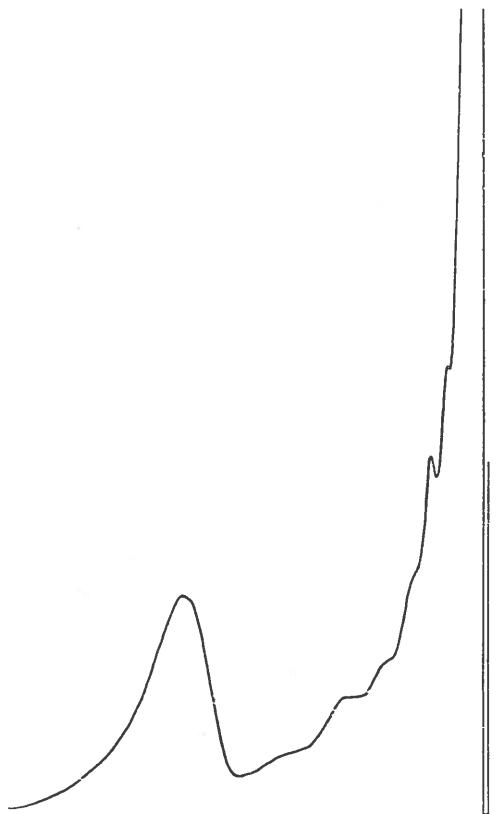


Figura III.22. Cromatografía en fase gaseosa de la fracción esteroles de la cuajada. Tiempo de retención: 16,5 minutos.

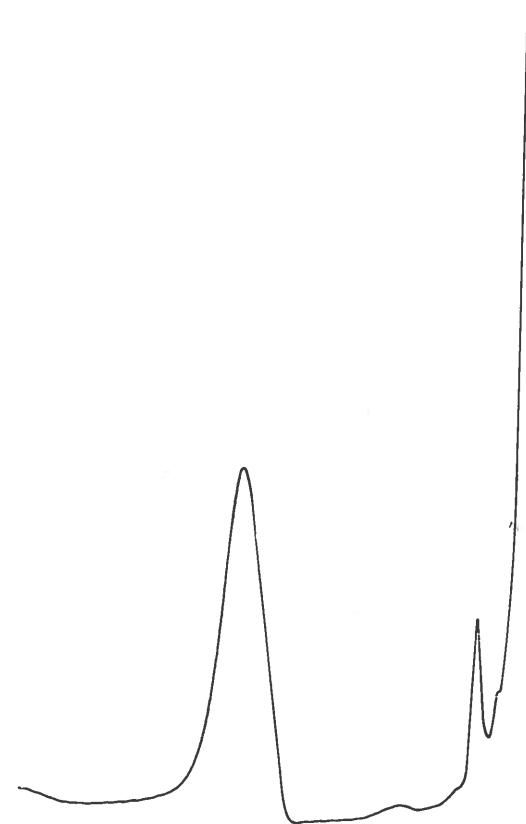


Figura III.23: Cromatografía en fase gaseosa de la fracción esteroles del queso fabricado con leche cruda. Tiempo de retención: 16,5 minutos.

### III.5.3.3. *Purificación por cromatografías en láminas finas de sílica gel, de los lípidos apolares para el análisis de ácidos grasos y para la cuantificación de distintos componentes.*

El examen por cromatografía en lámina fina de las fracciones eluidas en la columna de sílica gel, a que se refiere el apartado anterior (tabla III.30), reveló la conveniencia de agrupar, para la cuantificación directa de las sustancias que se hallaban aisladas ya en algunos de los eluatos de la columna y para la purificación previa a la cuantificación de las que se encontraban en ellos mezcladas, las fracciones eluidas en la columna de la siguiente forma:

A) *Cuajada:* fracciones 1 y 2, únicas portadoras de hidrocarburos, en las cuales se encontraban además libres de contaminación por otras sustancias; fracciones 3-7, portadoras de la totalidad de triglicéridos y diglicéridos, con restos de

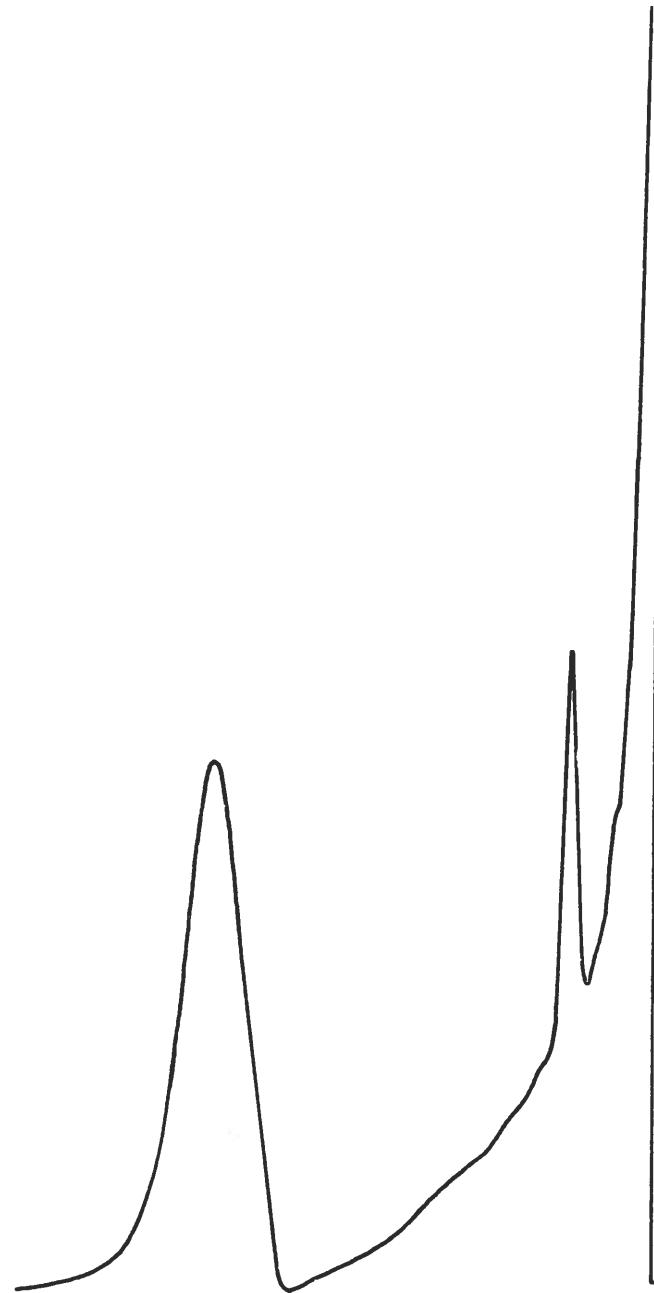


Figura III.24: Cromatografía en fase gaseosa de la fracción esteroles del queso fabricado con leche pasterizada. Tiempo de retención: 16,5 minutos.

colesterol; 8-15, con la totalidad de los ácidos grasos libres y monoglicéridos y portadoras de restos de colesterol.

B) Queso fabricado con leche cruda: fracciones 1-5, 6-8 y 9-15; cada grupo con igual contenido al señalado para los de la cuajada.

C) Queso elaborado con leche pasterizada: fracciones 1-4, 5-9 y 10-15, con la misma significación.

El peso del grupo número 1 fue considerada como base para la cuantificación de los hidrocarburos.

Los grupos 2 y 3 de cada muestra se cromatografiaron en lámina fina preparativa localizándose las bandas por exposición a los rayos ultravioletas; a continuación se rasparon y fueron extraídas con éter etílico, purificándose así los distintos componentes para el análisis de sus ácidos grasos y cuantificación de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos. La pureza de las distintas muestras se comprobó por cromatografía analítica en el mismo sistema, revelando las placas con iodo y ácido sulfúrico al 50 %.

#### III.5.3.4. *Acidos grasos de los distintos componentes de los lípidos apolares.*

##### 1) Acidos grasos libres:

Tras su metilación según se describe en II.4.7.2, las muestras se inyectaron en el cromatógrafo de gases. El tipo de columnas usadas y las condiciones de operación se indican en II.4.7.4.

Las figuras III.25, III.26 y III.27 muestran los cromatogramas obtenidos y la tabla III.31 el porcentaje de cada ácido graso sobre el total.

##### 2) Triglicéridos:

Transesterificados los ácidos grasos según se indica en II.4.7.3, se inyectaron en el cromatógrafo, efectuándose las cromatografías del mismo modo que con los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres. Los resultados obtenidos se recogen en las figuras III.28, III.29 y III.30 y en la tabla III.32.

##### 3) Diglicéridos:

Fueron transesterificados como los de los triglicéridos y cromatografiados de igual modo y bajo las mismas condiciones que sus ésteres metílicos. Los resultados se muestran en las figuras III.31, III.32 y III.33 y en la tabla III.33.

##### 4) Monoglicéridos:

Sus ácidos grasos fueron igualmente transesterificados. Las figuras III.34, III.35 y III.36 son las copias de los cromatogramas obtenidos con sus ésteres metílicos. La tabla III.34 recoge las proporciones alcanzadas por los distintos ácidos grasos identificados.

#### III.5.3.5. *Cuantificación de los lípidos apolares caracterizados.*

Los hidrocarburos y los mono—, di— y triglicéridos se cuantificaron según

TABLA III.31

Porcentaje de los ácidos grasos libres, obtenidos por elución en la columna de sílica gel. (en peso)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-8	0,17	Trazas	Trazas
C-9	0,17	0,1	—
C-10	0,51	0,8	1,64
C-11	0,17	Trazas	0,33
C-12	3,48	4,35	5,47
C-12 : 1	Trazas	Trazas	0,14
C-12 : 2	0,42	0,91	0,44
C-13	0,17	Trazas	0,11
C-14	11,29	11,08	13,60
C-14 : 1	2,6	1,44	1,96
C-14 : 2	1,71	1,82	1,57
C-15	0,34	0,40	0,37
C-16	27,73	28,75	31,77
C-16 : 1	5,24	4,25	3,93
C-16 : 2	1,42	1,26	1,04
C-17	1,99	0,70	1,09
C-18	10,27	9,31	11,22
C-18 : 1	26,70	26,42	24,16
C-18 : 2	5,99	5,46	3,16
C-18 : 3	Trazas	2,58	0,52

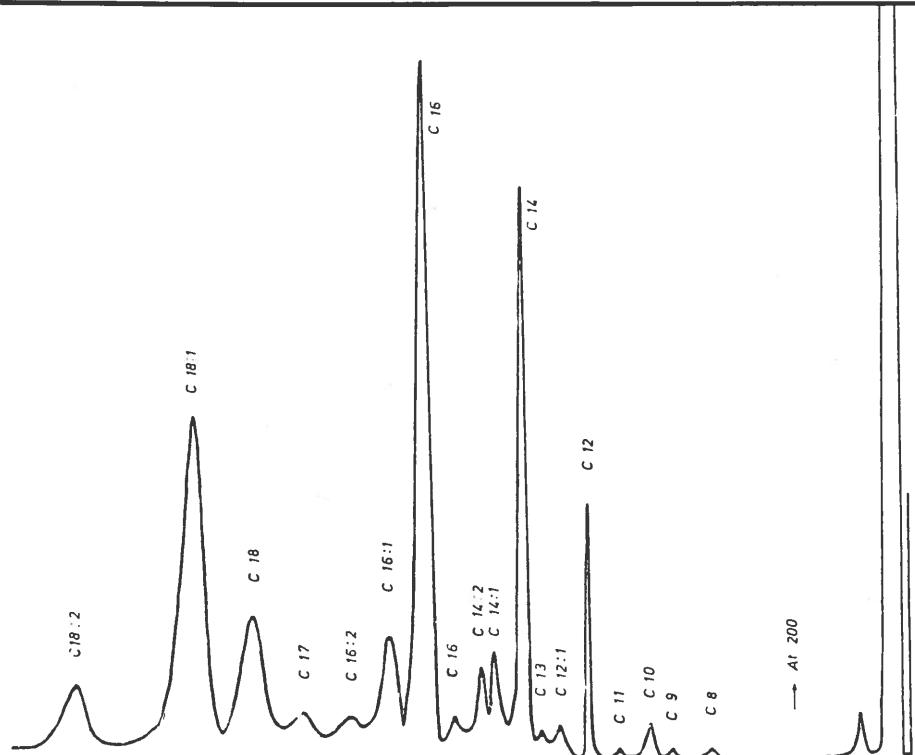


Figura III.25: Esteres metílicos de los ácidos grasos libres de la cuajada.  
50-180°C 8°C/min.

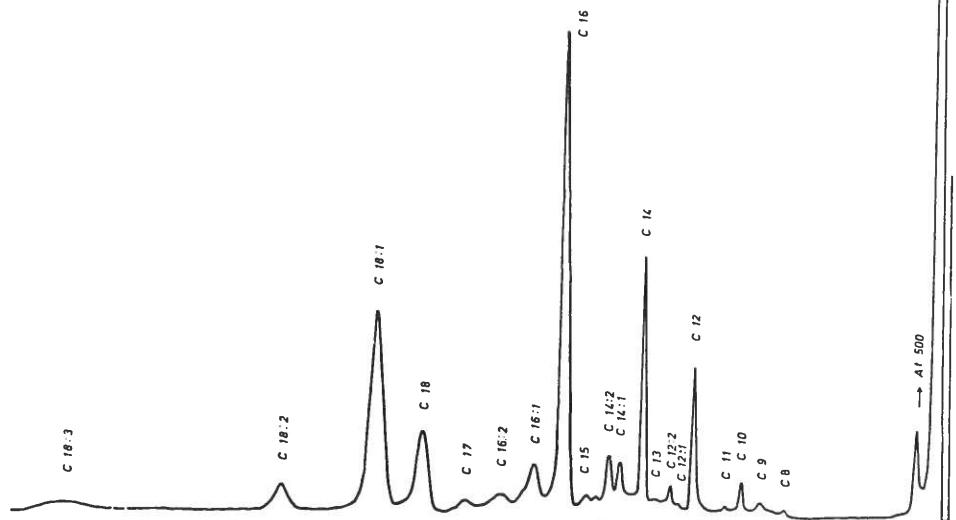


Figura III.26: Esteres metílicos de los ácidos grasos libres del queso fabricado con leche cruda. 50-180°C 8°C/min.

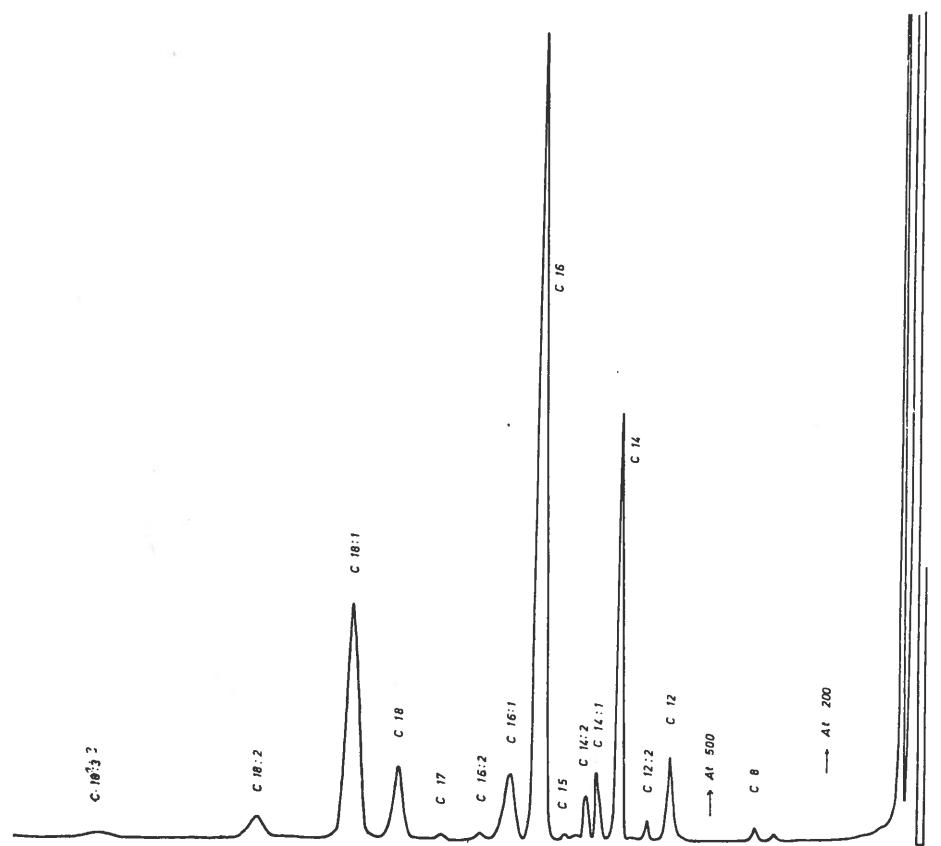


Figura III.27: Esteres metílicos de los ácidos grasos libres del queso fabricado con leche pasterizada 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.31.bis

Composición en ácidos grasos de la fracción ácidos grasos libres (mg/ 100 gr. de extracto seco)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-8	0,86	Trazas	Trazas
C-9	0,86	5,54	
C-10	2,58	11,08	27,27
C-11	0,86	Trazas	5,49
C-12	17,61	60,25	90,97
C-12 : 1	Trazas	Trazas	2,33
C-12 : 2	2,12	12,60	7,32
C-13	0,86	Trazas	1,83
C-14	57,13	153,46	226,17
C-14 : 1	10,93	19,94	35,59
C-14 : 2	8,65	25,21	26,11
C-15	1,72	5,54	6,15
C-16	140,31	398,19	528,34
C-16 : 1	26,51	58,86	65,36
C-16 : 2	7,19	17,45	17,29
C-17	10,07	9,69	18,13
C-18	51,97	128,94	186,59
C-18 : 1	135,10	365,92	401,78
C-18 : 2	30,31	75,62	52,55
C-18 : 3	Trazas	35,73	8,65

TABLA III.32

Porcentaje de los ácidos grasos de los triglicéridos (en peso)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-4 : r			
C-4	—	1,10	0,45
C-4	2,91	2,60	1,01
C-5	0,96	0,50	0,38
C-6	2,29	1,56	1,31
C-7	0,02	Trazas	0,02
C-8	1,22	1,10	1,47
C-9	0,54	0,03	Trazas
C-10	2,47	3,02	2,36
C-11	0,36	0,40	0,35
C-12	5,61	3,80	4,54
C-12 : 1	0,14	0,25	0,08
C-12 : 2	0,26	0,27	0,15
C-13 :	0,21	0,20	0,15
C-14 :	20,66	10,95	11,64
C-14 : 1	1,53	2,06	2,09
C-14 : 2	1,87	1,40	1,60
C-15 :	0,36	0,73	0,29
C-16 :	31,70	35,24	38,08
C-16 : 1	2,55	2,96	2,37
C-16 : 2	0,98	0,82	0,82
C-17 :	0,51	0,46	0,65
C-18 :	6,41	7,07	7,33
C-18 : 1	13,77	21,59	19,20
C-18 : 1	13,77	21,59	19,20
C-19 :	0,98	Trazas	Trazas
C-18 : 2	1,40	1,38	1,80
C-18 : 3	0,18	0,40	0,49

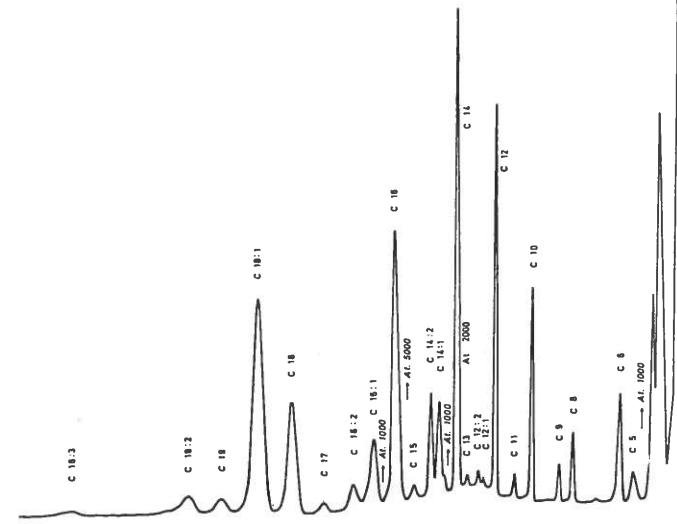


Figura III.28: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los triglicéridos de la cuajada. 50-180°C 8°C/min.

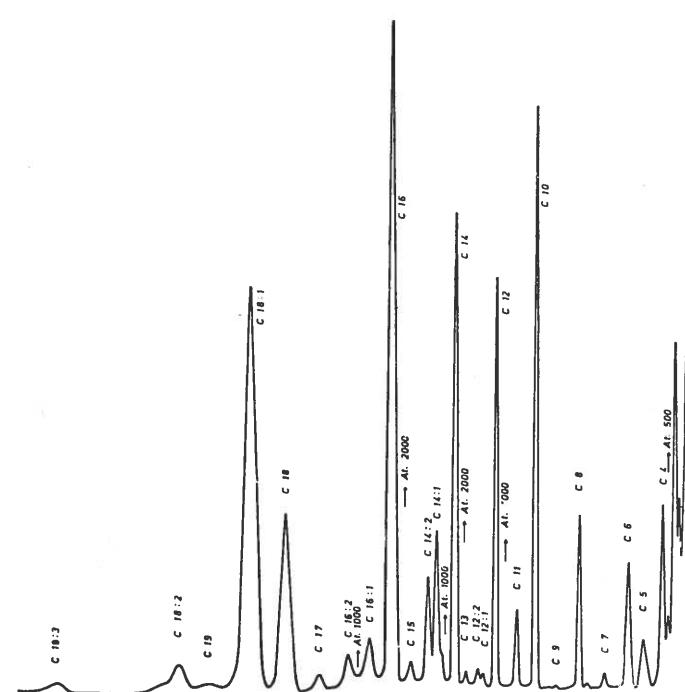


Figura III.29: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los triglicéridos del queso fabricado con leche cruda. 50-180°C 8°C/min.

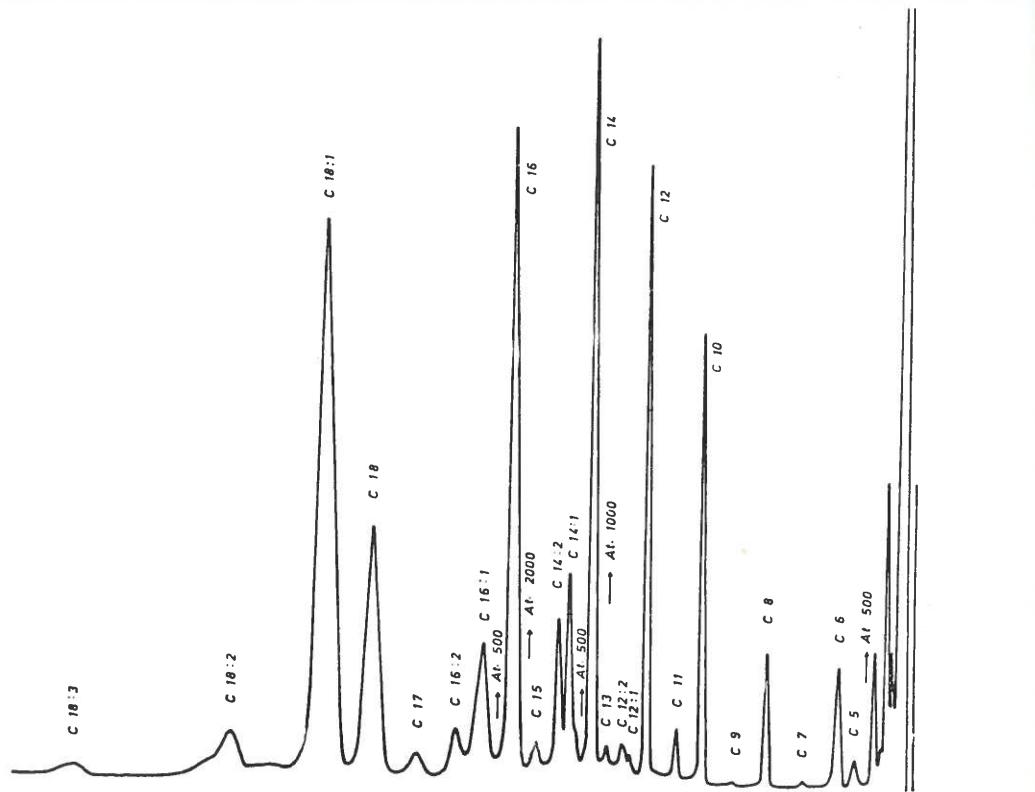


Figura III.30: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los triglicéridos del queso fabricado con leche pasteurizada. 50-180°C 8°C/ min.

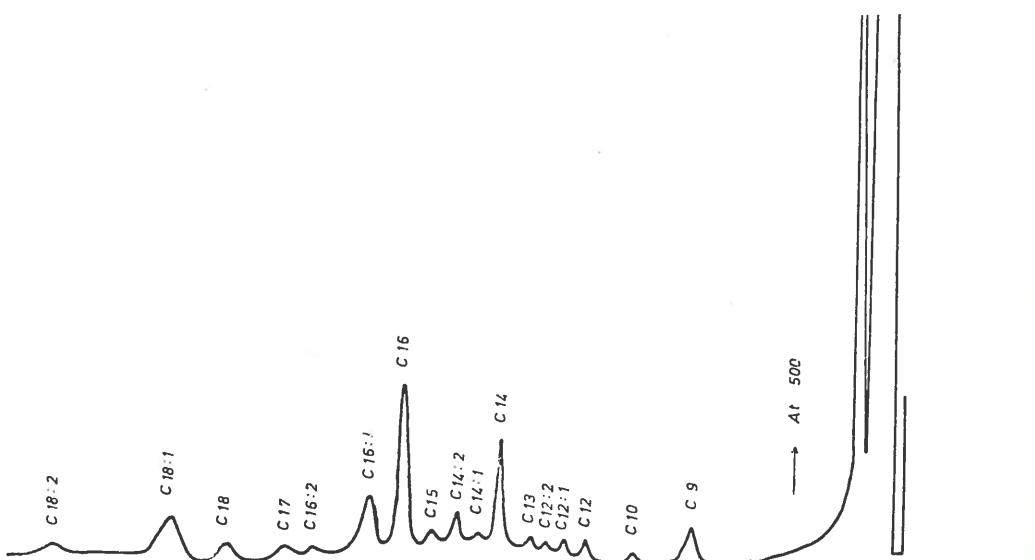


Figura III.31: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los diglicéridos de la cuajada. 50-180°C. 8°C/ min.

**TABLA III.32.bis**  
Composición en ácidos grasos de los triglicéridos (mg / 100 gr extracto seco) (1)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasteurizada
C-4 : r	—	390,5	151,1
C-4	103,1	923,0	339,1
C-4	340,1	177,5	127,6
C-5	811,3	553,8	439,8
C-6	7,1	Trazas	6,7
C-7	432,2	390,5	493,5
C-8	191,3	10,7	Trazas
C-9	875,1	1072,1	792,3
C-10	127,5	142,0	117,5
C-11	1987,6	1349,0	1524,1
C-12	49,6	88,8	26,9
C-12 : 1	92,1	95,9	50,4
C-12 : 2	74,4	71,0	50,4
C-13 :	7319,8	3887,3	3907,5
C-14 :	542,1	731,3	701,6
C-14 : 1	662,5	497,0	537,1
C-14 : 2	127,5	259,2	97,4
C-15 :	11231,3	12510,2	12783,5
C-16 :	903,5	1050,8	795,6
C-16 : 1	347,2	291,1	275,3
C-16 : 2	180,7	163,3	218,2
C-17 :	2271,1	2509,9	2460,7
C-18 : 2	4878,7	7664,5	6445,4
C-18 : 1	347,2	Trazas	Trazas
C-19 :	496,0	489,9	604,3
C-18 : 2	63,8	142,0	164,5

(1): Expresado como peso de cada ácido graso que teóricamente se obtendría por hidrólisis a partir de esta fracción.

**TABLA III.33**  
Porcentaje de los ácidos grasos de los diglicéridos (en peso)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasteurizada
C-8	—	—	0,92
C-9	7,93	Trazas	9,67
C-10	1,09	9,82	18,35
C-12	1,45	5,52	6,73
C-12 : 1	1,09	Trazas	Trazas
C-12 : 2	—	Trazas	Trazas
C-13 :	0,36	—	—
C-14 :	10,87	14,72	15,29
C-14 : 1	—	Trazas	0,61
C-14 : 2	4,35	Trazas	0,61
C-15 :	1,09	Trazas	0,61
C-16 :	34,42	36,81	28,30
C-16 : 1	11,96	5,52	2,45
C-16 : 2	—	—	—
C-17 :	2,89	—	—
C-18 :	3,62	8,58	6,12
C-18 : 1	16,35	19,02	11,01
C-18 : 2	2,54	—	—

TABLA III.33.bis

**Composición en ácidos grasos de los diglicéridos (mg / 100 gr. extracto seco) (1)**

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-8	—	—	19,6
C-9	105,5	Trazas	195,0
C-10	14,5	161,4	390,3
C-12	19,3	90,7	143,1
C-12 : 1	14,5	Trazas	Trazas
C-12 : 2	Trazas	Trazas	Trazas
C-13 :	4,8	—	—
C-14 :	144,6	212,0	325,2
C-14 : 1	Trazas	Trazas	13,0
C-14 : 2	57,9	Trazas	13,0
C-15 :	14,5	Trazas	13,0
C-16 :	457,8	605,2	601,9
C-16 : 1	159,1	90,7	52,1
C-16 : 2	Trazas	—	—
C-17 :	Trazas	—	—
C-18 :	48,1	141,1	130,2
C-18 : 1	217,5	312,7	234,2
C-18 : 2	33,8	—	—

(1): Expresado como peso de cada ácido graso que teóricamente se obtendría por hidrólisis a partir de esta fracción.

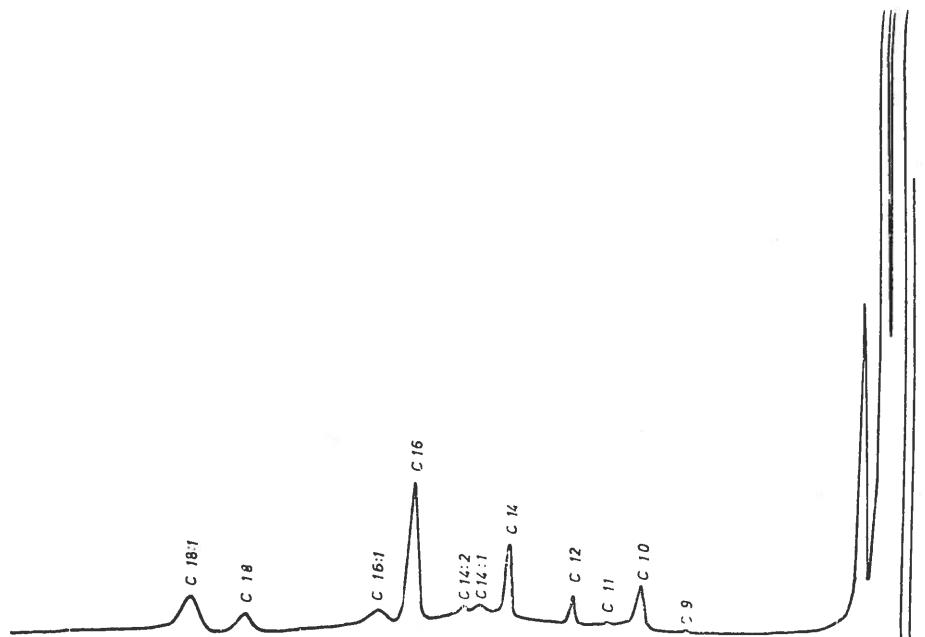


Figura III.32: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los diglicéridos del queso fabricado con leche cruda. 50-180°C 8°C/min.

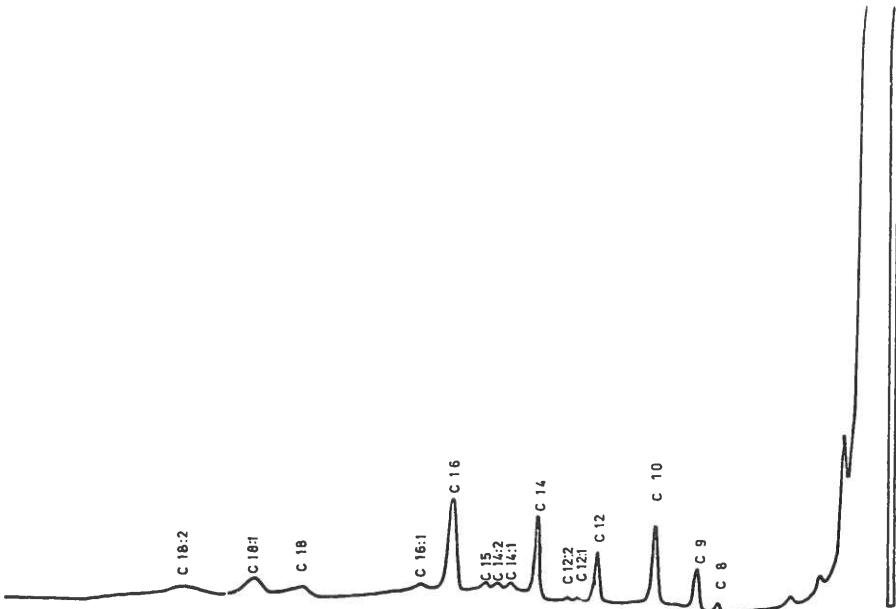


Figura III.33: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los diglicéridos del queso fabricado con leche pasterizada. 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.34

### Porcentaje de los ácidos grasos de los monoglicéridos (en peso)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-8	—	—	0,32
C-9	0,44	0,28	2,39
C-10	2,37	5,06	0,80
C-11	Trazas	Trazas	Trazas
C-12	2,37	3,37	1,11
C-12 : 1	0,15	Trazas	Trazas
C-12 : 2	0,90	0,28	Trazas
C-13 : 3	0,30	—	—
C-14 :	8,88	7,86	4,14
C-14 : 1	0,90	Trazas	1,91
C-14 : 2	2,38	3,65	0,48
C-15 :	1,33	0,28	Trazas
C-16 :	42,69	32,58	32,64
C-16 : 1	5,92	3,93	4,30
C-16 : 2	1,77	4,21	0,48
C-17 :	1,63	1,12	0,32
C-18 :	4,73	10,67	7,17
C-18 : 1	18,93	22,47	30,57
C-18 : 2	4,44	4,21	13,37

TABLA III.34.bis

Composición en ácidos grasos de los monoglicéridos (mg / 100 gr. extracto seco) (1)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-8	—	—	3,1
C-9	4,5	3,5	23,1
C-10	21,2	63,6	7,7
C-11	Trazas	Trazas	Trazas
C-12	24,2	12,3	10,7
C-12 : 1	1,5	Trazas	Trazas
C-12 : 2	9,2	3,5	Trazas
C-13	3,1	—	—
C-14	90,5	98,7	40,0
C-14 : 1	9,2	Trazas	18,5
C-14 : 2	24,3	45,8	1,6
C-15	13,6	3,5	Trazas
C-16	435,0	409,2	315,6
C-16 : 1	60,3	49,4	41,6
C-16 : 2	18,0	52,9	4,6
C-17	16,2	14,1	3,1
C-18	48,2	134,0	69,3
C-18 : 1	192,9	282,2	295,6
C-18 : 2	45,2	52,9	129,3

(1): Expresados como peso de cada ácido graso que teóricamente se obtendría por hidrólisis a partir de esta fracción.

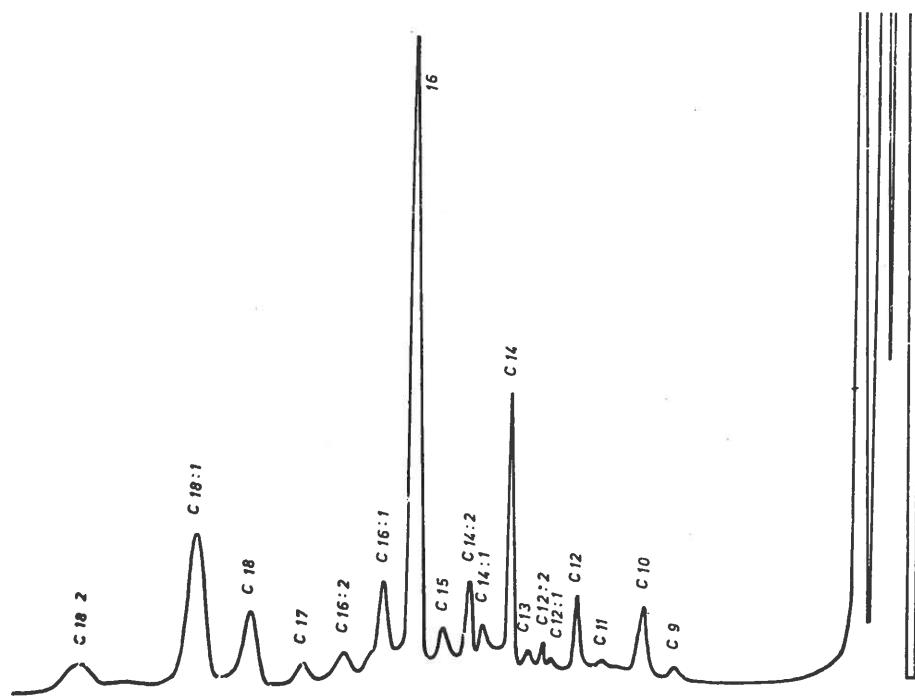


Figura III.34: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los monoglicéridos de la cuajada. 50-180°C 8°C/min.

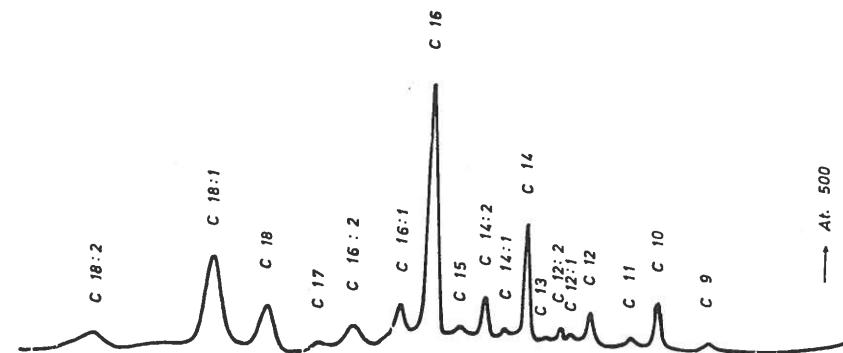


Figura III.35: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los monoglicéridos del queso fabricado con leche cruda. 50-180°C 8°C/min.

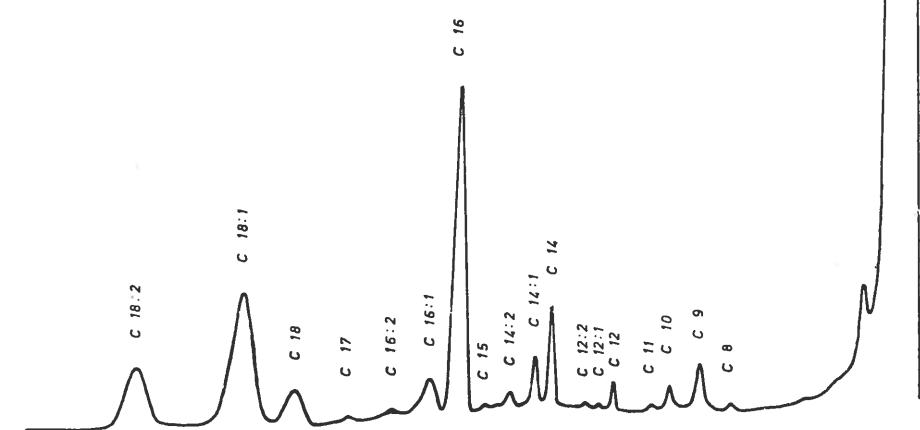


Figura III.36: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los monoglicéridos del queso fabricado con leche pasterizada. 50-180°C 8°C/min.

se indica en II.4.9.2; los ácidos grasos libres según se describe en II.4.9.2. El colesterol se cuantificó saponificando muestras de los lípidos apolares sin fraccionar (véase II.4.6.5) y efectuando sobre los insaponificables el test de Liebermann Burchard (II.4.9.3).

La composición de los lípidos apolares de las distintas muestras se recoge en la tabla III.35.

**TABLA III.35**  
Porcentaje de los lípidos apolares caracterizados

	Cuajada		Queso leche cruda		Queso leche pasteurizada	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Triglicéridos	86,65	87,94	80,07	80,95	79,55	80,50
Diglicéridos	3,05	3,09	3,92	3,97	5,20	5,27
Monoglicéridos	2,71	2,75	3,50	3,54	2,69	2,73
A. grasos libres	1,04	1,05	2,96	3,01	3,60	3,66
Colesterol	0,27	0,28	0,22	0,23	0,23	0,24
Hidrocarburos	1,20	1,22	1,28	1,29	1,00	1,01
Total insaponificable	5,78	5,87	5,88	5,95	4,93	4,99

(1) Porcentaje sobre el extracto lipídico total.

(2) Porcentaje sobre el total de lípidos apolares.

### III.5.3.6. Comparación de los lípidos apolares de los extractos físicos y químicos del queso.

Alícuotas de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche pasteurizada que mostraban, según se indica en III.5.3.1, igual composición cualitativa, fueron independientemente sometidos al mismo proceso de fraccionamiento, análisis de los ácidos grasos libres y de los triglicéridos. Igualmente se cuantificaron sus diversos componentes.

La tabla III.36 compara las tasas alcanzadas, en ambos extractos, por cada uno de los componentes del conjunto de lípidos apolares. Las figuras III.37, III.38, III.39 y III.40 son copia de los cromatogramas de los ésteres metílicos de los ácidos grasos libres y de los triglicéridos y las tablas III.37 y III.38 el porcentaje de cada ácido sobre el total.

**TABLA III.36**  
Porcentaje de los lípidos apolares de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche pasteurizada

	T	D	M	AG	C	H	I
Extracto físico	80,50	5,27	2,73	3,60	4,98	1,00	4,99
Extracto químico	81,90	6,15	2,84	3,65	4,48	1,20	4,66

T: triglicéridos; D: diglicéridos; M: monoglicéridos; AG: ácidos grasos; C: colesterol; H: hidrocarburos; I: insaponificables. Los resultados se expresan en % sobre el total de lípidos apolares, excepto el colesterol (% sobre el total de insaponificables).

**TABLA III.37**  
Porcentaje de los ácidos grasos libres de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche pasteurizada

	Extracto físico	Extracto químico
C-8	0,32	Trazas
C-10	—	1,64
C-11	—	0,33
C-12	2,02	5,47
C-12:1	Trazas	0,14
C-12: 2	0,56	0,44
C-13	Trazas	0,11
C-14	10,38	13,60
C-14: 1	2,92	1,96
C-14: 2	2,06	1,57
C-15	0,48	0,37
C-16	35,59	31,77
C-16: 1	4,62	3,93
C-16: 2	0,73	1,04
C-17	0,97	1,09
C-18	10,81	11,22
C-18: 1	25,55	24,16
C-18: 2	3,16	3,16
C-18: 3	Trazas	0,52

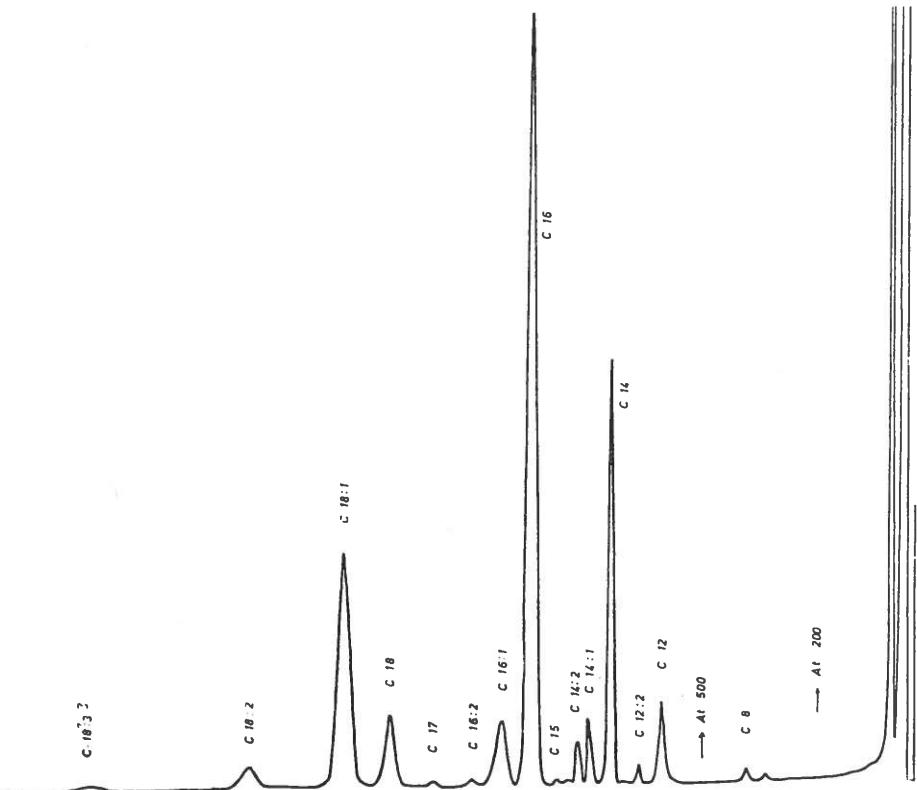


Figura III.37: Esteres metílicos de los ácidos grasos libres del queso fabricado con leche pasteurizada. (Extracto físico) 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.38

Porcentaje de los ácidos grasos de los triglicéridos de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche pasterizada

	Extracto físico	Extracto químico
C-4	1,46	1,85
C-5	0,38	0,43
C-6	1,31	1,95
C-7	0,02	0,02
C-8	1,47	1,38
C-9	Trazas	0,13
C-10	2,36	3,54
C-11	0,35	0,40
C-12	4,54	4,59
C-12 : 1	0,08	0,11
C-12 : 2	0,15	0,18
C-13	0,15	0,11
C-14	11,64	14,33
C-14 : 1	2,09	2,01
C-14 : 2	1,60	0,92
C-15	0,29	0,32
C-16	38,08	34,45
C-16 : 1	2,37	2,21
C-16 : 2	0,82	1,09
C-17	0,65	0,47
C-18	7,33	7,26
C-18 : 1	19,20	17,36
C-19	Trazas	0,39
C-18 : 2	1,80	1,35
C-18 : 3	0,49	0,98

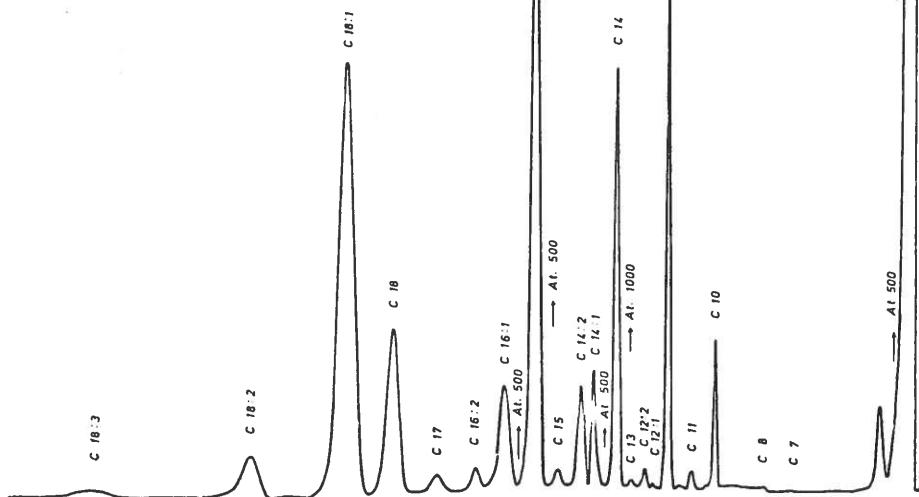


Figura III.38: Esteres metílicos de los ácidos grasos y libres del queso fabricado con leche pasterizada (Extracto químico) 50-180°C 8°C/min.

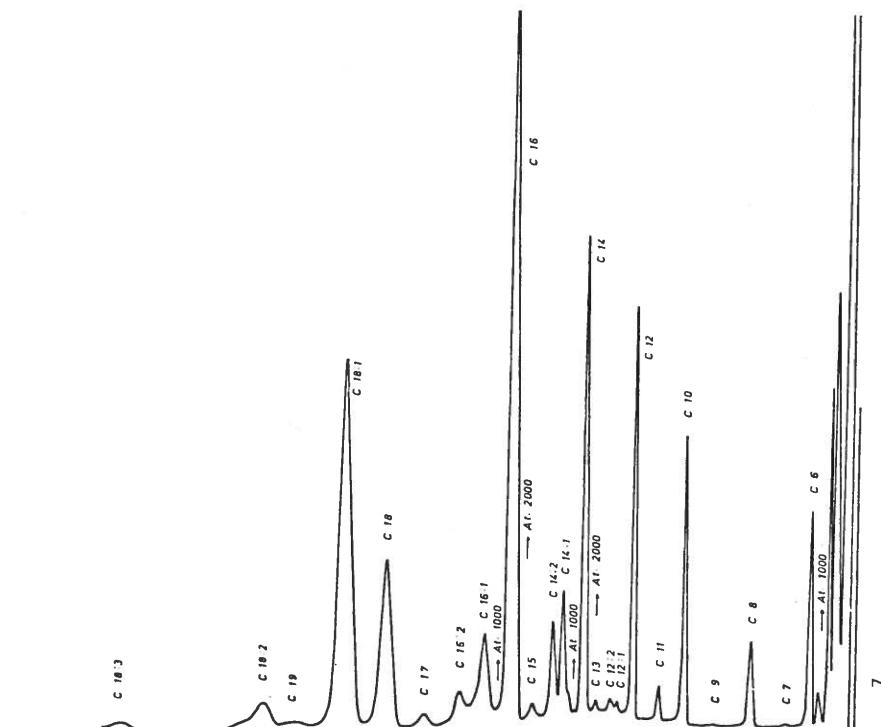


Figura III.39: Esteres metílicos de los triglicéridos del queso fabricado con leche pasterizada. (Extracto físico). 50-180°C 8°C/min.

#### III.5.4. Fraccionamiento, identificación y cuantificación de los lípidos polares.

Alícuotas de los lípidos polares eluidos de las columnas de ácido silícico-celita (1/1) (p/p) con metanol, se cromatografiaron en 6 láminas de sílica gel G; se desarrollaron con cloroformo/metanol/agua (65/25/4) (v/v/v). Cada lámina fina fue revelada con alguno de los siguientes reactivos: reactivo de IK, reactivo de ninhidrina, reactivo de azul de molibdeno, reactivo de  $I_2$ , reactivo de Schiff y ácido sulfúrico al 50 %.

Se pusieron así de manifiesto nueve manchas (figura III.41). Las números 1, 2 y 3 (de  $R_f$  0,03, 0,07 y 0,09, respectivamente) sólo fueron puestas de manifiesto con el reactivo de ninhidrina, apareciendo como pequeños puntos de color naranja-violeta.

La mancha n.º 4, de  $R_f$  0,23, dio reacción positiva frente a los reactivos de ninhidrina, iodo y azul de molibdeno y negativa frente a los demás reactivos específicos. Fue cromatografiada junto con una muestra patrón de lisofosfatidiletanolamina y cromatografiada con ella en el mismo sistema. El  $R_f$  del patrón y de la muestra problema fue idéntico. Se identificó, por tanto, como lisofosfatidiletanolamina. Sólo se detectó en la cuajada.

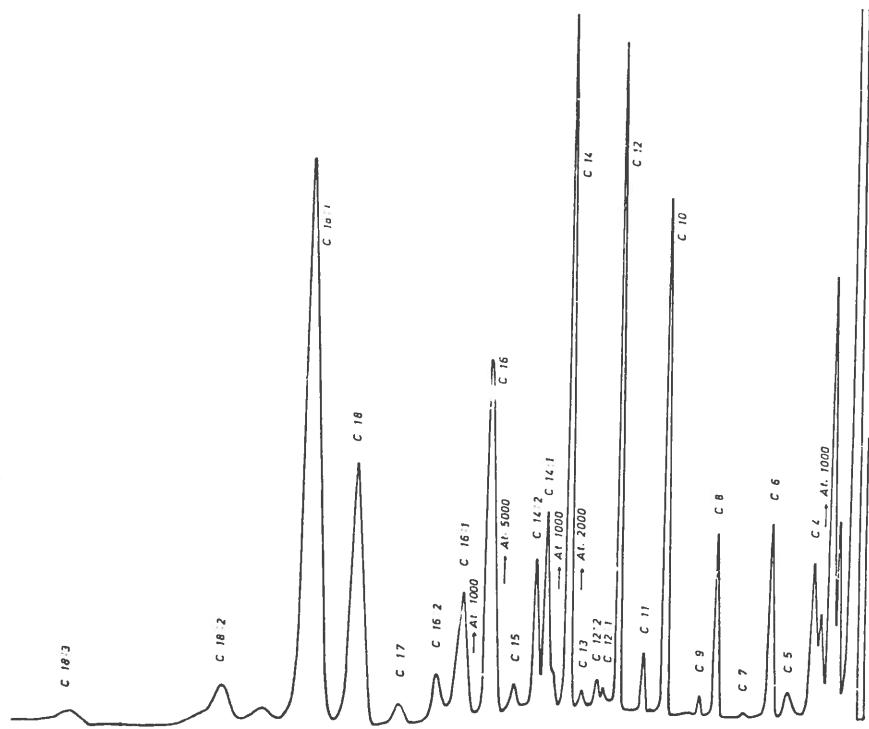


Figura III.40: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los triglicéridos del queso fabricado con leche pasteurizada. (Extracto químico) 50-180°C

La mancha n.º 5 de Rf 0,27, se mostró positiva frente al iodo y los reactivos de iodo-ioduro potásico y azul de molibdeno; no reaccionó al ser revelada con el resto de los reactivos específicos; cromatografiada con una muestra patrón de esfingomielina mostró las mismas características e igual Rf. Fue detectada en todas las muestras.

La mancha n.º 6, encontrada, al igual que la anterior, en todas las muestras de queso y cuajada, tuvo un Rf de 0,36. La reacción frente a los reactivos de iodo-ioduro potásico, azul de molibdeno y iodo fue positiva. Dio, en cambio, respuesta negativa al rociar las placas con los reactivos de ninhidrina y Schiff. El Rf fue el mismo (0,36) que el de una muestra patrón de lecitina cromatografiada con ella. Se identificó como fosfatidilcolina.

La mancha n.º 7, de Rf 0,57, presente también en todas las muestras, resultó positiva al reactivo de la ninhidrina, al de iodo y al de azul de molibdeno y negativa frente a los de Schiff y grupos colina (I + IK). Corrió en la lámina de sílica gel G de una forma idéntica a una muestra patrón de fosfatidiletanolamina, con la que se identificó.

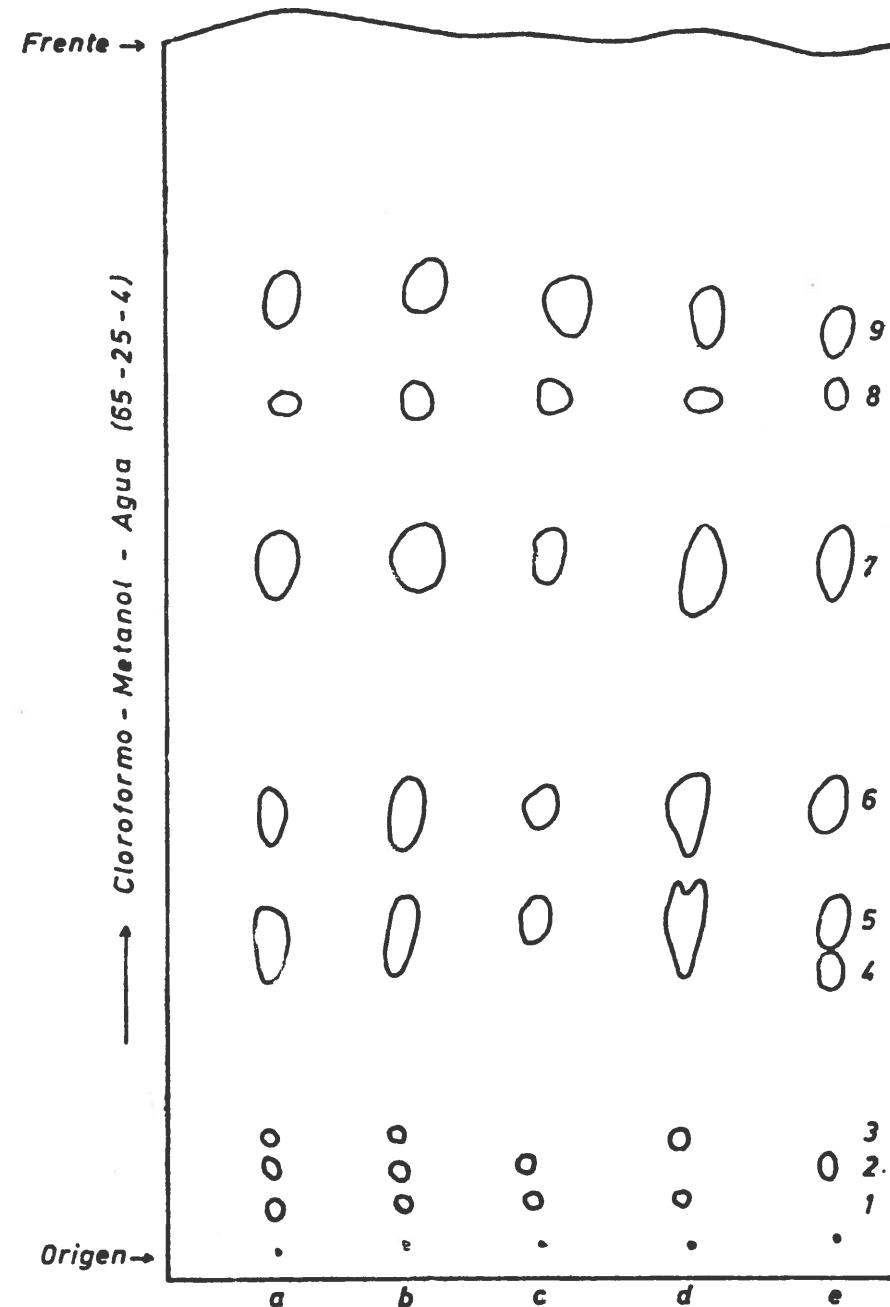


Figura III.41: Cromatografía en lámina fina de sílica gel de los lípidos polares eluidos de la columna de ácido silícico-celita (1/1). Revelador: iodo. a: Queso leche cruda, extracto físico; b: queso leche cruda, extracto químico; c: queso leche pasteurizada, extracto físico; d: queso leche pasteurizada, extracto químico; e: cuajada, extracto total.

La n.º 8, detectada tanto en la cuajada como en los quesos, se mostró negativa frente a todos los reactivos específicos, excepto al de Schiff. Su Rf fue de 0,71. Se consideró provisionalmente como un glicosilglicérido.

La mancha n.º 9, detectada en todas las fracciones, se mostró negativa frente a todos los reactivos específicos. Frente al reactivo de Schiff dio una reacción dudosa. Dado su Rf, de 0,77, próximo aunque algo superior a la cardiolipina, se caracterizó provisionalmente como cerebrósidos.

La tabla III.39 resume el comportamiento de cada mancha frente a los reactivos utilizados.

TABLA III.39

Comportamiento de cada mancha frente a los reactivos utilizados

Mancha n.º	Rf	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 50 %	Azul molibdeno	I <sub>2</sub>	Schiff	Ninhydrina	I + IK	Identificación
4	0,23	+	+	+	—	+	—	Lisofosfatidiletanolamina
5	0,27	+	+	+	—	—	+	Esfingomielina
6	0,36	+	+	+	—	—	+	Fosfatidicolina
7	0,57	+	+	+	—	+	—	Fosfatidiletanolamina
8	0,71	+	—	+	+	—	—	Glicosilglicéridos (1)
9	0,77	+	—	+	?	—	—	Cerebrósidos (1)

?: reacción dudosa. (1): provisionalmente.

#### III.5.4.1. Caracterización de los cerebrósidos y glicosilglicéridos identificados provisionalmente como tales.

La caracterización de los presuntos cerebrósidos y glicosilglicéridos se realizó mediante el estudio de sus productos de hidrólisis, por cromatografía descendente en papel Whatman n.º 1.

Las muestras se purificaron mediante cromatografía preparativa en lámina fina y se hidrolizaron y estudiaron sus productos de hidrólisis siguiendo las técnicas descritas en II.4.6.8.

Cromatografiados sus productos de hidrólisis junto con patrones de glicerol, manosa, glucosa y galactosa, se detectaron las siguientes manchas (figura III.42).

La mancha n.º 1, de Rf 0,42, se mostró positiva frente al reactivo de Schiff y

negativa frente al del nitrato de plata y ninhidrina. Corrió en el papel Whatman n.º 1 de una forma idéntica a una muestra patrón de glicerol con el que se identificó.

La mancha n.º 2, de Rf 0,33, idéntico al de la glucosa, dio positiva al reactivo de Schiff y al del nitrato de plata y negativa al de ninhidrina.

La mancha n.º 3, de Rf 0,15, fue negativa a los reactivos de nitrato de plata y de Schiff y positiva al de ninhidrina.

Los cerebrósidos se confirmaron como tales, al poseer glucosa y base nitrogenada y carecer de glicerol.

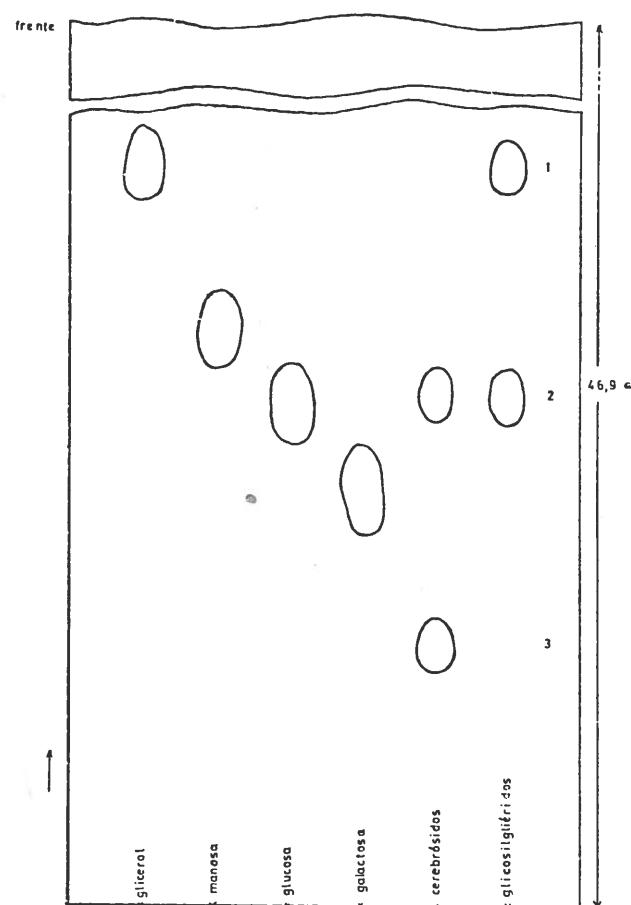


Figura III.42: Cromatografía en papel Whatman n.º 1 de los productos de hidrólisis de los cerebrósidos y glicosilglicéridos.

Fase móvil: n-butanol-piridina-agua (6/4/3) (v/v/v) Distancias migradas: glicerol: 20 cm; manosa: 15,6 cm.; glucosa: 13,6 cm.; galactosa: 11,4 cm.; mancha n.º 1: 20 cm.; mancha n.º 2: 13,6 cm. y mancha n.º 3: 6,9 cm.

La confirmación de la identidad de los glicosilglicéridos se realizó al comprobar la existencia de glicerol y glucosa en sus productos de hidrólisis.

#### III.5.4.2. *Naturaleza del glicosilglicérido.*

Una alícuota del hidrolizado a que se refiere el apartado anterior fue utilizada para la determinación del glicerol y glucosa (véase II.4.11). Los resultados obtenidos aparecen en la tabla III.39.bis.

**TABLA III.39.bis**

**Contenido en glicerol y glucosa de los hidrolizados de los glicosilglicéridos de la cuajada y los quesos**

Muestra	GLICEROL		GLUCOSA		Relación molar glucosa/glicerol
	μg/ml	μ moles/ml	μg/ml	μ moles/ml	
Cuajada	13	0,1411	49,66	0,2758	1,955
Queso leche cruda	14	0,1570	50,86	0,2825	1,860
Queso leche pasterizada	13,5	0,1498	50,42	0,2801	1,870

#### III.5.4.3. *Ácidos grasos de los lípidos polares.*

Las muestras de lípidos polares obtenidas por elución en las columnas de ácido silícico-celita (1/1), se cromatografiaron, para su purificación en lámina fina. Las placas se prepararon con sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (impregnada con sustancias orgánicas fluorescentes). Una vez desarrollada la cromatografía, se expusieron las placas bajo los rayos de una lámpara de luz ultravioleta; las bandas detectadas se rasparon con ayuda de una espátula. Las porciones de sílica gel así obtenidas se extrajeron con metanol y se separaron del adsorbente mediante filtración a través de papel Ederol n.º 2. La pureza de los distintos componentes se comprobó cromatografando una alícuota de los lípidos recuperados, revelando las placas con iodo.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los distintos lípidos polares se obtuvieron por transesterificación, según se describe en el apartado II.4.7.3.

Las figuras III.43, III.44, III.45, III.46 y III.47 muestran los cromatogramas de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de la esfingomielina de la cuajada (extracto total) y de los quesos fabricados con leche cruda y pasterizada (extractos físico y químico). La Tabla III.40 recoge los porcentajes de cada ácido graso sobre el total de los que componen el conjunto de moléculas de esfingomielina presentes en los quesos. Las cifras que figuran en esta tabla se obtuvieron por cálculo, teniendo en cuenta: a) las proporciones relativas de extracto físico y químico y su

contenido en esfingomielina y b) los datos de las tablas III.41 y III.42 que recogen la composición porcentual de los ácidos grasos de la esfingomielina de cada uno de los extractos.

Las figuras III.48, III.49, III.50, III.51 y III.52 muestran los cromatogramas de los ésteres metílicos de los ácidos grasos de la lecitina de la cuajada y los quesos (extracto físico y químico en los quesos) y las tablas III.44 y III.45 los porcentajes del total de ácidos grasos que cada uno representa en la lecitina de los extractos físico y químico de los quesos. La tabla III.43 compara la composición en ácidos grasos de la lecitina de la cuajada y de los dos tipos de quesos, teniendo en cuenta las mismas observaciones que se hacen para la esfingomielina.

Las figuras III.53, III.54, III.55, III.56 y III.57 y las tablas III.46, III.47 y III.48 recogen los mismos datos relativos a la fosfatidiletanolamina y las figuras

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C.6	—	0,04	—
C.8	Trazas	0,07	0,05
C.9	Trazas	0,09	0,11
C.10	0,33	0,61	0,14
C.11	Trazas	0,04	Trazas
N. I.	Trazas	—	—
C.12	0,37	1,08	1,23
C.12 : 1	Trazas	0,07	Trazas
C.12 : 2	0,12	Trazas	Trazas
C.13	0,03	0,07	Trazas
C.14	6,39	4,47	6,68
N. I.	0,31	0,09	Trazas
C.14 : 1	0,78	0,25	1,87
C.14 : 2	2,04	1,51	1,22
N. I.	—	Trazas	—
C.15	0,61	0,30	1,29
C.16	25,57	21,43	27,90
C.16 : 1	2,78	2,08	3,34
N. I.	1,30	—	Trazas
C.16 : 2	1,11	0,76	1,50
C.17	0,94	0,61	0,95
C.18	8,89	24,47	22,23
C.18 : 1	34,18	35,38	28,47
C.18 : 2	8,65	5,59	2,21
*N.I.	—	0,41	0,73
C.20	0,42	Trazas	—
C.18 : 3	3,89	0,58	Trazas
S. C.20	1,85	—	—

N. I.: No identificado

S. C.20: Superiores al C.20.

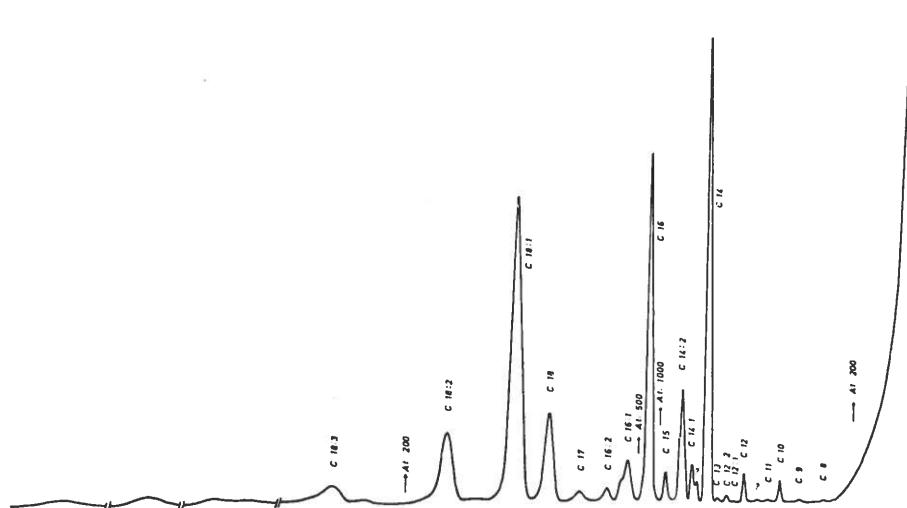


Figura III.43: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la esfingomielina de la cuajada (extracto total). 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.41

Ácidos grasos de la esfingomielina de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche cruda (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Extracto físico	Extracto químico
C-6	0,10	—
C-8	0,15	—
C-9	0,20	—
C-10	0,99	0,31
C-11	0,10	—
C-12	1,68	0,62
C-12:1	0,15	Trazas
C-12:2	Trazas	Trazas
C-13	0,15	Trazas
C-14	5,56	3,62
N. I.	0,20	Trazas
C-14:1	0,30	0,21
C-14:2	1,04	1,87
N. I.	Trazas	—
C-15	0,15	0,42
C-16	26,05	17,81
C-16:1	3,36	1,87
C-16:2	0,74	0,78
C-17	0,59	0,62
C-18	20,13	27,87
C-18:1	33,94	39,74
C-18:2	5,43	5,72
N. I.	Trazas	0,73
C-20	—	—
C-18:3	—	1,04

N. I.: No identificado.

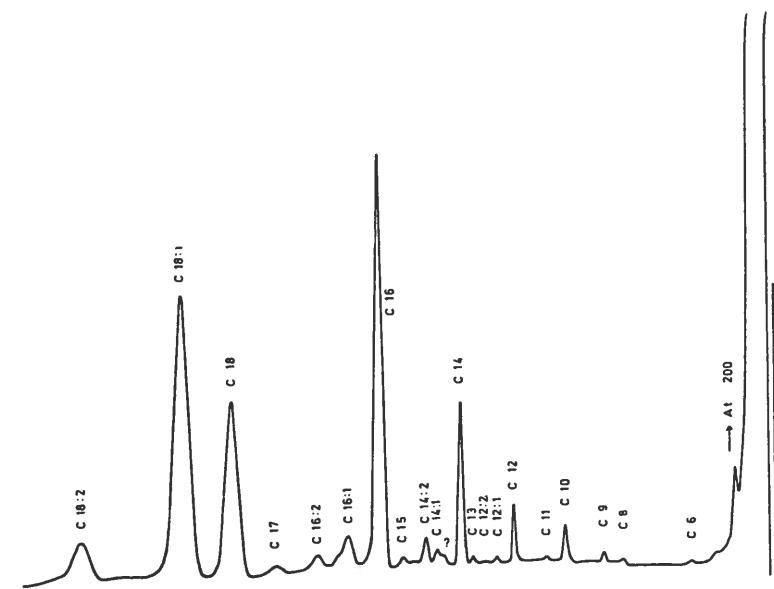


Figura III.44: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la esfingomielina del queso fabricado con leche cruda (extracto físico) 50-180°C 8°C/min.

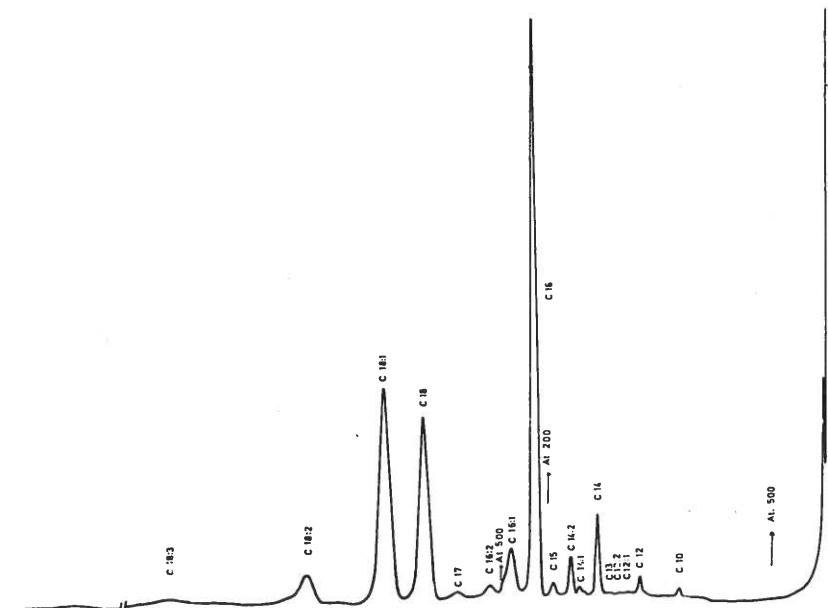


Figura III.45: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la esfingomielina del queso fabricado con leche cruda (extracto químico). 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.42

Ácidos grasos de la esfingomielina de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche pasterizada (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Extracto físico	Extracto químico
C-8	0,14	Trazas
C-9	Trazas	0,16
C-10	0,42	—
C-11	Trazas	Trazas
C-12	1,90	0,88
C-12 : 1	Trazas	Trazas
C-12 : 2	Trazas	Trazas
C-13	Trazas	Trazas
C-14	7,48	6,27
C-14 : 1	0,14	2,77
C-14 : 2	0,69	1,50
C-15	1,11	1,38
C-16	34,45	24,51
C-16 : 1	2,07	4,00
N. I.	—	Trazas
C-16 : 2	1,39	1,55
C-17	0,55	1,16
C-18	20,51	23,12
C-18 : 1	27,44	29,01
C-18 : 2	1,66	2,50
N. I.	Trazas	1,11
C-18 : 3	Trazas	—

N. I.: No identificado.

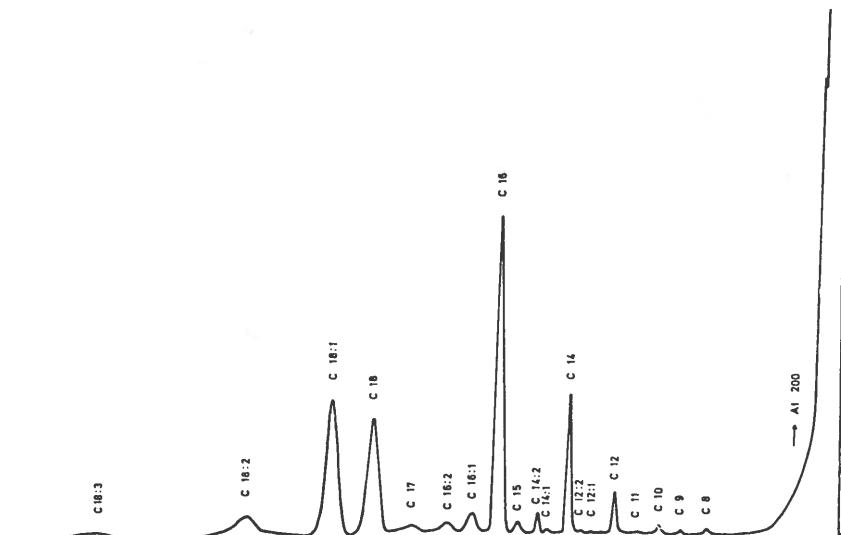


Figura III.46: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la esfingomielina del queso fabricado con leche pasterizada. (Extracto físico). 50-180°C 8°C/min.

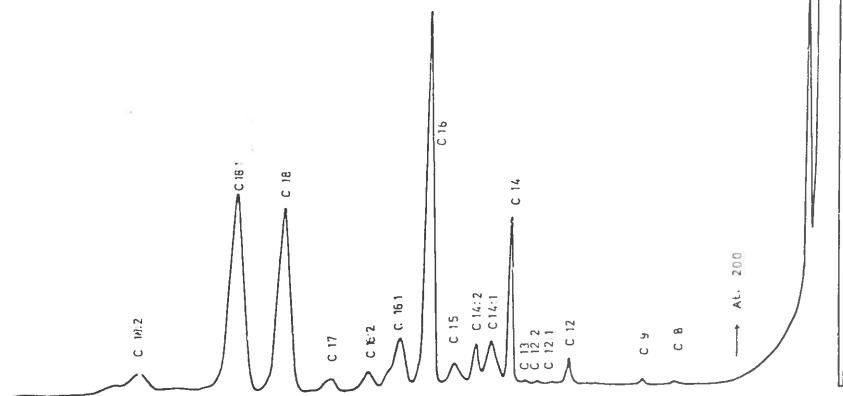


Figura III.47: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la esfingomielina del queso fabricado con leche pasterizada (extracto químico) 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.43

Ácidos grasos de la lecitina (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-8	—	0,04	0,21
C-9	—	—	0,15
C-10	0,21	0,11	0,10
C-11	Trazas	0,02	0,08
C-12	0,11	0,62	0,74
C-12 : 1	Trazas	Trazas	Trazas
C-12 : 2	Trazas	Trazas	0,10
C-13	Trazas	0,04	Trazas
C-14	7,43	6,45	6,54
N. I.	—	0,26	Trazas
C-14 : 1	0,21	0,54	1,90
C-14 : 2	2,06	1,85	1,86
N. I.	—	—	0,38
C-15	0,41	0,69	0,73
C-16	27,85	32,35	39,87
C-16 : 1	3,47	3,12	4,36
N. I.	—	—	Trazas
C-16 : 2	0,72	0,96	1,37
C-17	Trazas	1,00	0,93
C-18	23,82	12,83	11,74
C-18 : 1	30,94	32,17	25,22
C-19	—	0,20	—
C-18 : 2	2,47	5,85	3,52
*N.I.	—	0,49	0,91
C-20	—	0,76	—
C-18 : 3	—	0,41	—

N. I.: No identificado.

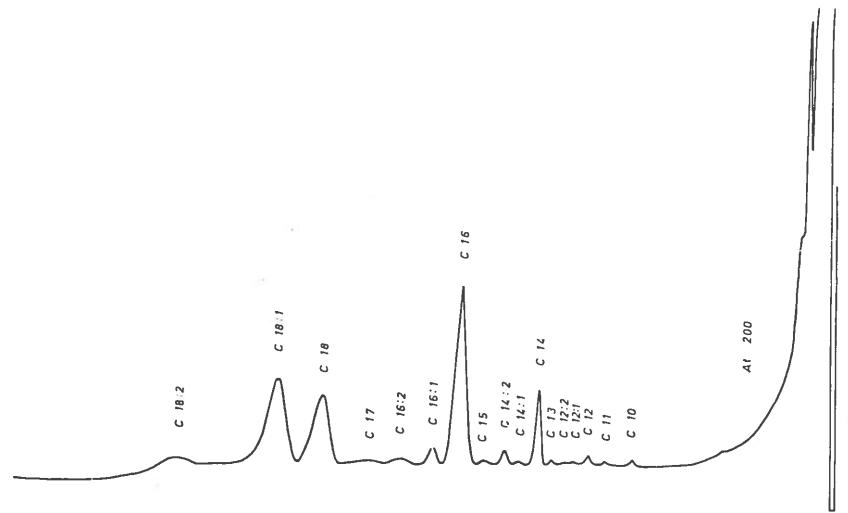


Figura III.48: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la lecitina de la cuajada (extracto total). 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.44

Ácidos grasos de la lecitina de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche cruda (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Extracto físico	Extracto químico
C-8	Trazas	0,07
C-10	0,13	0,10
C-11	Trazas	0,03
C-12	0,65	0,59
C-12 : 1	Trazas	Trazas
C-12 : 2	Trazas	Trazas
C-13	Trazas	0,07
C-14	6,20	6,65
N. I.	0,20	0,31
C-14 : 1	0,64	0,47
C-14 : 2	1,67	1,99
C-15	0,78	0,62
C-16	31,21	33,25
C-16 : 1	3,43	2,87
C-16 : 2	1,08	0,87
C-17	1,04	0,97
C-18	10,72	14,48
C-18 : 1	34,24	30,55
C-19	0,20	0,21
C-18 : 2	7,37	4,67
N. I.	—	0,87
C-20	—	0,21
C-18 : 3	1,47	0,73

N. I: No identificado.

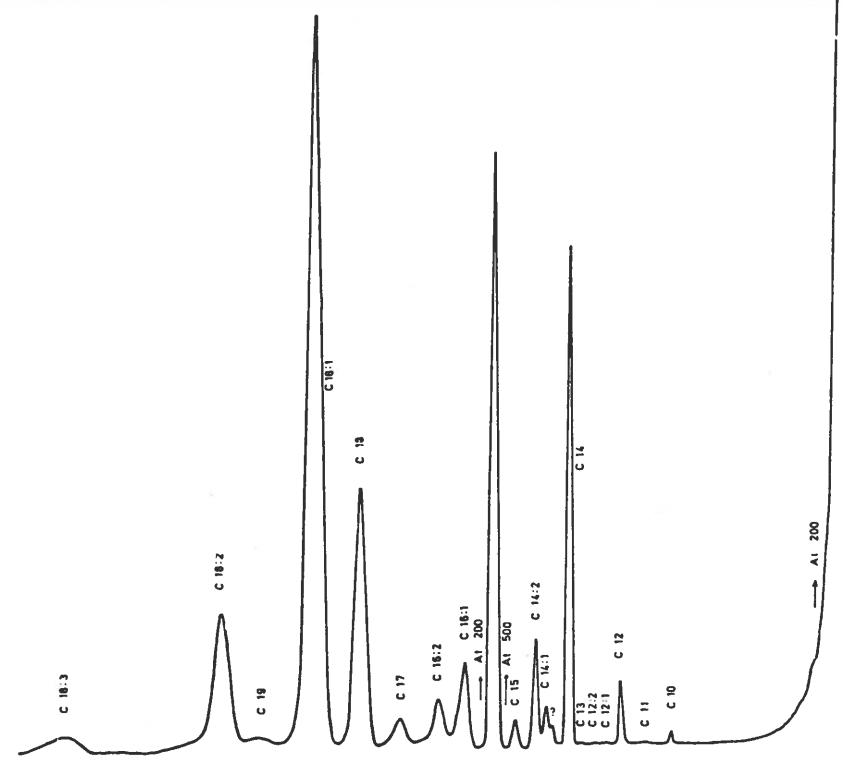


Figura III.49: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la fosfatidilcolina del queso fabricado con leche cruda (Extracto físico) 50-180°C 8°C/min.

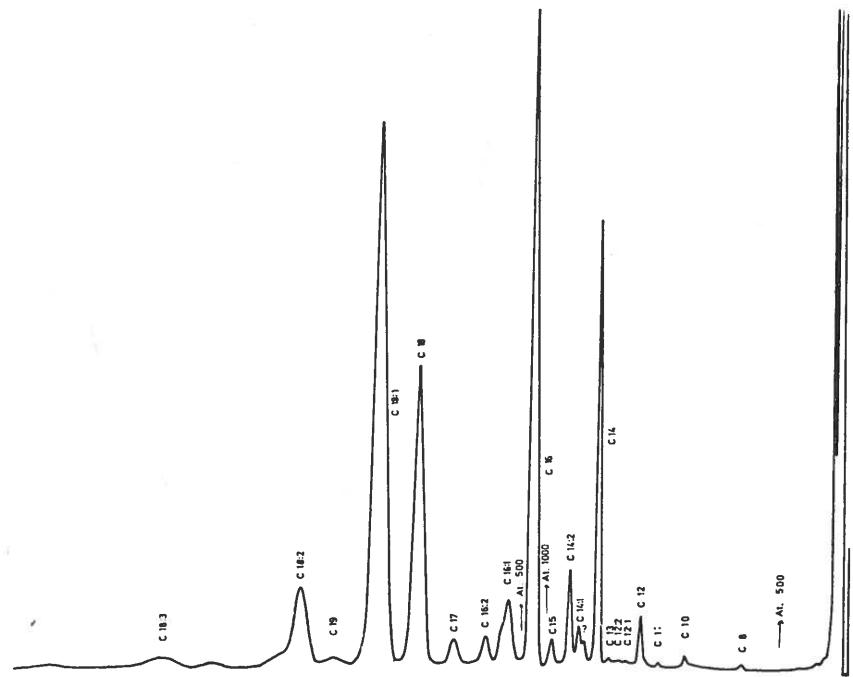


Figura III.50: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la lecitina del queso fabricado con leche cruda (extracto químico) 50-180°C 8°C/min.

**TABLA III.45**

## Ácidos grasos de la lecitina de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche pasteurizada (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Extracto físico	Extracto químico
C-8	0,16	0,23
C-9	0,16	0,15
C-10	0,16	0,07
C-11	0,08	0,08
C-12	0,40	0,92
C-12 : 1	Trazas	Trazas
C-12 : 2	0,16	0,07
C-13	Trazas	Trazas
C-14	6,25	6,69
N. I.	Trazas	—
C-14 : 1	Trazas	2,88
C-14 : 2	1,44	2,08
N. I.	—	0,58
C-15	0,80	0,69
C-16	31,08	44,42
C-16 : 1	2,48	4,31
N. I.	—	Trazas
C-16 : 2	2,16	0,96
C-17	0,96	0,92
C-18	15,38	9,85
C-18 : 1	31,72	21,85
C-18 : 2	6,61	1,92
N. I.	Trazas	1,38

N. N.: No identificado.

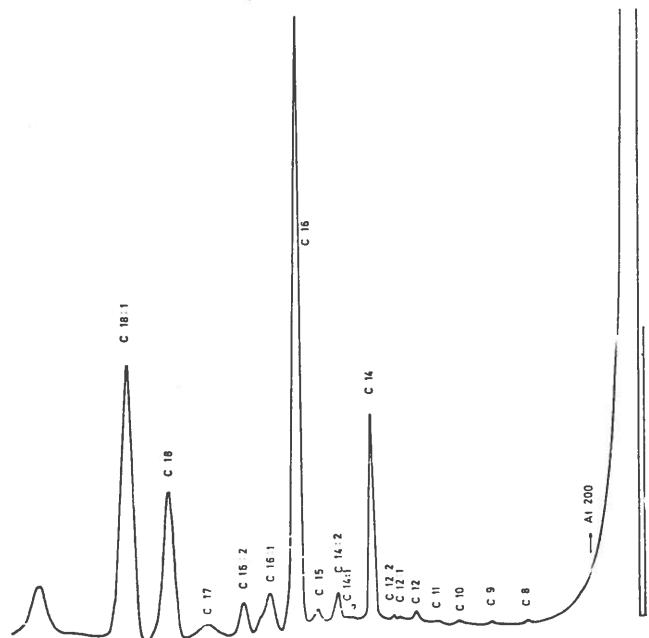


Figura III.51: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la fosfotidilcolina del queso fabricado con leche pasterizada. (Extracto físico). 50-180°C - 8°C/min.

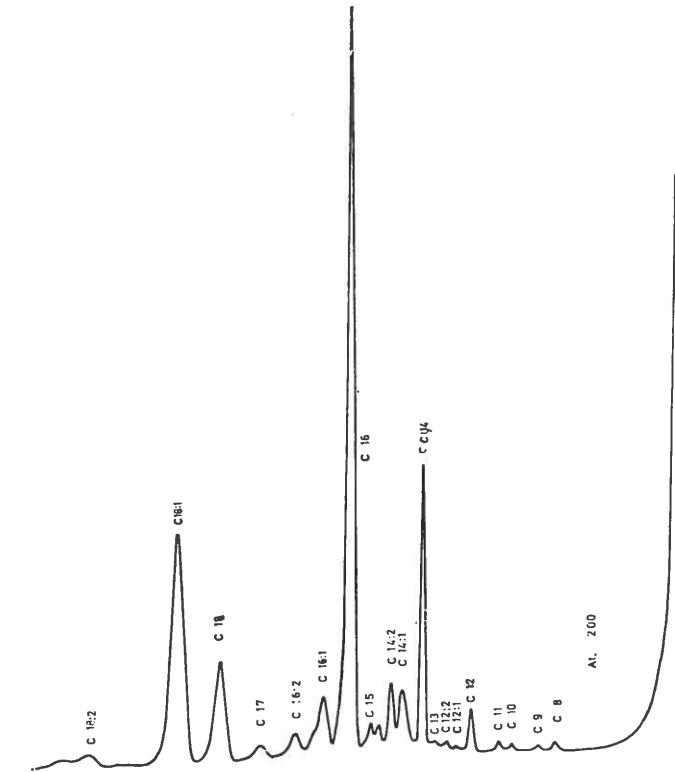


Figura III,52: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la lecitina del queso fabricado con leche pasterizada (extracto químico). 50-180°C. 8°C/min.

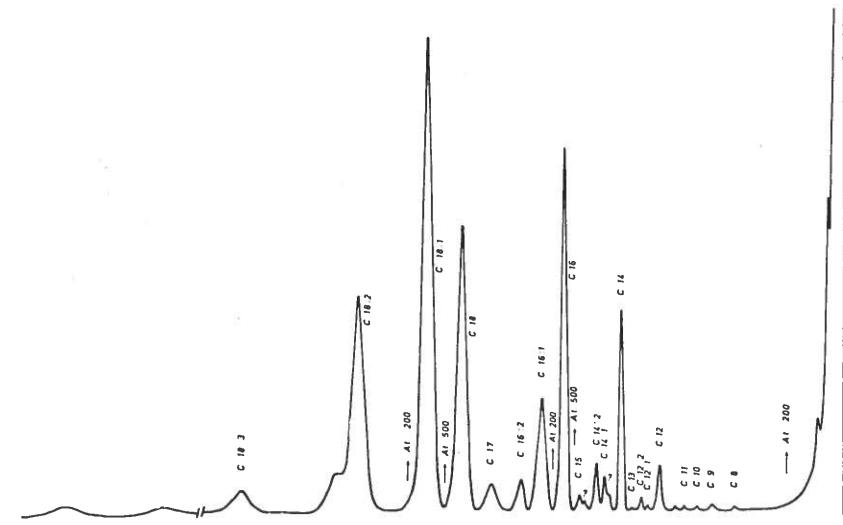


Figura III,56: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina de la cuajada. (Extracto total). 50-180°C. 8°C/min.

TABLA III.47

Ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche cruda (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Extracto físico	Extracto químico
C.6	1,64	—
C.7	0,12	—
C.8	0,33	—
C.9	1,48	—
C.10	1,31	0,46
C.11	Trazas	0,03
C.12	1,61	1,25
C.12 : 1	Trazas	0,02
C.12 : 2	Trazas	0,04
C.13	Trazas	0,10
C.14	1,73	4,25
N. I.	0,16	0,08
C.14 : 1	0,25	0,72
C.14 : 2	0,86	1,04
N. I.	Trazas	—
C.15	0,24	0,22
C.16	21,49	28,99
C.16 : 1	2,46	2,25
C.16 : 2	0,62	1,01
C.17	0,98	1,93
C.18	10,50	11,69
C.18 : 1	40,63	39,79
C.19	—	Trazas
C.18 : 2	9,85	4,52
N. I.	—	0,61
C.18 : 3	0,62	0,87
S. C.20	—	0,14

N. I.: No identificado

S. C.20: superiores a C.20.

TABLA III.46

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasteurizada
C.6	—	0,72	—
C.7	—	0,05	—
C.8	0,03	0,14	0,13
C.9	0,08	0,65	—
C.10	0,03	0,83	0,95
C.11	0,03	0,02	0,06
N. I.	0,03	Trazas	0,11
C.12	0,48	1,42	1,59
C.12 : 1	0,03	0,01	Trazas
C.12 : 2	0,14	0,02	0,06
C.13	0,03	0,06	Trazas
C.14	2,66	4,46	5,46
N. I.	0,20	0,12	0,08
C.14 : 1	0,55	0,51	2,90
C.14 : 2	0,85	0,96	1,15
N. I.	0,12	Trazas	Trazas
C.15	0,39	0,23	0,46
C.16	16,37	25,70	24,74
C.16 : 1	3,75	2,34	3,46
C.16 : 2	0,78	0,84	1,11
C.17	1,19	1,51	0,79
C.18	11,25	11,18	11,28
C.18 : 1	42,06	40,16	40,58
C.19	—	Trazas	Trazas
C.18 : 2	13,13	6,80	3,01
N. I.	2,98	—	—
*N.I.	—	0,34	Trazas
C.18 : 3	1,59	0,76	2,07
S. C.20	1,20	0,08	—

N. I.: No identificado.

S. C.20: Superiores al C.20.

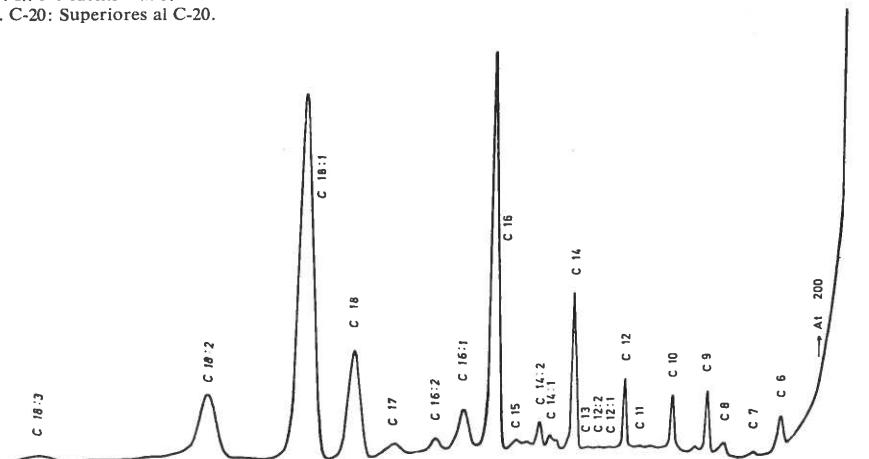


Figura III.57: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina del queso fabricado con leche cruda (Extracto físico). 50-180°C. 8°C/min.

Figura III.58: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina del queso fabricado con leche cruda (extracto químico). 50-180°C. 8°C/min.

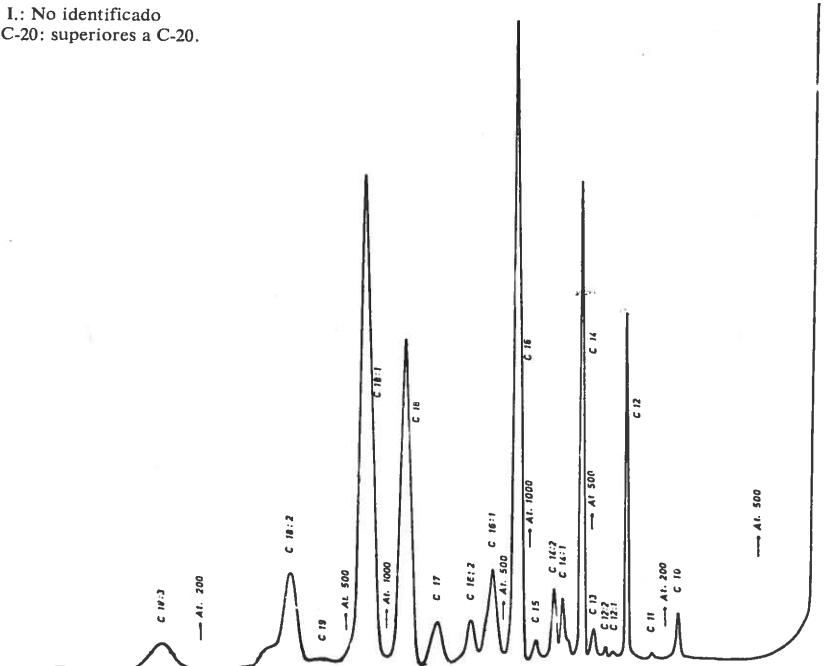


TABLA III.48

Acidos grasos de la fosfatidiletanolamina de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche pasterizada (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Extracto físico	Extracto químico
C-8	0,05	0,17
C-9	Trazas	Trazas
C10	0,58	1,14
C-11	0,19	Trazas
N. I.	—	0,17
C-12	1,14	1,82
C-12 : 2	Trazas	—
C-12 : 2	0,19	Trazas
C-13	Trazas	Trazas
C-14	4,63	5,89
N. I.	0,23	—
C-14 : 1	0,19	4,30
C-14 : 2	1,60	0,91
N. I.	Trazas	—
C-15	0,48	0,45
C-16	22,04	26,13
C-16 : 1	5,13	2,59
C-16 : 2	1,27	1,02
C-17	1,33	0,51
C-18	11,40	11,22
C-18 : 1	38,10	43,42
C-19	Trazas	—
C-18 : 2	8,36	2,40
N. I.	Trazas	—
C-18 : 3	3,04	—

N. I.: No identificado.

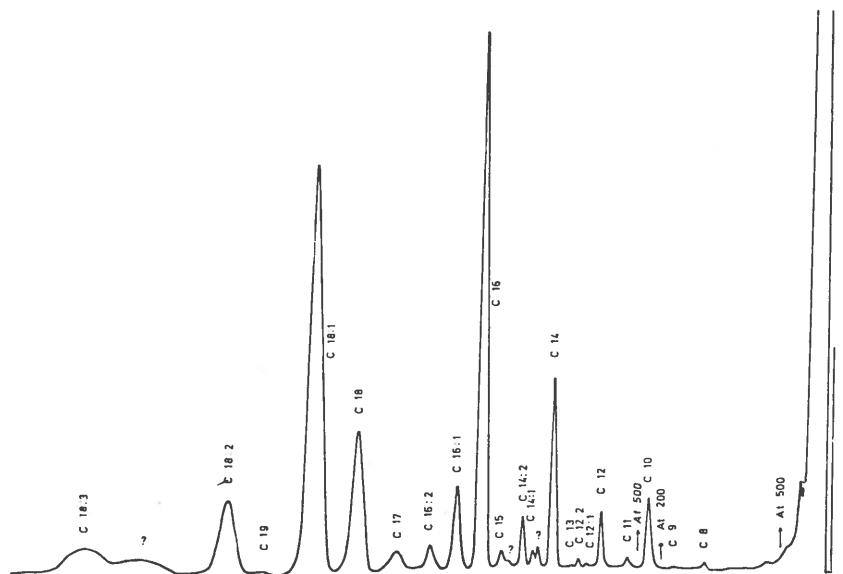


Figura III.47: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina del queso fabricado con leche pasterizada. (Extracto físico). 50-180°C 8°C/min.

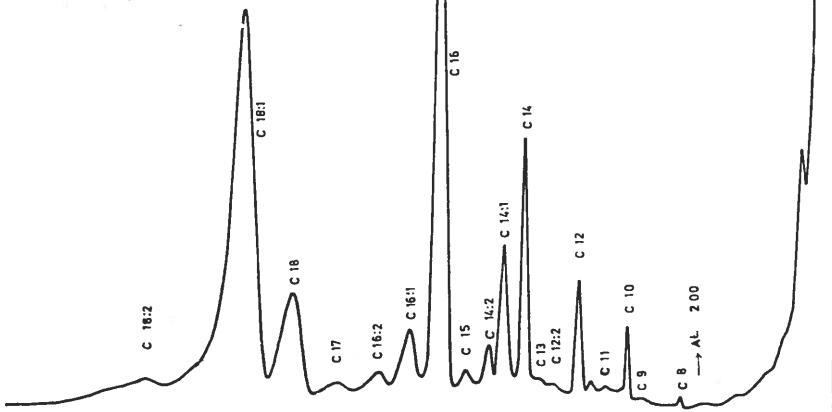


Figura III.48: Esteres metílicos de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina del queso fabricado con leche pasterizada (extracto químico). 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.49  
Acidos grasos de los cerebrósidos (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-6	Trazas	0,14	—
C-8	0,29	0,48	5,39
C-9	0,77	Trazas	0,20
C-10	1,83	2,06	0,27
N. I.	—	0,05	—
C-11	Trazas	0,24	0,02
N. I.	—	0,05	Trazas
C-12	3,26	3,10	2,14
C-12 : 1	Trazas	0,05	0,05
C-12 : 2	0,19	0,29	0,33
C-13	0,10	0,15	0,02
C-14	9,46	11,77	8,84
N. I.	0,38	0,74	Trazas
C-14 : 2	1,92	1,81	2,28
N. I.	—	—	Trazas
C-15	0,29	0,36	1,14
C-16	35,94	41,05	38,03
C-16 : 1	2,69	3,64	3,67
N. I.	—	—	0,76
C-16 : 2	1,35	0,79	1,41
C-17	0,72	0,69	1,33
C-18	6,94	7,69	8,66
C-18 : 1	24,65	20,27	20,39
C-19	—	Trazas	0,05
C-18 : 2	4,80	1,61	1,13
N. I.	0,97	Trazas	0,24
C-18 : 3	—	0,14	0,36
S. C-20	1,65	Trazas	—

N. I.: No identificado.

S. C-20: Superiores al C-20.

Figura III.56. Esteres metílicos de los ácidos grasos de los cerebrósidos de la cuajada (extracto total).

50-180°C. min.

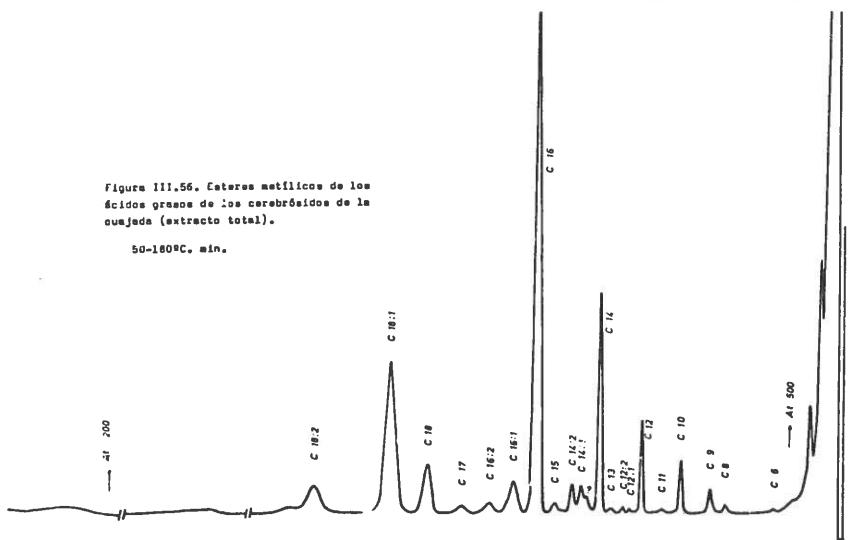


Figura III.56: Esteros metílicos de los ácidos grasos de los cerebrósidos de la cuajada. (extracto total). 50-180°C. 8°C/min.

TABLA III.50

Ácidos grasos de los cerebrósidos de los extractos físico y químico del queso fabricado con leche cruda (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	extracto físico	Extracto químico
C-6	—	0,25
C-8	0,15	0,74
C-9	Trazas	Trazas
C-10	1,21	2,73
N. I.	—	0,08
C-11	0,03	0,41
N. I.	0,11	—
C-12	3,71	4,22
C-12: 1	Trazas	—
C-12: 2	0,19	0,37
C-13	0,23	0,08
C-14	13,82	10,17
N. I.	0,39	1,12
C-14: 1	2,34	1,49
C-14: 2	1,75	1,86
C-15	0,30	0,41
C-16	45,11	37,88
C-16: 1	3,07	4,09
C-16: 2	0,48	1,03
C-17	0,78	0,62
C-18	4,84	9,93
C-18: 1	19,53	20,85
C-19	Trazas	Trazas
C-18: 2	1,56	1,65
N. I.	Trazas	—
C-18: 3	0,31	—
S. C-20	Trazas	—

N. I.: No identificado.  
S. C-20: Superiores a C-20.

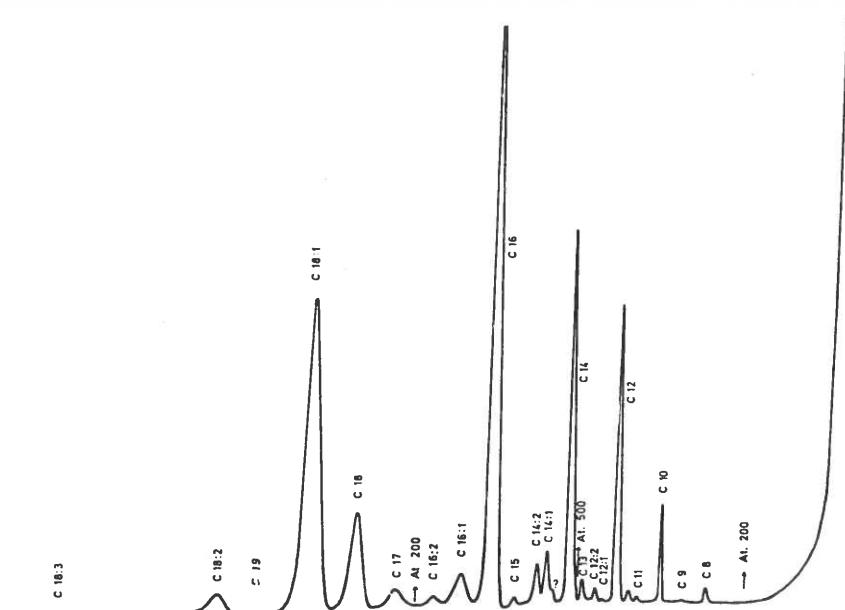


Figura III.57: Esteros metílicos de los ácidos grasos de los cerebrósidos del queso fabricado con leche cruda. (Extracto físico) 50-180°C 8°C/min.

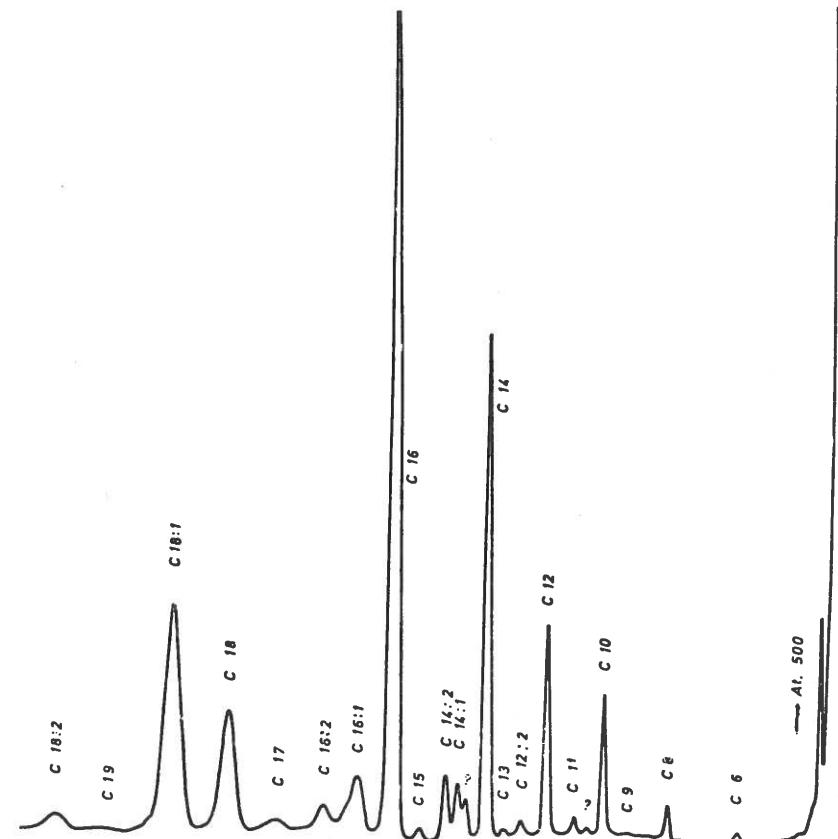


Figura III.58: Esteros metílicos de los ácidos grasos de los cerebrósidos del queso fabricado con leche cruda (extracto químico). 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.51

**Acidos grasos de los cerebrósidos de los extractos físicos y químico del queso fabricado con leche pasterizada (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)**

	Extracto físico	Extracto químico
C-8	0,28	8,03
C-9	0,14	0,23
C-10	0,14	0,34
C-11	0,07	Trazas
N. I.	—	Trazas
C-12	1,84	2,29
C-12 : 1	0,14	Trazas
C-12 : 2	0,07	0,46
C-13	0,07	Trazas
C-14	9,51	8,49
N. I.	Trazas	—
C-14 : 1	1,91	2,04
C-14 : 1	1,91	2,04
C-14 : 2	1,88	2,48
N. I.	Trazas	Trazas
C-15	1,13	1,15
C-16	38,83	37,62
C-16 : 1	4,68	3,15
N. I.	—	1,15
C-16 : 2	1,91	1,15
C-17	1,24	1,38
C-18	7,65	9,18
C-18 : 1	24,87	20,07
C-19	0,14	—
C-18 : 2	1,77	0,80
N. I.	0,71	Trazas
C-18 : 3	1,06	—

N. I.: No identificado

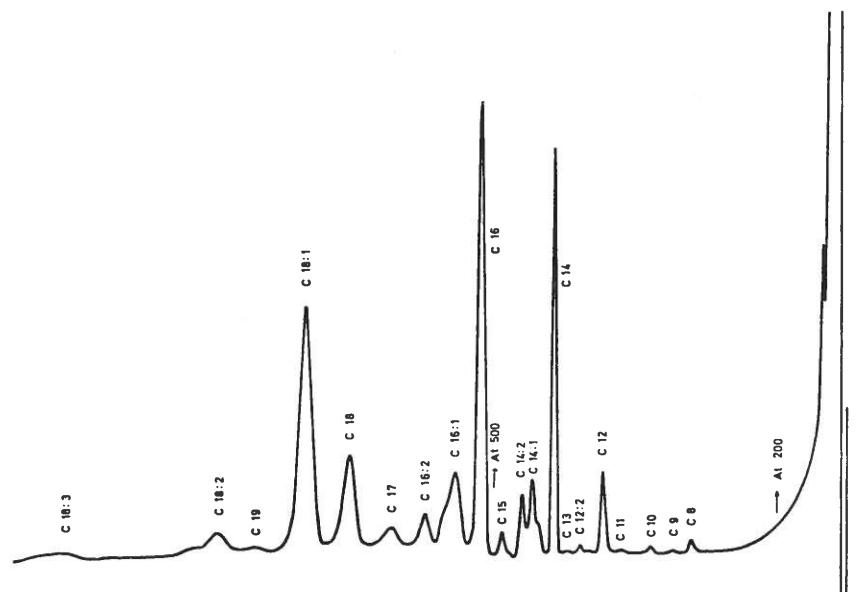


Figura III.59: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los cerebrósidos del queso fabricado con leche pasterizada (Extracto físico). 50-180°C 8°C/min.

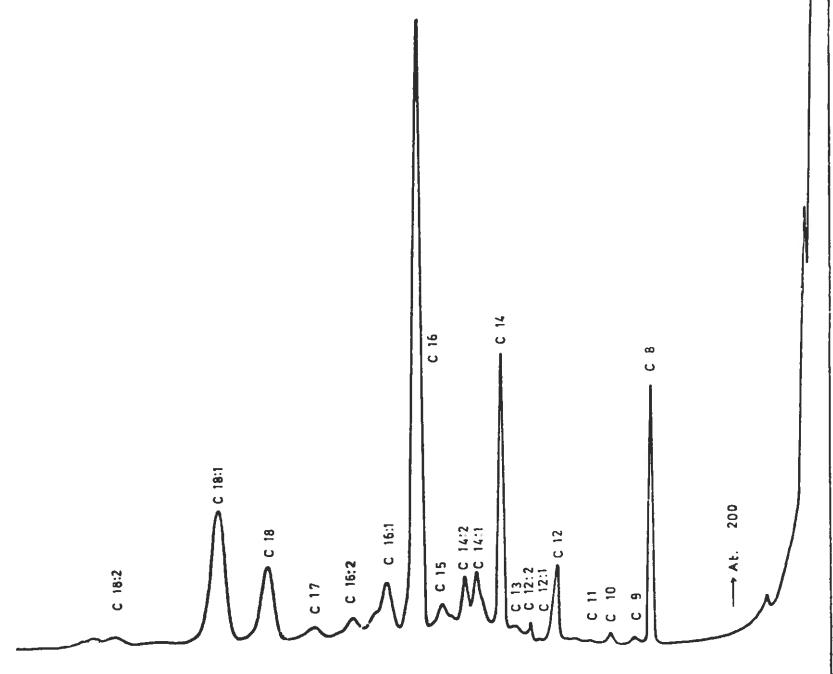


Figura III.60: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los cerebrósidos del queso fabricado con leche pasterizada (extracto químico). 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.52

### Acidos grasos de los glicosilglicéridos (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C.10	70,73	4,67	14,20
C.11	7,32	Trazas	3,98
C.12	7,32	4,67	1,14
C.12 : 1	—	Trazas	0,28
C.12 : 2	—	Trazas	0,28
C.13	—	Trazas	Trazas
C.14	Trazas	16,10	8,52
C.14 : 1	1,63	2,08	1,42
C.14 : 2	Trazas	1,82	2,56
C.15	—	0,52	2,27
C.16	8,13	46,75	34,09
C.16 : 1	4,88	2,60	6,82
C.16 : 2	—	0,52	Trazas
C.17	—	Trazas	1,70
C.18	Trazas	3,90	4,55
C.19 : 1	Trazas	16,36	18,18

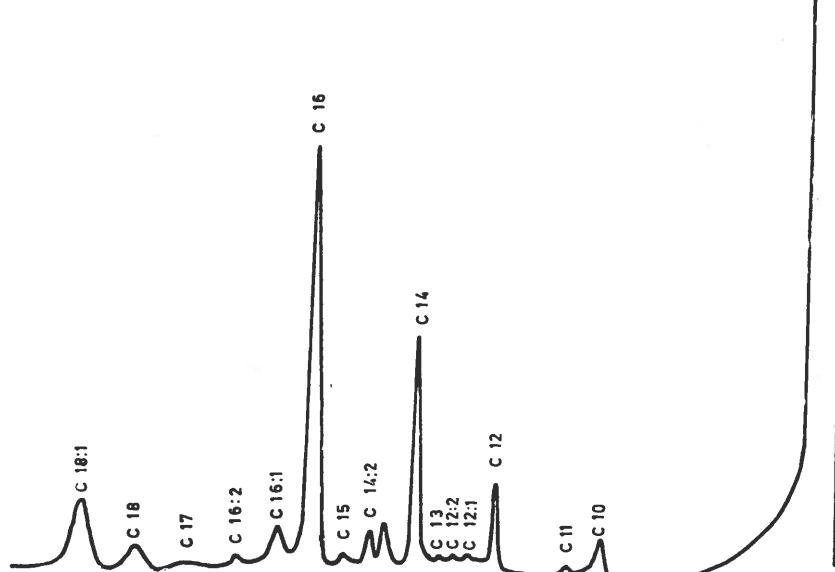


Figura III.61: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los glicosilglicéridos de la cuajada. 50-180°C 8°C/min.

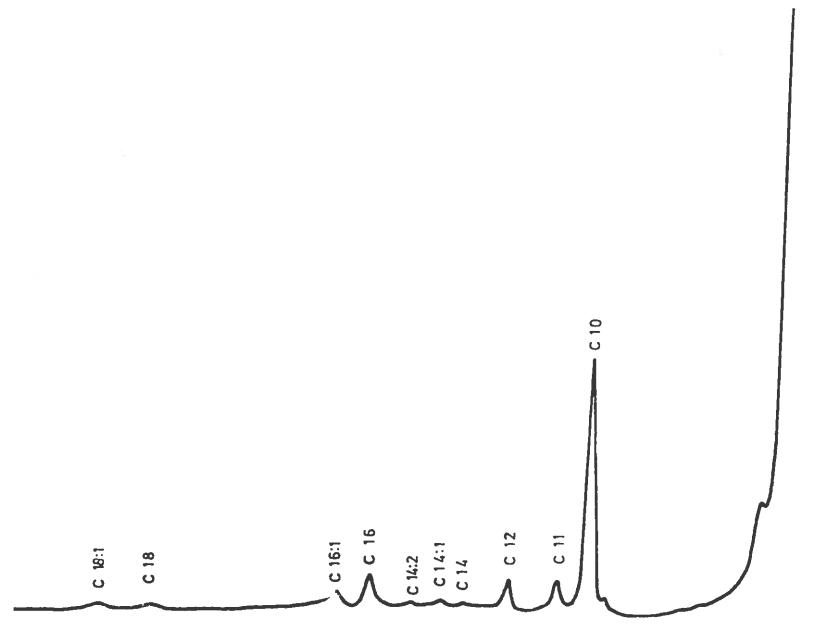


Figura III.61: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los glicosilglicéridos de la cuajada. 50-180°C 8°C/min.

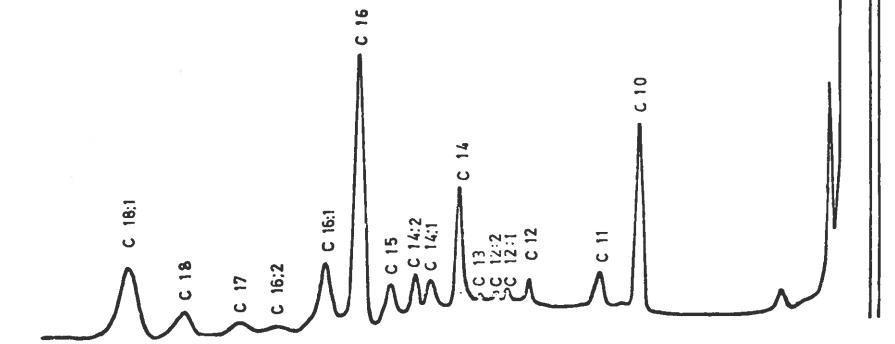


Figura III.63: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los glicosilglicéridos del queso fabricado con leche pasteurizada. 50-180°C 8°C/min.

III.56, III.57, III.58, III.59 y III.60 y las tablas III.49, III.50 y III.51 los correspondientes a los cerebrósidos.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos de los glicosilglicéridos se obtuvieron a partir de muestras purificadas, procedentes de los extractos totales obtenidos mezclando los extractos físico y químico en las proporciones adecuadas. Los resultados de las cromatografías se muestran en las figuras III.61, III.62 y III.63 y en la tabla III.52.

#### III.54.4. Cuantificación de los componentes polares de los extractos lipídicos.

Alícuotas de los lípidos polares obtenidos por elución con metanol, a partir de los extractos lipídicos, en columnas de ácido silílico-celita (1/1) se fraccionaron por cromatografía en lámina fina, se registró el peso de las fracciones obtenidas, se comprobó su pureza y se calculó el peso real de cada componente por su contenido en nitrógeno y, teniendo en cuenta el peso molecular medio de los ácidos grasos componentes de la molécula, obtenido conforme ha sido ya descrito para las sustancias caracterizadas en la fracción lípidos «neutros».

Figura III.62: Esteres metílicos de los ácidos grasos de los glicosilglicéridos del queso fabricado con leche cruda. 50-180°C 8°C/min.

TABLA III.53

Cuantificación de los lípidos polares de la cuajada que contienen nitrógeno

	mg. pesada	μg N	P. M. A. G.	P. M. T.	mg	% L. P.
Total lípidos polares	9,7	195				
No identificados	2,7	21				
Esfingomielina	2,2	32	270,83	780,43	0,89	9,17
Lecitina	1,6	49	268,38	866,06	3,03	31,24
Fosfatidil- etanolamina	1,3	44	274,03	817,25	2,60	26,80
Cerebrósidos	1,7	33	258,90	745,50	1,76	18,14
Totales	9,5	179			8,28	85,36
Balance %	97,94	93,90			85,36	

P. M. A. G.: Peso molecular medio de los ácidos grasos.

P. M. T.: Peso molecular total.

mg.: mg de cada lípido polar calculado por su contenido en nitrógeno.

% L. P.: porcentaje sobre el total de lípidos polares.

TABLA III.54

Cuantificación de los lípidos polares del queso fabricado con leche cruda (extracto físico) que contienen nitrógeno

	mg pesada	μg N	P. M. A. G.	P. M. T.	mg	% L. P.
Total lípidos polares	11,7	179,56				
No identificados	0,6	42				
Esfingomielina	1,9	40	267,68	777,28	1,11	9,49
Lecitina	2,2	47	270,09	869,48	2,92	24,96
Fosfatidil- etanolamina	2,4	32	264,37	797,94	1,82	15,55
Cerebrósidos	3,4	24	274,60	761,20	1,3	11,11
Totales	11,5	185			7,15	61,11
Balance %	98,29	103,03			61,11	

P. M. A. G.: Peso molecular medio de los ácidos grasos.

P. M. T.: peso molecular total.

mg: mg de cada lípido polar calculado por su contenido en nitrógeno.

% L. P.: porcentaje sobre el total de lípidos polares.

TABLA III.55

Cuantificación de los lípidos polares del queso fabricado con leche cruda (extracto químico) que contienen nitrógeno

	mg pesada	μg N.	P. M. A. G.	P. M. T.	mg	% L. P.
Total lípidos polares	24,1	397,59				
No identificados	1,3	87				
Esfingomielina	2,6	87	273,19	728,79	2,42	10,04
Lecitina	6,4	86	268,22	865,74	5,33	22,12
Fosfatidil- etanolamina	8,8	85	268,79	806,78	4,90	20,33
Cerebrósidos	4,4	44	254,20	740,80	2,33	9,67
Totales	23,5	389			14,98	62,16
Balance	97,51 %	97,84 %			62,16 %	

P. M. A. G.: peso molecular medio de los ácidos grasos.

P. M. T.: peso molecular total.

mg: mg de cada lípido polar calculado por su contenido en nitrógeno.

% L. P.: porcentaje sobre el total de lípidos polares.

TABLA III.56

Cuantificación de los lípidos polares del queso fabricado con leche pasterizada (extracto físico) que contienen nitrógeno

	mg pesada	μg N	P. M. A. G.	P. M. T.	mg	% L. P.
Total lípidos polares	10,2	174,47				
No identificados	0,5	32				
Esfingomielina	2,7	45	265,48	775,08	1,24	12,16
Lecitina	2,4	50	267,41	864,12	3,09	30,29
Fosfatidil- etanolamina	2,8	30	268,68	806,56	1,79	17,55
Cerebrósidos	2,9	27	260,22	746,82	1,44	14,12
Totales	11,3	184			7,56	74,12
Balance	110,78 %	105,45 %			74,12 %	

P. M. A. G.: peso molecular medio de los ácidos grasos.

P. M. T.: peso molecular total.

mg: mg de cada lípido polar calculado por su contenido en nitrógeno.

% L. P.: porcentaje sobre el total de lípidos polares.

TABLA III.57

Cuantificación de los lípidos polares del queso fabricado con leche pasterizada (extracto químico) que contienen nitrógeno

	mg pesada	μg N	P. M. A. G.	P. M. T.	mg	% L. P.
Total lípidos polares	16,2	343,31				
No identificados	1,0	101				
Esfingomielina	1,4	54	267,22	776,82	1,5	99,26
Lecitina	3,9	85	261,12	851,54	5,17	31,91
Fosfatidil- etanolamina	5,3	50	269,20	799,80	2,86	17,65
Cerebrósidos	2,2	42	248,32	734,92	2,2	13,58
Totales	15,9	332			11,73	72,40
Balance	98,15 %	96,71 %			72,40 %	

P. M. A. G.: peso molecular medio de los ácidos grasos.

P. M. T.: peso molecular total.

mg: mg de cada lípido polar calculado por su contenido en nitrógeno.

% L. P.: porcentaje sobre el total de lípidos polares.

TABLA III.58

Valores alcanzados por los lípidos polares de la cuajada y de los quesos fabricados con leche cruda y pasterizada

	Cuajada	Queso	Leche	Cruda	Queso	Leche	Pasterizada		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
Esfingomielina	63,27	0,13	9,17	46,82	0,10	9,76	50,84	0,11	11,17
Lecitina	223,88	0,46	31,24	112,37	0,24	23,71	138,66	0,30	30,84
Fosfatidil- etanolamina	189,81	0,39	26,80	84,28	0,18	17,65	78,57	0,17	17,58
Lisofosfatidil- etanolamina	Trazas	Trazas	Trazas	—	—	—	—	—	—
Cerebrósidos	131,41	0,27	18,14	51,50	0,11	10,48	64,71	0,14	13,94
Glicosilglicéridos	107,07	0,22	15,09	70,23	0,15	14,94	69,33	0,15	14,74

(1): en términos de mg/100 gr. extracto seco; (2): porcentaje sobre el extracto lipídico total; (3): porcentaje sobre el total de lípidos polares.

En las tablas III.53, III.54, III.55, III.56 y III.57 se detallan los valores de cada uno de los componentes identificados de la fracción lípidos polares, excepto los glicosilglicéridos (no contienen nitrógeno); los valores de las sustancias no identificadas (sólo se mostraron positivas al reactivo de ninhidrina) no se pudieron calcular más que por pesada, conjuntamente. Se dan sin embargo en las tablas datos respecto a su contenido en nitrógeno.

La tabla III.58 muestra los valores de los lípidos polares de la cuajada y de los quesos, incluidos los glicosilglicéridos (calculados por pesada). Los valores de ambos quesos se calcularon teniendo en cuenta las proporciones de los extractos físico y químico, relativas al total del extracto lipídico.

### III.6. *Acidos grasos libres, arrastrables en corriente de vapor.*

Para su estudio se siguió la marcha metodológica descrita en II.4.10.

En la tabla III.59 se recogen los títulos (m-equivalentes/gr) de ácidos grasos solubles e insolubles, arrastrables en corriente de vapor, obtenidos a partir de la cuajada y de cada uno de los quesos.

TABLA III.59

Acidos grasos arrastrables en corriente de vapor (valores expresados en m-equivalentes/gr de extracto seco)

	Solubles	Insolubles
Cuajada	0,01747	0,01991
Queso leche cruda	0,05071	0,07865
Queso leche pasterizada	0,04966	0,06847

Los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor obtenidos en la fracción «insoluble» fueron preparados para el análisis cromatográfico siguiendo la técnica descrita en II.4.10.3.B. En las figuras III.64, III.65 y III.66 aparecen los cromatogramas de sus ésteres metílicos y en la tabla III.60 la composición porcentual (en peso) de los ácidos grasos de esta fracción, de cada muestra (cuajada y los dos tipos de quesos).

Los ácidos grasos solubles arrastrables en corriente de vapor quedaron, según se expresa en II.4.10.3.A, divididos en dos fracciones: una analizada por cromatografía en fase gaseosa disuelta en agua (cromatogramas representados en las figuras III.67, III.68 y III.69 y tabla III.61) y otra constituida por ácidos grasos menos solubles que sobrenadaban en el agua por hallarse a sobresaturación y que fueron analizados tras su extracción etérica y posterior metilación (II.4.10.3.A). En las figuras III.70, III.71 y III.72 aparecen los cromatogramas obtenidos y en la tabla III.62 la composición porcentual de esta fracción.

La cuantificación de los ácidos grasos C-2 á C-4 (solubles totalmente en agua) se efectuó según se describe en II.4.9.1. En la tabla III.63 se muestra el contenido de cada uno de ellos, expresado en mg/100 gr de muestra y en mg/100 gr de extracto seco.

La tasa alcanzada por los ácidos grasos C-5 á C-16 (extraídos con éter a partir del extracto acuoso) se realizó sobre la base a) del título de la fracción «soluble», restándole el correspondiente a los ácidos grasos C-2 á C-4 y b) de la composición porcentual de la tabla III.62; la tabla III.64 muestra los resultados obtenidos.

La cuantificación de los ácidos grasos insolubles (C-8 á C-18 : 1) se efectuó basándose en el porcentaje de cada ácido graso sobre el total de la fracción «insoluble» (tabla III.61) y en el título de esta fracción. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.65.

La tabla III.66 muestra las concentraciones alcanzadas, en cada muestra (cuajada y quesos), por los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor.

**TABLA III.60**

**Acidos grasos libres arrastrables en corriente de vapor e insolubles en agua (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)**

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-8	1,28	1,31	0,07
C-9	0,64	0,73	—
C-10	4,15	5,96	4,68
C-11	0,32	0,15	0,07
C-12	14,05	8,06	11,25
C-12 : 1	0,08	—	—
C-12 : 2	0,08	0,15	0,20
C-13	0,08	0,15	0,13
C-14	15,80	21,61	21,25
C-14 : 1	1,55	2,19	3,49
C-14 : 2	1,43	2,19	2,66
C-15	0,08	0,15	0,13
C-16	39,90	39,25	38,81
C-16 : 1	0,16	0,51	3,19
C-16 : 2	0,32	0,51	0,40
C-18	5,59	5,62	3,72
C-18 : 1	14,48	11,39	9,96

**TABLA III.61**

**Acidos grasos solubles totalmente en agua (C-2 á C-4) (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)**

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
No identificado	13,54	Trazas	
A. acético	61,97	47,40	68,19
A. propiónico	1,81	2,26	1,39
A. isobutírico	—	2,10	Trazas
A. butírico	26,67	48,33	40,38

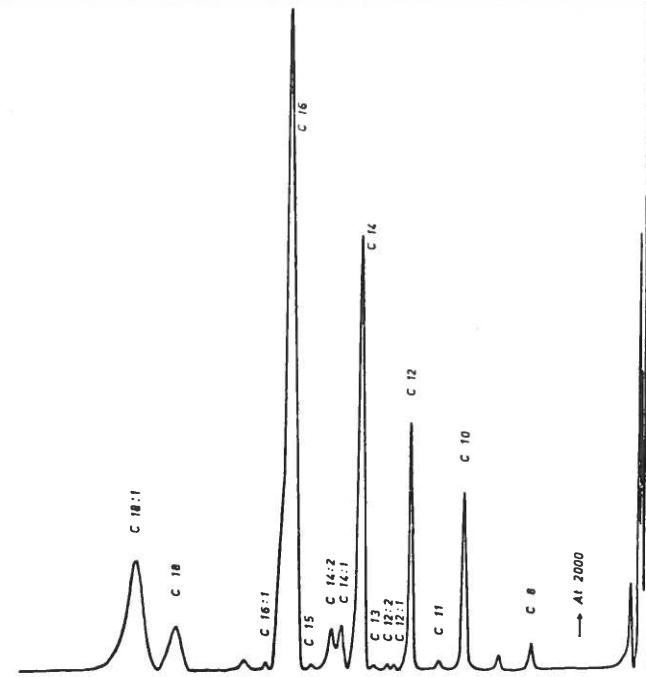


Figura III.64: Esteres metílicos de los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor insolubles en agua de la cuajada. 50-180°C 8°C/min.

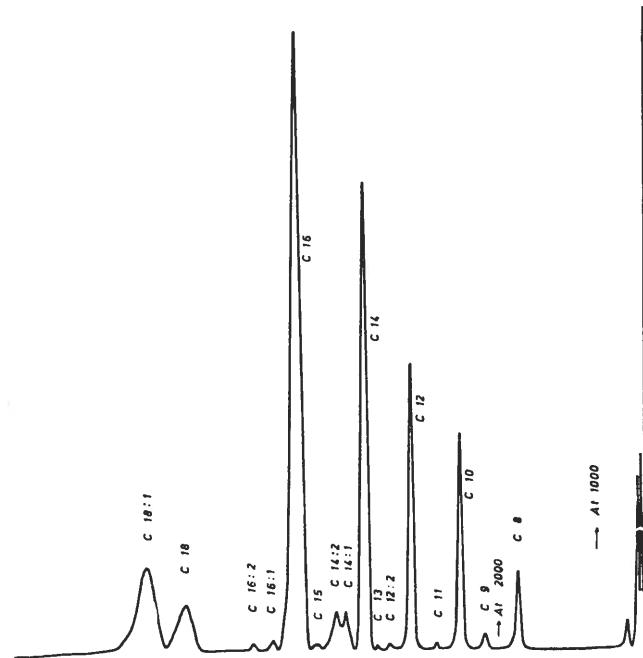


Figura III.65: Esteres metílicos de los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor, insolubles en agua del queso fabricado con leche cruda. 50-180°C 8°C/min.

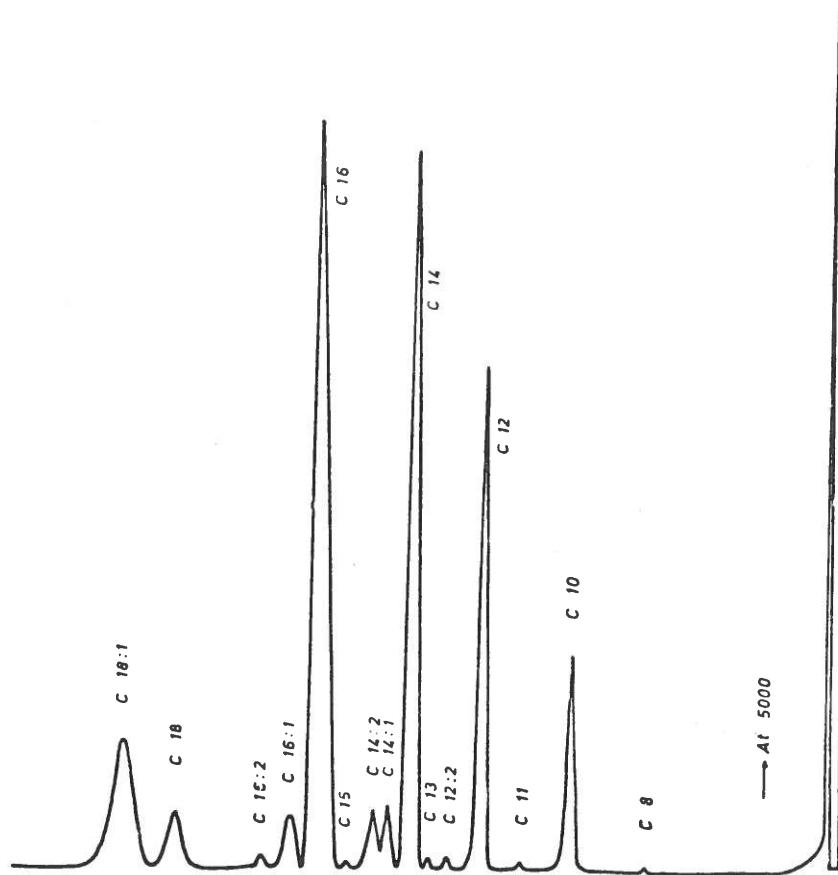


Figura III.66: Esteres metílicos de los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor, insolubles en agua del queso fabricado con leche pasterizada, 50-180°C 8°C/min.

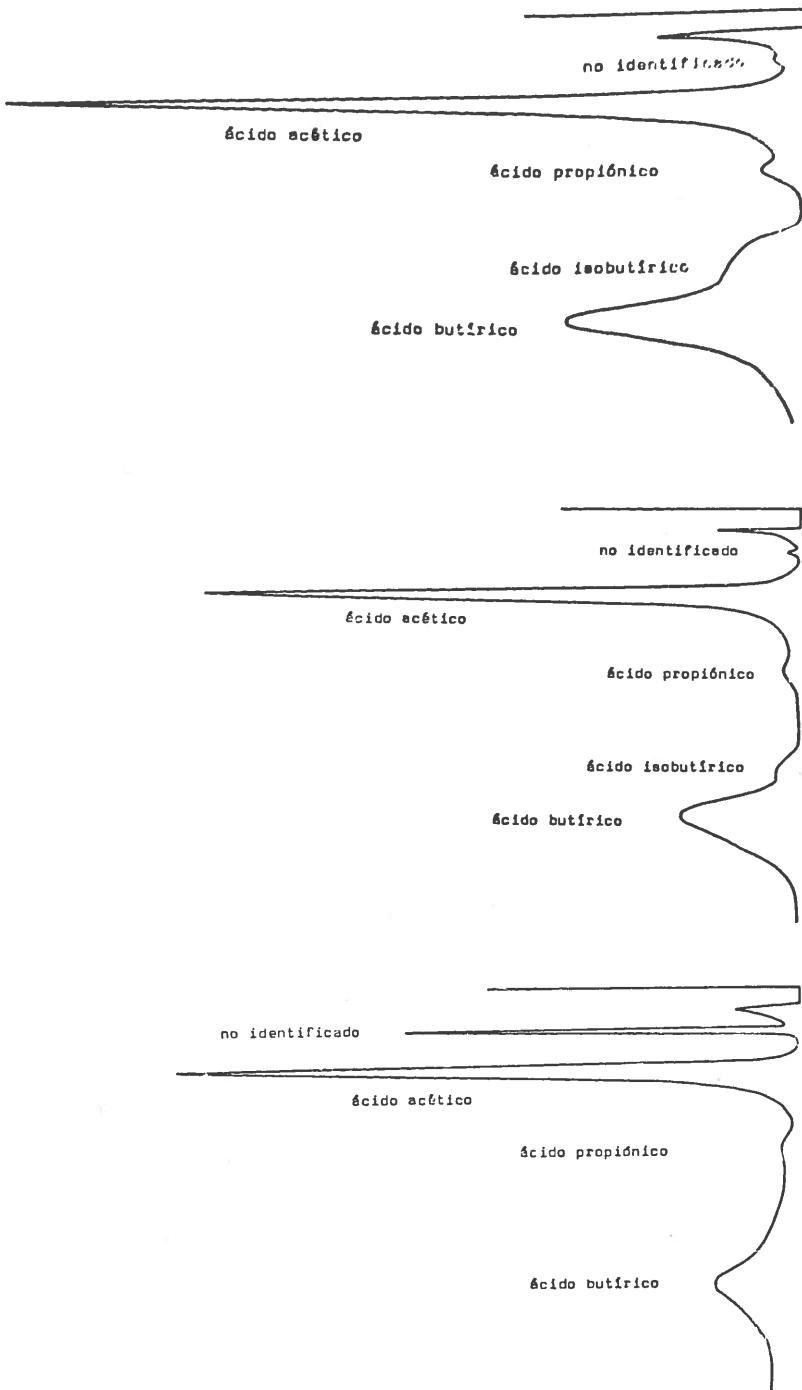


Figura III.67: Ácidos grasos libres, arrastrados en corriente de vapor, solubles totalmente en agua (C-2 a C-4) de la cuajada.

Figura III.68: Ácidos grasos libres arrasables en corriente de vapor, solubles totalmente en agua (C-2 á C-4) del queso

Figura III.69: Ácidos grasos libres arrastrados en corriente de vapor, solubles totalmente en agua (C.2 a C.4) del quesillo.

•TABLA III.62

**Acidos grasos libres arrastrables en corriente de vapor, extraídos con éter a partir de la disolución acuosa (C-5 á C-16) (valores expresados en % sobre el total de ácidos grasos)**

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasterizada
C-5	0,07	Trazas	0,87
C-6	0,58	3,22	12,69
C-7	Trazas	0,15	0,87
C-8	31,27	14,31	26,11
C-9	—	—	3,28
C-10	43,54	46,00	30,78
C-11	3,01	5,24	3,21
N. I.	Trazas	0,38	3,06
C-12	17,72	14,95	11,09
C-12 : 1	0,41	0,64	Trazas
C-12 : 2	Trazas	0,51	Trazas
C-13	0,17	0,64	1,02
C-14	4,40	4,86	4,81
C-14 : 1	1,45	1,15	0,30
C-14 : 2	—	1,53	Trazas
C-15	—	Trazas	0,40
C-16	1,27	6,39	2,19

N. I.: No identificado.

**TABLA III.63**

## **Acidos grados libres, arrastrables en corriente de vapor, solubles totalmente en agua (C-2 á C-4)**

	Cuajada		Queso leche cruda		Queso leche pasterizada	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
No identificado	2,70	5,97	—	—	—	—
A. acético	12,36	27,34	18,45	34,55	48,89	83,69
A. proiónico	0,36	0,80	0,88	1,65	1,17	1,99
A. isobutírico	—	—	0,82	1,53	Trazas	Trazas
A. butírico	4,52	10,00	18,81	35,22	33,92	58,07
TOTALES	19,94	44,11	38,96	72,95	84,01	143,82

(1): valores expresados en mg/ 100 gr.

(2): valores expresados en mg/ 100 gr. de extracto seco.

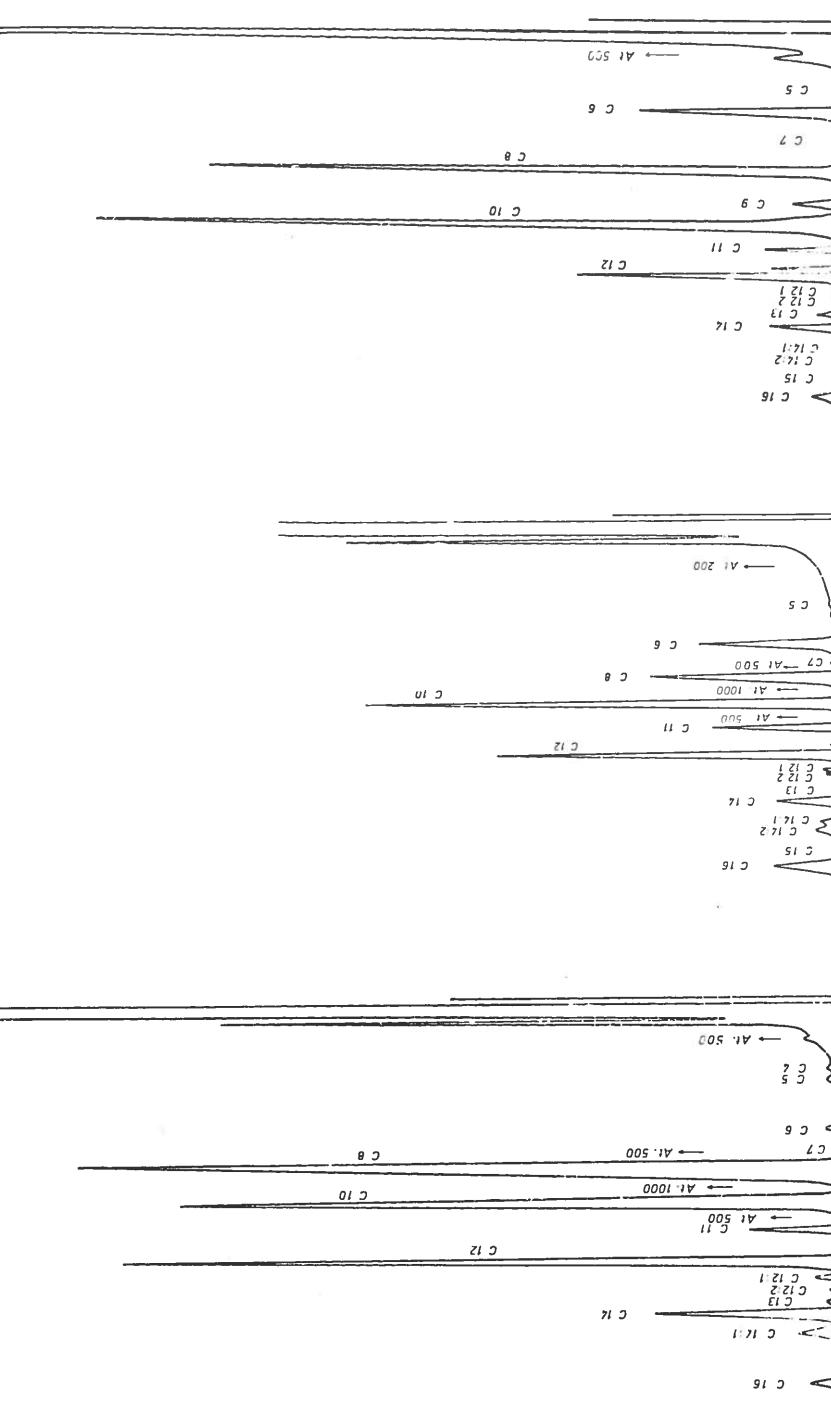


Figura III.72: Esteres metílicos de los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor, solubles en agua del queso fabricado con leche pasteurizada. 50-180°C 8°C/

Figura III.71: Esteres metílicos de los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor, solubles en agua del queso fabricado con leche cruda. 50-180°C 8°C/min.

Figura III.70: Esteres metílicos de los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor, solubles en agua de la cajada. 150-180°C 8°C/min.

TABLA III.64

Acidos grasos libres arrastrables en corriente de vapor, extraídos con éter a partir de la disolución acuosa (C-5 á C-16)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasteurizada			
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
C-5	0,06	0,13	Trazas	Trazas	2,51	4,30
C-6	0,63	1,17	12,56	23,52	36,54	62,55
C-7	Trazas	Trazas	0,58	1,09	2,51	4,30
C-8	28,42	62,67	55,81	104,51	75,17	128,67
C-9	—	—	—	—	9,44	16,16
C-10	39,58	87,56	179,40	335,94	88,62	151,69
C-11	2,74	6,06	20,44	38,28	9,24	15,82
N. I.	Trazas	Trazas	1,48	2,77	8,81	15,08
C-12	16,11	35,64	58,31	109,19	31,93	54,65
C-12 : 1	0,37	0,82	2,50	4,68	Trazas	Trazas
C-12 : 2	Trazas	Trazas	1,99	3,73	Trazas	Trazas
C-13	0,15	0,33	2,50	4,68	2,94	5,03
C-14	4,00	8,85	18,95	35,49	13,85	23,71
C-14 : 1	1,32	2,92	4,48	8,39	0,83	1,42
C-14 : 2	—	—	5,97	11,18	Trazas	Trazas
C-15	—	—	Trazas	Trazas	1,60	2,74
C-16	1,15	2,54	24,92	46,66	8,35	14,29
TOTALES	94,43	208,89	389,89	750,11	292,34	500,41

(1): Valores expresados en mg/ 100 gr.

(2): Valores expresados en mg/ 100 gr. de extracto seco.

N. I.: No identificado.

TABLA III.65

Acidos grasos libres arrastrables en corriente de vapor e insoluble en agua.  
(C-8 á C-18 : 1)

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasteurizada			
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
C-8	2,73	6,04	13,02	24,38	0,68	1,16
C-9	1,37	3,03	7,26	13,60	—	—
C-10	8,87	19,62	59,26	110,97	45,78	78,36
C-11	0,68	1,50	1,49	2,79	0,68	1,16
C-12	30,02	66,41	80,14	150,06	110,06	188,39
C-12 : 1	0,17	0,38	—	—	—	—
C-12 : 2	0,17	0,38	1,49	2,79	1,96	3,36
C-13	0,17	0,38	1,49	2,79	1,27	2,17
C-14	33,76	74,69	214,86	402,35	207,89	355,84
C-14 : 1	3,31	7,32	21,77	40,77	34,14	58,44
C-14 : 2	3,05	6,75	21,77	40,77	26,02	44,54
C-15	0,17	0,38	1,49	2,79	1,27	2,17
C-16	85,25	188,60	390,25	730,78	379,67	649,88
C-16 : 1	0,34	0,75	5,07	9,49	31,21	53,42
C-16 : 2	0,68	1,50	5,07	9,49	3,91	6,69
C-18	11,94	26,41	55,88	104,64	36,39	62,29
C-18 : 1	30,94	68,50	113,25	212,07	97,44	166,68
TOTALES	213,67	472,64	994,26	1.861,85	978,28	1.674,52

(1): valores expresados en mg/ 100 gr.

(2): valores expresados en mg/ 100 gr. de extracto seco.

TABLA III.66

Acidos grasos libres totales, arrastrables en corriente de vapor

	Cuajada	Queso leche cruda	Queso leche pasteurizada			
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
N. I.	2,70	5,97	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
C-2	12,36	27,34	18,45	34,55	48,89	83,69
C-3	0,36	0,80	0,88	1,65	1,7	1,99
C-4: r	—	—	0,82	1,53	Trazas	Trazas
C-4	4,52	10,00	18,81	5,22	33,22	58,07
C-5	0,06	0,13	Trazas	Trazas	2,51	4,30
C-6	0,53	1,17	12,56	23,52	36,54	62,55
C-7	Trazas	Trazas	0,58	1,09	2,51	4,30
C-8	31,15	68,71	68,83	128,89	775,85	129,83
C-9	1,37	3,03	7,26	13,60	9,44	16,16
C-10	48,45	107,18	238,66	446,91	134,40	230,05
C-11	3,42	7,56	21,93	41,07	9,92	16,98
N. I.	Trazas	Trazas	1,48	2,77	8,81	15,08
C-12	46,13	102,05	138,45	259,26	141,99	243,04
C-12 : 1	0,54	1,20	2,50	4,68	Trazas	Trazas
C-12 : 2	0,17	0,38	3,48	6,52	1,96	3,36
C-13	0,32	0,71	3,99	7,47	4,21	7,20
C-14	37,76	83,54	233,81	437,84	221,74	379,55
C-14 : 1	4,63	10,24	26,25	49,16	34,97	59,86
C-14 : 2	3,05	6,75	27,74	51,95	26,02	44,54
C-15	0,17	0,38	1,49	2,79	2,87	4,91
C-16	86,40	191,14	415,17	777,44	388,02	664,17
C-16 : 1	0,34	0,75	5,07	9,49	31,21	53,42
C-16 : 2	0,68	1,50	5,07	9,49	3,91	6,69
C-18	11,94	26,41	55,88	104,64	36,39	62,29
C-18 : 1	30,94	68,50	113,25	212,07	97,44	166,68
TOTALES	328,04	725,64	1.423,11	2.684,91	1.354,63	2.318,75

N. I.: No identificado.

(1): valores expresados en mg/ 100 gr.

(2): valores expresados en mg/ 100 gr. de extracto seco.

## CAPITULO IV

### DISCUSION

#### IV.1. Aspectos microbiológicos.

##### IV.1.1. Leche.

El análisis de las tablas III.1, III.2, III.3, III.4, III.5 y III.6 pone de manifiesto:

1.º) La bien conocida influencia de los métodos de ordeño y recogida de la leche sobre la naturaleza de la flora de la misma, siendo especialmente de destacar la elevada tasa de estafilococos en las muestras obtenidas por ordeño a mano y la escasa cuantía de los mismos en las obtenidas por ordeño mecánico.

2.º) Que prácticamente toda la flora presente en la leche prolifera en Agar Elliker (incluidos los micrococos y estafilococos); parece necesario, pues, obrar con suma precaución si se intenta valorar la carga de estreptococos del grupo láctico homofermentativo (*Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*) de la leche sobre la base de los recuentos en este medio, como sugieren algunos autores (DEMETER, 1969).

3.º) Que las especies microbianas más abundantes son los estreptococos homofermentativos *S. lactis* y *S. cremoris* con clara predominancia del primero. En conjunto llegan a suponer en la leche mecánicamente ordeñada alrededor del 100 % y en la de ordeño manual el 60-70 % de la totalidad de la flora. Es de notar la ausencia de otros estreptococos habitualmente hallados por otros autores con mayor frecuencia que los citados (ABD-EL-MALEK y GIBSON, 1948).

4.º) Que la leche de la explotación ganadera con que se fabricaron los quesos experimentales carecía prácticamente de micrococos pero que la tasa de enterococos es, a todos los efectos, idéntica a la de las leches de ordeño manual con que los pequeños fabricantes elaboran sus quesos.

5.º) Que la carga total de enterococos estaba constituida de dos, únicas especies: *Streptococcus faecalis*, var. *liquefaciens* y *Streptococcus faecium* en proporciones próximas a 1 : 1. Conviene hacer notar que el aislamiento de *S. faecalis* y sus variedades en la leche es bastante frecuente pero no así el de *S. faecium* (ABD-EL-MALEK y GIBSON, 1948; SCHMIDT y LENOIR, 1972) que se halla, en cambio, con frecuencia en el queso.

6.º) La presencia de una sola especie de lactobacilos, *Lactobacillus plantarum* que, a todos los efectos, es el responsable de los recuentos en Agar Rogosa. La tasa de lactobacilos en las leches examinadas supera a la encontrada por algunos autores en estudios similares (PERRY y SHARPE, 1960; JOHNS y COLE, 1959; HILL y THORNTON, 1958; NAYLOR y SHARPE, 1958 a) que por otra parte suelen hallar el *L. plantarum* con mucha menos frecuencia que las especies del género *Leuconostoc*,

el *L. brevis* e incluso el *Pediococcus cerevisiae* y el *L. fermenti* (PERRY y SHARPE, 1960).

Parece evidente que la tasa de lactobacilos en la leche es muy variable, como señalan SHARPE y MATTICK (1960) y MABBITT (1961), oscilando entre menos de 1 a  $10^6$  gérmenes/ml.

##### IV.1.2. Evolución de la flora en los quesos fabricados con leche cruda.

Los microorganismos identificados en los quesos a lo largo de la maduración son los mismos que los encontrados en la leche. Todos los grupos de gérmenes lácticos, como los enterococos, sufren considerables incrementos durante los primeros días y su tasa se mantiene luego bastante estable. A lo largo del proceso madurativo no se observan alteraciones significativas en las proporciones de *S. lactis* y *S. cremoris*. En este sentido, los resultados obtenidos discrepan de las observaciones efectuadas por DAWSON y FEAGAN (1957) en el queso Cheddar. El predominio en todas las fases, aunque no muy acusado, de *S. lactis* parece contradecir también las afirmaciones de los citados autores de que en los quesos fabricados con cultivos mixtos de *S. lactis* y *S. cremoris*, en éste último el responsable fundamental de la acidificación inicial.

La presencia de *L. plantarum* como único representante del género *Lactobacillus* en el queso tipo «Ulloa» es, en cierto modo, sorprendente ya que lo habitual es hallar en los quesos de pasta cruda *L. casei* como único representante del género y sólo en ocasiones, junto a otros lactobacilos, el propio *L. plantarum*, según sucede en el queso Cheddar (PERRY y SHARPE, 1960; DAVIS, 1965) o en nuestro queso de «Cabrales» (BURGOS y col., 1971).

PERRY y SHARPE (1960) observan notables variaciones en la flora perteneciente al género *Lactobacillus* entre la leche cruda y los quesos elaborados a partir de la misma (sin adición de fermentos), encontrando en el queso, mucho más frecuentemente que en la leche, *L. plantarum* y *L. casei*. Atribuyen este hecho a la baja tasa de lactobacilos en sus leches y a la diferente aptitud para su desarrollo en el queso. Aunque existieran concentraciones mucho más bajas de otros lactobacilos en nuestras muestras de leche no es fácil que alteraran la absoluta predominancia del *L. plantarum* por ser éste uno de los que más rápidamente se desarrollan en el queso (PERRY y SHARPE, 1960).

El incremento continuado del número de *L. plantarum* a lo largo del período madurativo concuerda con las observaciones de otros autores (MABBITT y ZIELINSKA, 1956; NAYLOR y SHARPE, 1958 b; JOHNS y COLE, 1959; SINGH y col., 1967) quienes ponen de manifiesto que en el queso Cheddar aumentan rápidamente durante las primeras 6 semanas y alcanza una tasa máxima hacia los 4-5 meses.

Los micrococos y estafilococos sufren un progresivo descenso a lo largo de la maduración hasta prácticamente desaparecer al cabo de los 25 días; esta observación confirma las efectuadas en otros quesos por ROBERTSON y PERRY (1961). Parece

que lo habitual es un notable incremento de su tasa durante los dos primeros días hasta cifras del orden de  $10^7$  —  $10^8$  gérmenes/grano y un progresivo declive a partir de entonces (véase MABBITT, 1961). Las cifras obtenidas por nosotros en los quesos, al primer día de maduración, son de este orden.

Dada la escasa atención prestada a la contribución de los micrococos a la maduración del queso se desconoce la razón de este descenso, pero teniendo en cuenta la capacidad de este tipo de microorganismos de crecer a bajas actividades de agua, parece lógico atribuir este fenómeno al descenso del pH o al antagonismo con algún otro componente de la flora.

La tasa de enterococos, cuando su número se estabiliza, hacia el comienzo de la segunda semana, es del mismo orden que la observada en los quesos Camembert (LENOIR, 1962), Roquefort (DEVYOD, 1969) y Cheddar (CLARK y REINBOLD, 1967). La evolución a lo largo del proceso madurativo parece concordante con las ya viejas observaciones de KOSIKOWSKI y DAHLBERG (1948).

#### IV.2. *Proteolisis de los quesos elaborados con leche cruda.*

La tasa de nitrógeno soluble es relativamente alta desde los primeros días y se eleva muy considerablemente durante las dos primeras semanas, estabilizándose luego. Al final del proceso madurativo se alcanzan valores que se encuentran dentro del amplio rango de nitrógeno soluble hallado por otros autores en distintos tipos de quesos como el Cheddar, Camembert, Saint Paulin, Gruyere Comté (LENOIR, 1963; JACQUET y LENOIR, 1954), cuyas tasas de nitrógeno soluble al final del proceso madurativo oscilan entre un 16 y un 40 %, excepto en los quesos excesivamente madurados en los que puede llegar a alcanzar valores del orden de un 50 %.

También son bastante similares a las cifras halladas por estos autores, los porcentajes que del nitrógeno soluble representa el nitrógeno no proteico, que al final del período madurativo viene a ser del 40 %.

Resulta en cambio sorprendente la elevada tasa alcanzada, desde las fases iniciales de la maduración, por los productos de reacción positiva frente a los reactivos de Nessler y ninhidrina. Aunque los valores obtenidos no puedan, en ningún caso, tomarse como cifras precisas del nitrógeno de aminoácidos y del nitrógeno en forma de ion amonio, (puesto que: a) el amoníaco da también reacción positiva a la ninhidrina, b) la extinción por átomo de nitrógeno de aminoácidos y amoníaco es muy distinta y c) también ofrecen reacción positiva a la ninhidrina otros grupos amina libre —oligopéptidos, etc.— que no precipitan con ácido tricloroacético) pueden servir, en cualquier caso, de aproximaciones muy útiles para comparar la evolución de la proteolisis en los distintos quesos. Resulta muy difícil eludir, a la vista de estas cifras y las de nitrógeno no proteico, la conclusión de que la proteolisis es extensa y profunda a lo largo de todo el proceso.

Cual era de esperar en quesos artesanalmente fabricados, en los que tanto la composición de la leche y su flora como las condiciones precisas de elaboración

pueden variar dentro de un rango amplio, se observan considerables diferencias individuales.

#### IV.3. *Quesos fabricados experimentalmente en el laboratorio con leche pasterizada y distintos fermentos.*

La evolución de la flora de los quesos experimentalmente fabricados con un cultivo mixto, compuesto por todos los gérmenes con posible significación en la maduración de los quesos que se habían encontrado en la leche cruda y en los quesos de fabricación artesana, es, en todo, similar a la observada en los quesos que se pretendió imitar. La multiplicación microbiana es, sin embargo, mucho más rápida; partiendo de cifras iniciales del mismo orden se alcanza, ya durante la primera semana, una tasa que en todo tipo de recuentos es un orden de magnitud superior. Concordantemente con este hecho, se observa un descenso mucho más rápido del pH que alcanza ya valores de 5,5 (en los que se estabiliza) al cabo de un par de semanas, en tanto que en los quesos elaborados con leche cruda el pH, al cabo del mismo período de maduración, es alrededor de media unidad de pH superior, aunque, al final del proceso, alcance el mismo valor (5,5).

Es posible que las diferencias observadas en el comportamiento de la flora microbiana de estos quesos, con respecto a la de los elaborados a partir de leche cruda, puedan atribuirse al efecto estimulante del crecimiento microbiano que sobre la leche ejerce el calentamiento (AUCLAIR y PORTMAN, 1958); quizás no puedan descartarse, sin embargo, otros factores, tales como la composición química de la leche y la posible ausencia, en los quesos experimentales, debido a la pasterización de la leche, de algún tipo de microorganismo con efectos inhibidores o antagónicos, e incluso la concentración final de ClNa alcanzada en el componente acuoso, que no fue determinada en ninguno de los experimentos efectuados.

La evolución de las fracciones nitrogenadas ofrece considerables diferencias con respecto a la de los quesos elaborados con leche cruda. La comparación de las tablas III.12 y III.13 y figuras III.4 y III.5 con la tabla III.15 y la figura III.7 pone de manifiesto que la solubilización de las caseínas es mucho más lenta en los quesos experimentales; lo mismo puede decirse, aunque en menor extensión, con respecto a la evolución del nitrógeno no proteico que, sin embargo, en términos de porcentaje sobre el nitrógeno soluble, el nitrógeno no proteico alcanza tasas más elevadas en estos quesos que en los fabricados con leche cruda, hasta el final de la maduración en que los porcentajes del nitrógeno no proteico respecto al soluble se igualan, debido al considerable retraso con que se inicia en los quesos experimentales la solubilización proteica.

La evolución de los nitrógenos «amínico» y «amoniacial», expresados en términos relativos al extracto seco, es muy parecida en ambos tipos de quesos; dada la lenta solubilización de la caseína, el porcentaje que su tasa representa respecto

del nitrógeno soluble es, en cambio, mucho más alta, sobre todo durante las etapas iniciales, en los quesos experimentales.

La proteolisis es, pues, menos extensa en estos quesos aunque de parecida profundidad a la de los fabricados a partir de leche cruda.

Parece lógico atribuir estas diferencias en la marcha de la proteolisis, indudable reflejo de la diferente actividad metabólica de la flora ya que no se establecieron variantes con respecto a la otra fuente de proteasas (el cuajo), a las variaciones introducidas en las condiciones ambientales en que tuvo lugar la maduración, especialmente en lo que se refiere a la humedad relativa que en la maduración de los quesos experimentales no fue controlada; la pérdida de agua en estos quesos experimentales fue mucho más rápida y acusada, alcanzándose, al final de la maduración, de extracto seco del 60 % frente a las de 45-50 % halladas en los quesos elaborados en la provincia de Lugo con leche cruda. Podría argumentarse que esto no fue obstáculo para la multiplicación microbiana, pero debe tenerse en cuenta varias consideraciones a este respecto; de un lado, que esta proliferación es muy rápida sólo durante la primera semana, cuando el extracto seco no ha pasado todavía de un 40 %; de otro que los efectos inhibidores de las bajas actividades de agua y del ClNa no se ejercen con igual intensidad, ni a los mismos valores de estos parámetros, sobre la multiplicación microbiana y cada una de las diferentes actividades metabólicas, siendo diferentes la intensidad y el orden en que éstas se ven afectadas también, según la especie microbiana en que se estudie (véase SCOTT, 1957 e INGRAM y KITCHELL, 1967) y, finalmente, que la proteolisis medida es consecuencia de múltiples acciones enzimáticas coordinadas, cuyos catalizadores proceden de distintos tipos microbianos.

Los experimentos realizados fabricando experimentalmente quesos en el laboratorio con cultivos constituidos por diversas combinaciones de algunos de los gérmenes que componían el cultivo mixto completo, al que hacen referencia los párrafos precedentes, ponen de manifiesto (véase tabla III.16 y figuras III.8 y III.9):

1.º) Que los estreptococos lácticos y los lactobacilos sólo producen una solubilización muy limitada de la caseína, alcanzándose, en los quesos fabricados con cultivos en los que no intervienen otros gérmenes, valores muy inferiores a los de los quesos fabricados con leche cruda; parecen, en cambio, considerablemente eficaces en la degradación final de los compuestos nitrogenados. En este sentido, conviene hacer notar que el *L. plantarum* ofrece una actividad proteolítica mínima y que algunas cepas carecen enteramente de ella (TOURNEUR, 1972) y que es, en realidad, muy poco lo que se conoce de la actividad proteolítica de *S. lactis* y *S. cremoris*, lo que se sabe permite deducir que es muy variable tanto en su extensión como en su profundidad, dependiendo de las cepas (HEINEMAN, 1957) y con las condiciones culturales (WILLIAMSON y SPECK, 1962). De otro lado, es muy probable que la totalidad de la solubilización proteica observada en este lote de quesos sea debida a la acción del cuajo.

2.º) Que las cepas de micrococos utilizadas, aisladas de la leche de origen y de los quesos elaborados con ella, sin pasterizar, apenas ejercen actividad proteolítica en estos quesos sugiriendo ya, que su contribución a las características finales del producto es probablemente muy limitada. Esto no quiere decir, sin embargo, que tales cepas de micrococos carezcan de actividad proteolítica; debe tenerse en cuenta su rápida y total desaparición del queso en las 2-3 primeras semanas de maduración (véase tabla III.10 y figura III.3 y ROBERTSON y PERRY, 1961).

3.º) Que tampoco el *S. faecium* contribuye a la proteolisis. De hecho, algunos autores lo consideran desprovisto de actividad proteolítica (DEIBEL, 1964) aunque SCHMIDT y LENOIR (1972) han demostrado que al menos ciertas cepas de *S. faecium* poseen una proteasa endocelular, con pH óptimo entre 5,4 y 5,7. Las tasas alcanzadas por los nitrógenos «soluble», «no proteico», «amínico» y «ammoniacal», en los quesos que se fabricaron con cultivos mixtos de este microorganismo y los gérmenes lácticos, no supera, en ningún caso, a las que alcanzan los elaborados sólo con gérmenes lácticos.

4.º) Que en la proteolisis del queso tipo «Ulloa» juega un papel primordial el *S. faecalis*, var. *liquefaciens*; es en los quesos elaborados con cultivos en cuya composición entra, donde las fracciones nitrogenadas producto de la proteolisis alcanzan valores más altos.

Debe hacerse notar en este sentido que siempre se ha considerado al *S. faecalis* y especialmente a las cepas clasificadas como de la variedad *liquefaciens* el más proteolítico de los estreptococos del grupo D de Lancefield y el único provisto de proteasas extracelulares (SCHMIDT y LENOIR, 1972) y que se ha demostrado también que posee activas peptidasas (DUDANI, 1950; HOKOMA y SALLE, 1958).

#### IV.4. Pruebas a escala semiindustrial y establecimiento del cultivo definitivo.

##### IV.4.1. Proteolisis.

En ninguno de los quesos experimentales fabricado en el laboratorio se logró un grado de proteolisis del mismo orden que el observado en los quesos fabricados en origen a partir de leche cruda, lo que se atribuyó a las distintas condiciones ambientales, según se ha dicho y razonado en el apartado anterior. Esta variante quedó controlada en los experimentos en que se elaboraron los quesos a escala semiindustrial en la quesería lucense a que se refiere el apartado III.1.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de las distintas fracciones nitrogenadas (Tabla III.17 y figuras III.10 y III.11) al final del proceso madurativo de los mismos confirman, en líneas generales, las observaciones efectuadas en los quesos que se fabricaron en nuestro laboratorio; demuestran la escasa contribución de *S. faecium* a la proteolisis de estos quesos y que con la combinación de la especie *S. faecalis*, var. *liquefaciens* y gérmenes lácticos se logra, en los quesos fabricados

con leche pasterizada, un grado de proteolisis que es comparable, tanto en extensión como en profundidad, a la de los elaboradores con leche cruda. Demuestran igualmente a) que no existe diferencia alguna entre alaborar los quesos salando la leche antes de cuajarla o fabricarlos, como es habitual, con leche no adicionada de sal o introducirlos en salmuera después del prensado y b) que carece de efectos significativos la variación, dentro de un rango amplio, del número de gérmenes iniciales de *S. faecalis*, var. *liquefaciens* presente en el inóculo utilizado para la preparación de los cultivos «madre»; su ritmo de multiplicación debe ser suficientemente rápido como para alcanzar, en cualquier caso, cifras finales muy parecidas, a juzgar por sus efectos proteolíticos. De otro lado, confirman también, de algún modo, la hipótesis de que la limitada proteolisis de los quesos elaborados en el laboratorio traducía los efectos de una deshidratación excesivamente rápida y profunda durante la maduración.

#### IV.4.2. *Calidad organoléptica.*

Que la contribución microbiológica fundamental a la calidad organoléptica de este tipo de quesos es la del *S. faecalis*, var. *liquefaciens* queda plenamente demostrado por los resultados obtenidos al someter los quesos elaborados al jurado de catedores.

El baremo elaborado por el jurado demuestra que el atributo organoléptico más importante en este tipo de quesos, como probablemente en cualquier otro, es el sabor, que, junto al olor, es por otra parte, el más estrechamente dependiente de la actividad microbiana. Los otros atributos considerados, color y consistencia, apenas dependen de la flora microbiana y se hallan más estrechamente ligados a la posible adición de colorantes, o a la presencia de una cantidad más o menos elevada de carotenos y otros colorantes naturales en la leche (color) o a las manipulaciones sufridas por la cuajada (consistencia).

El examen de la tabla III.23 pone de manifiesto la elevada puntuación alcanzada, especialmente por el sabor, por aquellos quesos que fueron fabricados con «fermentos» constituidos exclusivamente por los gérmenes lácticos y el *S. faecalis*, var. *liquefaciens*. Debe tenerse en cuenta, a la hora de valorar estos resultados, que el jurado estaba calificando estos quesos por contrastación con un «queso ideal» al que se le otorgase la puntuación de 100 en cada uno de los atributos considerados, de tal modo que cuando se sometió al citado jurado, sin identificación previa, un queso fabricado con leche cruda que había sido considerado por algunos de los miembros como de calidad óptima, el atributo sabor alcanzó una puntuación final de 73 puntos sobre 100.

La demostración de la contribución del *S. faecalis*, var. *liquefaciens* a la calidad organoléptica de un queso no puede considerarse como algo nuevo; ya hace casi 40 años que LANE (1939) y HANSEN (1937) hicieron los primeros ensayos tendentes a la incorporación de este tipo de gérmenes a los «fermentos» de algunos quesos,

ensayos que fueron continuados más adelante por TITTSLER y col. (1948); DAHLBERG y KOSIKOWSKI (1948); DEANE (1951), etc. El interés por la contribución de los enterococos al sabor de los quesos se ha prolongado hasta nuestros días (KURMAN, 1966 y 1968; SCHMIDT y LENOIR, 1972).

En la misma línea que las observaciones de los autores citados respecto a otros quesos extranjeros, nuestras experiencias dejan pocas dudas respecto a que el principal responsable de la calidad organoléptica del queso tipo «Ulloa», fabricado con leche cruda, es el *S. faecalis*, var. *liquefaciens* y que si se quiere fabricar un queso similar con leche pasterizada es necesario incorporar cepas, como la aislada por nosotros, al «fermento» usado.

Los higienistas de los alimentos pondrán, sin duda, serias objeciones a su empleo, basándose en dos tipos de consideraciones:

a) Los estreptococos fecales tienen por hábitat natural el tracto intestinal del hombre y los animales. Su frecuente presencia en los alimentos (carne, GREENBERG, 1965; vegetales, MUNDT, 1963; salchichas, NIVEN, 1963) suele ser considerada como índice de una defectuosa calidad higiénica y existe una clara tendencia a considerarlos como indicadores de calidad sanitaria (sobre todo en los alimentos congelados, debido a que los enterococos ofrecen una mayor resistencia a la congelación que los indicadores habituales, gérmenes coliformes, CHRISTOPHERSEN, 1968).

b) El carácter potencialmente patógeno que a los enterococos se ha atribuido.

Sin embargo, si juzgamos su carácter patógeno por su actividad hemolítica hay que tener en cuenta que sólo la variedad *zymogenes* de *S. faecalis* y algunas cepas de *S. durans* son  $\beta$ -hemolíticas y que la variedad *liquefaciens* de *S. faecalis* solamente produce hemolisis  $\gamma$ , lo mismo que *S. lactis* y *S. cremoris* (HALLMAN, 1961), dos estreptococos lácticos de empleo frecuentísimo e indiscutible en las industrias lácteas.

A mayor abundamiento, las cepas de *S. faecalis*, var. *liquefaciens* que, como la por nosotros usada, han sido aisladas de los productos lácteos carecen de poder hemolítico (SCHMIDT y LENOIR, 1972). Es evidente que desde este punto de vista no puede juzgarse con igual severidad al *S. faecalis*, var. *liquefaciens* que al *S. faecium* ( $\alpha$ -hemolítico) o al *S. durans* ( $\beta$ -hemolítico) (HALLMAN, 1961).

Las especulaciones sobre el carácter patógeno de los enterococos se basan, además, en otro tipo de experiencias: la investigación de brotes de intoxicaciones alimentarias y los intentos de reproducir experimentalmente los síntomas de la toxioinfección mediante la administración de cultivos vivos del germe o de filtrados de los mismos. Son muy numerosos los brotes de intoxicación en los que una investigación microbiológica ha conducido a la detección, en el alimento implicado, de algún enterococo (véase, por ejemplo, la recopilación de SHATTOCK —1964—, *S. faecalis* entre ellos. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que en las investiga-

ciones epidemiológicas media siempre un considerable período de tiempo entre la presentación de los síntomas clínicos de intoxicación y el examen de los alimentos sospechosos y que durante este período pueden proliferar abundantemente los enterococos y tal vez enmascarar la causa real de la intoxicación. De hecho, no puede seriamente incriminarse a un microorganismo como responsable de una intoxicación alimentaria, en tanto no se descubra en el alimento su correspondiente toxina y, que el autor sepa, pese a los intentos que se han hecho, nadie ha sido capaz de demostrar la producción de tal toxina por los enterococos. GONSALUS y BELLAMY (1944) primero, y más tarde HUFFER y col. (1950) y DACRE (1953) sugirieron, tras el examen de las características metabólicas de una serie de cepas de *S. faecalis* a las que se había responsabilizado de unos brotes de intoxicaciones alimentarias, que el agente tóxico de estos microorganismos pudiera ser la tiramina producida por descarboxilación de la tirosina. Esta sugerencia tiene pocos visos de verosimilitud si se tiene en cuenta (DACK y col., 1949) que ni la ingestión, por persona, de hasta un gramo de este compuesto produce síntoma alguno de intoxicación y que SHATTOCK (1949) encontró la cepa de *S. faecalis* con mayor actividad tirosina descarboxilasa en grandes cantidades en un queso cuyo consumo no había producido síntomas de intoxicación.

Las investigaciones en que se ha intentado reproducir experimentalmente la intoxicación por ingestión de cultivos de enterococos o sus filtrados no han tenido más que un éxito limitado, logrado casi siempre en animales, especialmente sensibles como los gatos (HARTMAN y col., 1965 y BRYAN, 1969). De acuerdo con las experiencias de CARY y col. (1938) que utilizaron para ellas enterococos  $\alpha$ -hemolíticos, la ingestión de filtrados de cultivos no causa problema alguno y sólo tras el consumo de cultivos vivos puede, en algún caso, producir síntomas clínicos de toxíinfección.

Las experiencias más recientes de OSLER y col. (1948) en las que unos cuantos voluntarios ingirieron cultivos de cepas de *S. faecalis* de distinta procedencia dieron resultados que pueden considerarse demostrativos de la falta de carácter patógeno de estos microorganismos. Lo mismo puede decirse de los estudios de BUTTIAUX (1956) y DEIBEL (1960) que fueron incapaces de provocar síntoma alguno de trastornos gastrointestinales o de otra naturaleza, tras la ingestión por voluntarios de cultivos vivos, en medio de muy diversa naturaleza, de *S. faecalis* y *S. faecium*.

Quizás, sin embargo, la prueba más concluyente del escaso o nulo riesgo que su presencia en los alimentos pueda originar sea su frecuentísima abundancia en cantidades exorbitantes en los más diversos alimentos, sin que su consumo se trate de trastorno de algún tipo.

#### IV.5. Aminoácidos libres en el queso tipo «Ulloa».

La semejanza entre los quesos fabricados con leche cruda y los elaborados con leche pasterizada y el fermento constituido por *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum*

y *S. faecalis*, var. *liquefaciens* queda confirmado, desde un punto de vista químico, por los resultados recogidos en la tabla III.24, en la que puede apreciarse la similitud de los valores de nitrógeno total soluble en etanol del 92 %. Esta tabla demuestra también, en cierto modo, que la proteolisis en los quesos fabricados con leche pasterizada y el cultivo con *S. faecalis*, var. *liquefaciens* es algo más profunda, dado que la tasa de aminoácidos libres es alrededor de un 150 % de la de los quesos elaborados con leche cruda, en tanto que las cifras de nitrógeno peptídico soluble en etanol del 92 % de uno y otro queso guarda una relación inversa a la anterior.

El análisis de la tabla III.25 que recoge los aminoácidos libres de la cuajada y ambos tipos de quesos pone de manifiesto:

1.º) La ausencia de ácido aspártico en ambos tipos de quesos pese a su presencia inicial en la cuajada, explicable si se tiene en cuenta, entre otros factores posibles, elevado cociente de transaminación de este aminoácido con el ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, en los quesos (SCHORMÜLLER y GELLRICH, 1956).

2.º) La escasa tasa alcanzada por la serina y treonina en el queso fabricado con leche cruda, con respecto a la alcanzada en la cuajada y el queso fabricado con leche pasterizada. En este sentido parece oportuno señalar, de un lado, que se ha demostrado (LUSIANI y col., 1971) que *S. faecalis*, var. *liquefaciens* produce a partir de las proteínas lácteas que los demás estreptococos por ellos estudiados y de otro que frente al *S. faecium*, el *S. faecalis* es mucho más activo en la degradación de la serina que desamina a piruvato (DEIBEL y NIVEN, 1960). Se desconoce en qué medida las diferencias observadas en la tasa de este aminoácido responden al diferente grado alcanzado por la actividad de estas rutas en las dos especies citadas y en cual, a la posible acción de otros gérmenes presentes, sin duda, en los quesos fabricados con leche cruda.

3.º) El menor aumento de la tasa de ácido glutámico en el queso elaborado con leche cruda, comparado con el queso fabricado a partir de leche pasterizada en el que alcanza un valor triple al de la cuajada, probable reflejo, más que otra cosa, de la diferente tasa de actividad  $\alpha$ -cetoglutárico transaminasa en la flora de ambos quesos.

4.º) La ausencia de prolina tanto en la cuajada como en el queso fabricado con leche cruda frente a una tasa relativamente considerable en el queso elaborado con leche pasterizada. Tal vez la explicación de la baja tasa de prolina en ambos quesos se halle en que el *S. faecalis* carece de actividad prolinasa y prolidasa y los estreptococos *lactis* y *cremoris* ofrecen actividades muy escasas de esta naturaleza (LUSIANI y col. 1971).

5.º) La escasa tasa de cistina en ambos quesos, sobre todo, en el fabricado con leche pasterizada en el que solamente se detectan indicios; este aminoácido suele faltar en los quesos madurados por bacterias (ALI, 1960; REITER y SHARPE, 1971).

6.º) En ambos quesos la leucina e isoleucina se hallan entre los aminoácidos

más abundantes, sufriendo la isoleucina grandes aumentos respecto a la cuajada. Estos resultados son similares a los observados en otros quesos: Edam (ALI, 1960), Cabrales (SALA y BURGOS, 1972), Provolone (HARPER y LONG, 1956), Romano (LONG y HARPER, 1956). Es, de acuerdo con LUSIANI y col. (1971), el aminoácido que *S. faecalis* produce en mayor abundancia a partir de la leche y según SCHORMÜLLER y GELLRICH (1956) no sufre transaminación con el ácido -ceto-glutárico.

7.º) Las tasas alcanzadas por la tirosina en ambos quesos son sumamente similares y apenas representan incrementos sobre el nivel alcanzado en la cuajada, lo que ofrece cierto interés habida cuenta que se postula una alta actividad descarboxilasa para el *S. faecalis* (GUNSLAS y BELLAMY, 1944; HUFFER y col. 1950; Dacre, 1953).

8) Otro de los aminoácidos más abundantes es la fenilalanina (en ambos tipos de quesos), especialmente en el queso elaborado con leche cruda, al igual que ocurre en quesos similares (REITER y SHARPE, 1971; ALI, 1960). En ocasiones se ha sugerido que *S. faecalis* posee actividad fenilalaninadescarboxilasa (McGILVERY y COHN, 1948), pero las experiencias de DEIBEL (1964) demuestran que cuando existe es mínima comparada, por ejemplo, con la tiramina descarboxilasa.

9.º) La histidina, ausente en el queso fabricado con leche cruda y en la cuajada y, generalmente, no hallada en este tipo de quesos madurados por bacterias, alcanza una de las tasas más altas en el queso elaborado con el cultivo que contenía *S. faecalis*, var. *liquefaciens*. LONG y HARPER (1953) sugirieron que este aminoácido podría tener resultados desfavorables sobre el sabor de los quesos Provolone y Cheddar; HINTZ y col. (1956) hacen la misma observación con respecto al queso suizo, pero las cifras por ellos alcanzadas en los quesos de sabor anómalo son mucho más elevadas que las aquí logradas. LONG y HARPER (1956), en el queso Romano, encuentran este aminoácido como mayoritario, junto con la leucina. Se desconoce cuál pueda ser la causa de la baja tasa alcanzada por este aminoácido en el queso fabricado con leche cruda, ya que de acuerdo con LUSIANI y col., (1971) tanto el *S. cremoris* y *S. lactis* como *S. faecalis* son capaces de liberarlo a partir de las proteínas de la leche.

10.º) Considerable interés puede tener el diferente nivel alcanzado por la arginina en ambos tipos de quesos, que es unas cuatro veces más alto en el elaborado a partir de leche pasterizada, dado que ciertos autores lo han considerado responsable de la adquisición por parte del queso de un sabor amargo (véase SCHORMÜLLER, 1968). Sin embargo la tasa alcanzada se encuentra muy por debajo de la citada por otros autores (REITER y SHARPE, 1971) para quesos elaborados con leche pasterizada y sin la participación de enterococos.

Dado que *S. faecalis* apenas libera arginina en las proteínas de la leche, lo mismo que *S. lactis* y *S. cremoris* y que los quesos en cuya maduración participa

*L. plantarum* tienen sabor ligeramente amargo, lo mismo que el citado aminoácido, es probable que en el acúmulo de arginina esté implicado el *L. plantarum*.

#### IV.6. Composición lipídica.

La técnica física de extracción descrita por SCARPELLINO y KOSIKOWSKI (1961) resulta, en nuestras experiencias, en un rendimiento (21,41 %) muy inferior al por ellos señalado (60 %). Sin embargo, con la combinación de los métodos físico y químico se ha logrado en este trabajo un rendimiento (aproximadamente del 80 %) que puede considerarse como muy alto dadas las dificultades que la extracción de la grasa del queso presenta.

El examen de las tablas III.28 y III.29 y de las figuras III.19, III.20 y III.41 pone de manifiesto que no existen diferencias cualitativas ni cuantitativas fundamentales entre la naturaleza de los lípidos extraídos por el procedimiento físico y los que permanecieron adheridos a las partículas de caseína y sólo se extrajeron con disolventes.

A la misma conclusión se llega en las cuantificaciones de los componentes de la fracción lípidos apolares de ambos extractos procedentes de los quesos fabricados con leche pasterizada (tabla III.36). Tampoco en la composición porcentual de los ácidos grasos libres y de los triglicéridos se observan diferencias dignas de especial mención entre los extractos físicos y químicos; a este respecto cabe señalar solamente la mayor proporción en que se encuentra el C-10 y el C-12 del extracto químico de la fracción ácidos grasos libres (el C-10 no se detecta en el extremo físico), pero hay que hacer notar, de un lado, que son ácidos grasos poco abundantes y de otro que es probable que el método de extracción física haya resultado en el arrastre de una proporción considerable de los ácidos de cadena corta con el agua caliente (48°C) utilizada para la separación de la fase grasa.

Del análisis de las tablas III.54, III.55, III.56 y III.57, que muestran la composición de los lípidos polares de los extractos físicos y químico de ambos quesos, se deduce que las diferencias entre ambos extractos son mínimas también a este respecto.

##### IV.6.1. Componentes lipídicos apolares.

Tanto en ambos tipos de quesos como en la cuajada se han identificado los siguientes componentes apolares: triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol e hidrocarburos. Como en otros tipos de quesos (FUJISHIMA y col., 1970; NAKANISHI y KAYA, 1971), el total de lípidos polares constituyen alrededor del 99 % de la materia grasa; en la cuajada, este porcentaje se halla ligeramente disminuido, elevándose los lípidos polares a un 1,47 % del total de lípidos, evidentemente por la degradación, en gran parte, de algunos de los componentes de la fracción lípidos polares durante la maduración.

Tanto en los quesos como en la cuajada, la mayor parte de los lípidos «neutros» (tabla III.35) está, como en la leche, constituida por triglicéridos. Si bien el porcentaje que estos representan en la cuajada es algo más alto (86 %) que en los quesos (80,95 y 80,50 %), estas diferencias parecen, en gran parte, debidas al proceso lipolítico, dado que la suma de monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres en los quesos es considerablemente más alta que en la cuajada, pero hay que tener en cuenta también que la recuperación en el conjunto de los sistemas cromatográficos utilizados para la purificación de los lípidos apolares es superior en la cuajada (100, 70 %) que en los quesos (97,42 y 97,15). Podría suponerse que estas diferencias en el porcentaje de recuperación fueran debidas a la existencia de algunos componentes no cuantificados en la fracción insaponificables; sin embargo, el porcentaje de insaponificables es en todas las muestras (cuajada y quesos) sumamente parecido oscilando en torno al 5 %.

La acción de las lipasas durante el proceso madurativo se refleja en un incremento del porcentaje, sobre los lípidos totales, representado por los diglicéridos en el queso fabricado con leche pasterizada, los monoglicéridos en los fabricados con leche cruda y los ácidos grasos libres en ambos tipos de quesos, especialmente en el fabricado a partir de leche pasterizada. El esquema lipolítico parece, sin embargo, distinto en ambos tipos de quesos; en el fabricado con leche pasterizada, parece afectar a un número más elevado de moléculas de triglicéridos aunque limitado con mayor frecuencia a sólo uno de sus enlaces éster. En cualquier caso, la superior intensidad lipolítica del conjunto de microorganismos participantes en la maduración del queso fabricado con leche pasterizada se traduce en un mayor incremento de la fracción ácidos grasos libres.

Las cifras de ácidos grasos libres son, en todos los casos (Tablas III.31, bis y III.35) considerablemente más bajas que las dadas por FUJISHIMA y col. (1970) para el queso Gouda y como era de esperar muy inferiores también que las halladas por otros autores en los quesos azules (ANDERSON y DAY, 1965) pero del mismo orden que las encontradas en los quesos Feta (EFTHYMIOU, 1967) y en el suizo (LANGLER y DAY, 1966) y Cheddar (BILLS y DAY, 1964). Dada la técnica por nosotros empleada encaminada a un conocimiento global de los lípidos del queso «Ulloa», es de esperar que no se contabilicen en los valores % de ácidos grasos libres sobre el total de lípidos, los de cadena corta, como tampoco lo hacen en la tabla III.31. bis, pero debe tenerse en cuenta que los ácidos grasos libres mayoritarios en todos los quesos son los de 16 y 18 átomos de carbono, por lo que no parece que nuestras cifras puedan desviarse mucho del porcentaje real que los ácidos grasos libres representan del total de los lípidos.

También es mucho más baja que la dada por FUJISHIMA y col. (1970), la tasa alcanzada por el colesterol, único esterol identificado que decrece ligeramente en la maduración pero que en cualquier caso se aproxima mucho, en nuestras experiencias, a la admitida como normal en la leche (KURTZ, 1965). Era de esperar este li-

gero descenso en la cifra de colesterol dado que no es sintetizado, pero posiblemente sí utilizado por los microorganismos. Desde este punto de vista, las cifras de FUJISHIMA y col. (1970) deben ser miradas con ciertas dudas, a menos que la leche utilizada para la fabricación de los quesos por ellos analizados fuera más rica en colesterol de lo que es habitual.

La tasa de hidrocarburos es, prácticamente, idéntica en las muestras de cuajada y ambos quesos. Las cifras por nosotros obtenidas son bastante más elevadas que las dadas como escueleno por KURTZ (1965) para la leche. Tal vez la razón de la discrepancia entre estas cifras radique más que en auténticas diferencias de composición, en los métodos de análisis. Nuestros valores fueron, sin embargo, confirmados por los resultados obtenidos por cromatografía en columna de alúmina, Brokman grado I, a partir del extracto insaponificable, considerando como hidrocarburos las sustancias eluidas con éter de petróleo.

#### IV.6.2. Composición en ácidos grasos de los lípidos apolares.

Los ácidos grasos más abundantes en todos los glicéridos del queso «Ulloa», parecen ser C-16, C-18: 1, C-14, C-18: 2 y C-16: 1; en los diglicéridos de la cuajada y del queso fabricado con leche pasterizada abunda también el C-9 y en los diglicéridos de ambos quesos el C-10, ácidos grasos habitualmente muy escasos en la leche y que apenas hemos detectado en los triglicéridos del queso.

Comparando la composición porcentual en ácidos grasos de cada una de las fracciones de lípidos apolares de la cuajada y ambos tipos de quesos puede observarse, entre otras, las siguientes diferencias:

1.) Diglicéridos (tabla III.33): en la fracción diglicéridos, el C-9 presente sólo en trazas en el queso elaborado con leche cruda, alcanza casi un 10 %, en términos de peso, en el elaborado con leche pasterizada; en este queso, también se duplica en la fracción diglicéridos la tasa del C-10, que alcanza valores casi 20 veces superiores a los de la cuajada. De hecho se convierte el segundo en abundancia siguiendo de cerca al C-16.

En ambos quesos se observa, en esta fracción, un considerable incremento, con respecto a la cuajada, de la tasa de C-12 y C-14 y un acusado descenso del C-14: 2 y C-16: 1 y la total desaparición de C-17 y C-18: 2.

El porcentaje que en esta fracción alcanza el C-18: 1 es bastante más elevado en el que es elaborado con leche cruda que en el fabricado con leche pasterizada; en el primero aumenta con respecto a la cuajada y en el segundo disminuye considerablemente.

2.) Monoglicéridos (tabla III.34): en esta fracción sólo aparece C-8 en los quesos fabricados con leche pasterizada, en los que es también mucho más abundante el C-9; por el contrario, el C-10, que en la fracción diglicéridos era el segundo en importancia, en este queso, alcanza valores mínimos mucho más bajos que en el queso fabricado con leche cruda y en la cuajada. El C-12, C-14 y C-14: 2 son tam-

bién bastante más escasos en los quesos fabricados con leche pasterizada que en la cuajada y en los elaborados con leche cruda.

En ambos quesos se observa una tasa más baja que en la cuajada del muy mayoritario C-16, y más alta, en cambio, de los ácidos C-18 y C-18: 1; este último, al igual que el C-18: 2 alcanza porcentajes acusadamente superiores en el queso elaborado con leche pasterizada; de hecho, en la fracción monoglicéridos de los quesos elaborados con leche pasterizada, tanto el C-18: 1 como el C-16 representan individualmente alrededor de 1/3 del total de ácidos grasos.

3.º) Ácidos grasos libres (tabla III.31): las diferencias en la composición porcentual de la fracción ácidos grasos libres procedentes de la cuajada y ambos tipos de quesos son muy poco acusadas. Las más destacables son la mayor abundancia en los quesos que en la cuajada de los ácidos C-10, C-12, C-16 y C-18: 3 y la ausencia de C-8 en los quesos.

4.º) Triglicéridos (tabla III.32): las diferencias en la composición en ácidos grasos de los triglicéridos de los dos quesos son mínimas, pero si se observan algunas con respecto a la cuajada; las más notables son la mayor abundancia en los quesos del C-16 y C-18: 1 y el menor porcentaje que representa el C-14, que en los quesos se reduce a la mitad del que alcanza en los triglicéridos de la cuajada.

Comparando la composición en ácidos grasos de las distintas fracciones de la cuajada por un lado y de cada queso por el otro, se observa que los ácidos grasos de C-4 á C-7 solamente se detectan en los triglicéridos, debido, sin duda, a que dada la baja proporción de estos ácidos grasos respecto al total y al casi absoluto predominio de los triglicéridos sobre los demás componentes, es más fácil obtener una muestra purificada más concentrada y trabajar a atenuaciones que no es posible utilizar con las muestras propias de los monoglicéridos y diglicéridos; es probable, por ello, que el cromatógrafo no haya detectado, en estas dos últimas fracciones, las pequeñas cantidades de ácidos grasos de bajo número de átomos de carbono.

Las diferencias más claras observadas en el resto de los ácidos grasos de las distintas fracciones de la cuajada son: 1.º) la mayor abundancia en los triglicéridos que en el resto de las fracciones de los ácidos grasos C-10, C-12 y C-14. 2.º) el menor porcentaje, en esta fracción, de los ácidos grasos C-18: 1 y C-18: 2; el porcentaje de C-18: 1 en la fracción ácidos grasos libres es doble que en los triglicéridos, en los diglicéridos y monoglicéridos es 1,18 y 1,37 veces respectivamente mayor que el alcanzado en los triglicéridos. 3.º) El C-14: 2 y el C-16: 1 de los diglicéridos alcanzan valores que representan el doble de los que se obtienen en las demás fracciones. 4.º) Algo similar ocurre con el C-18 de los ácidos grasos libres. 5.º) El C-16, el más abundante en todas las fracciones, alcanza tasas más altas en los monoglicéridos y diglicéridos donde representa alrededor del 43 y el 34 %, respectivamente, frente al 32 % en que se encuentra en los triglicéridos y el 28 % en la fracción ácidos grasos libres.

En el queso fabricado con leche cruda las diferencias existentes entre los ácidos grasos de las cuatro fracciones son menores, sobre todo entre los que tienen un número par de átomos de carbono (que son los que se encuentran en mayor proporción); a este respecto, cabe destacar: 1.º) la baja tasa que el C-10 alcanza en la fracción ácidos grasos libres y la alta concentración lograda en los diglicéridos, en los que representa un 10 %. 2.º) Que el C-14 abunda también más en los diglicéridos que en el resto de las fracciones. 3.º) La casi total desaparición en los diglicéridos de los ácidos C-14: 2, C-15 y C-18: 2. 4.º) No se detectan o solamente se obtienen indicios en los diglicéridos y monoglicéridos del C-13, C-14: 1 y C-18: 3.

En el queso fabricado con leche pasterizada destaca: 1.º) la mucha mayor abundancia (de 10 a 20 veces) del C-10 en los diglicéridos que en los ácidos grasos libres, triglicéridos y monoglicéridos. 2.º) En los monoglicéridos son mucho más escasos que en las demás fracciones los C-10, C-12 y C-14 y abundan, en cambio, más que en ellas el C-18: 1 y el C-18: 2. 3.º) En los triglicéridos, el porcentaje de C-16 es considerablemente más alto que en las demás fracciones, que es, sin embargo, el ácido graso más abundante en todas ellas.

Se esperaba que un análisis de esta naturaleza pudiera indicar los cambios más importantes por los que transcurren las transformaciones de los lípidos en estos quesos (muy especialmente la lipólisis). Teóricamente, la abundancia de los ácidos grasos más fácilmente escindidos de los triglicéridos por las lipasas debiera ser menor en los monoglicéridos y diglicéridos que en los triglicéridos y mayor, en cambio, en los ácidos grasos libres. También debería observarse un enriquecimiento del porcentaje de estos ácidos en la fracción ácidos grasos libres de los quesos con respecto a la misma fracción de la cuajada y un empobrecimiento de los mismos en los mono y diglicéridos del queso, respecto a su contraparte de la cuajada.

Los datos obtenidos no encajan, sin embargo, dentro de un esquema de esta naturaleza y no permiten, por ello, sacar conclusiones respecto a la marcha del proceso lipolítico; lo que, por otro lado, no es demasiado sorprendente si se tienen en cuenta las complejas transformaciones que los ácidos grasos libres pueden sufrir y la contribución de los fosfolípidos al incremento, por lipólisis, de los ácidos grasos libres.

Más esclarecedores resultan, a este objeto, los datos recogidos en las tablas III.31, bis; III.32, bis; III.33, bis y III.34, bis, calculados teniendo en cuenta el peso molecular medio de los ácidos grasos de cada fracción y expresados en término de peso de los ácidos grasos que serían liberados por hidrólisis a partir de los correspondientes glicéridos.

Del estudio de estas tablas se deduce que todos los ácidos grasos de la fracción ácidos grasos libres han aumentado en los quesos con respecto a la cuajada, en términos absolutos, y que el incremento es, también en todos los ácidos, más acusado en el queso fabricado con leche pasterizada, salvo en los que se refiere al C-18: 2 y

C-18: 3 que han aumentado más en el queso fabricado con leche cruda. Los que han sufrido mayor incremento (en ambos quesos), en términos absolutos (mg/extracto seco), son los siguientes y en el orden en que se citan: C-16, C-18: 1, C-14, C-18, C-12 y C-16: 1.

En los mismos términos, en la fracción triglicéridos se han producido considerables descensos, durante la maduración, de los ácidos grasos C-4, C-5, C-6, C-9, C-12, C-14, C-14: 2, C-16: 2 y C-19 que en mg/100 gr de extracto seco alcanzan los siguientes valores: queso elaborado con leche cruda, 108, 162, 257, 180, 638, 3432, 165, 56, 347 y 17, respectivamente; queso fabricado a partir de leche pasterizada: 692, 212, 371, 191, 463, 3412, 125, 72 y 347. Han aumentado, en cambio, en la fracción triglicéridos el C-14: 1, C-16, C-18, C-18: 1 y C-18: 3 en la siguiente cuantía y en los mismos términos (mg/100 gr extracto seco): queso elaborado con leche cruda 169, 1274, 239, 2786 y 79, respectivamente; queso fabricado con leche pasterizada: 159, 1552, 189, 1567, 101, también respectivamente. El C-16: 1 aumenta, en esta fracción, en el queso elaborado con leche cruda 147 mg/100 gr de extracto seco y disminuye en el fabricado con leche pasterizada 108 mg/100 gr. de extracto seco. El C-18: 2 disminuye en el fabricado con leche cruda 17 mg/100 gr. de extracto seco y aumenta en el elaborado con leche pasterizada 108 mg/100 gr. extracto seco.

En los diglicéridos aumentan, sobre todo, el C-10 (150 y 370 mg/100 gr. extracto seco en los quesos fabricados con leche cruda y pasterizada respectivamente), el C-12 (71 y 124 mg en idénticos términos y orden) el C-14 (98 y 181 mg. idem), el C-16 (148 y 144 mg. idem), el C-18 (86 y 92 mg. idem) y el C-18: 1 (95 y 17 mg. idem) y disminuyen el C-12: 1 (14,5 mg/100 gr. extracto seco en ambos quesos), el C-14: 2 (57,9 y 45 mg/100 gr. extracto seco en los quesos elaborados con leche cruda y pasterizada, respectivamente), el C-16: 1 (69 y 107 mg. idem), el C-17 (38,4 y 38,4 mg idem) y C-18: 2 (33,8 y 33,8 mg idem).

En los monoglicéridos, aumentan en el queso fabricado con leche cruda y desciden en el elaborado con leche pasterizada en la cuantía que se expresa (mg/100 gr. extracto seco) los siguientes ácidos grasos: C-10 (41 y 17), C-12 (18 y 9), C-14 (8 y 50), C-14: 2 (21 y 20) y C-16: 2 (34 y 13); disminuyen en ambos quesos el C-12: 1 (1,5 y 1,6 mg. queso fabricado con leche cruda y pasterizada, respectivamente), C-12: 2 (6 y 9 idem), C-13 (3,1 y 3,1 mg idem), C-16 (26 y 120 mg. idem), C-16: 1 (10 y 19 mg idem) y C-17 (2 y 13 mg idem); aumentan C-18 (86 y 21 mg idem), C-18: 1 (89 y 41 mg idem) y C-18: 2 (7 y 84 mg idem).

De donde se deduce que, aparte de la contribución que a la fracción ácidos grasos libres tengan las degradaciones habidas en los lípidos polares, el C-16 debe proceder de transformaciones sufridas por otros ácidos grasos, escindidos de los glicéridos; lo mismo puede decirse de C-18: 1, C-18: 2 y, probablemente, C-18: 3.

Parece muy probable, a juzgar por las pérdidas sufridas por los ácidos grasos de los triglicéridos y diglicéridos que el más afectado por las lipasas actuantes

(y utilizado para su conversión en los ácidos grasos C-16, C-18: 1, C-18: 2 y, probablemente, C-18: 3, que aumentan tanto en la fracción ácidos grasos libres como en los triglicéridos y C-14: 1 y C-18 que sufren un considerable incremento en los triglicéridos, al término de la maduración) sea el C-14, y en menor cuantía, el C-12, C-9 y los de cadena más corta.

Del análisis de las tablas III.32 y III.32, bis; III.33 y III.33, bis; III.34 y III.34, bis, se deduce también que durante la maduración disminuye el grado de saturación de los lípidos apolares.

#### IV.6.3. Componentes lipídicos polares.

El conjunto de lípidos polares (fracción eluida con metanol de la columna de ácido silílico-celita 1/1 cuando no se introduce la etapa intermedia acetona) alcanza cifras más elevadas en la cuajada que en los quesos. Puede decirse que en el curso de la breve maduración de este queso desaparece alrededor de un 30 % de esta fracción.

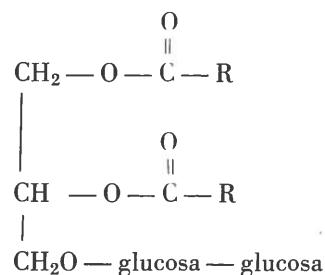
La cifra global de lípidos polares se aproxima a las observadas en diversos quesos por NAKANISHI y KAYA (1971) y es considerablemente superior a las obtenidas por UMEMOTO y SATO (1973) en el Cheddar.

En todos los casos, la fracción de lípidos polares está constituida por lecitina, fosfatidiletanolamina, cerebrósidos, glicosilglicéridos y esfingomielina; en la cuajada se detectan también indicios de lisofosfatidiletanolamina que no se evidencian en los quesos. El componente más abundante es, en todos los quesos, la lecitina (entre 1/2 y 1/4 del total de lípidos polares) seguida de la fosfatidiletanolamina; el más escaso es la esfingomielina. No se han detectado, en cambio, el resto de los 12 componentes de esta fracción que FUJISHIMA y col. (1970) aislan en el queso Gouda, o de los 8 que hallan NAKANISHI y NAYA (1971) en el queso Cheddar. Particularmente relevante parece ser la ausencia, ya en la cuajada, de fosfatidilserina y fosfatidilinositol que en la leche de vaca alcanzan cifras superiores a la fosfatidilcolina (RHODES y LEA, 1958; KUZDZAL-SAVOIE, 1971).

UMEMOTO y SATO (1973) presentan datos de experimentos de cromatografías en ácido silílico que sugieren que, en el queso Cheddar se hallan presentes no menos de tres glicolípidos distintos y así lo afirman. Esta interpretación no concuerda, sin embargo, con los datos por ellos obtenidos en las cromatografías en lámina fina donde todas las fracciones, incluidas las de los presuntos glicolípidos, dan reacción positiva al fósforo. En cualquier caso, sus datos no permiten deducir si se tratan de cerebrósidos (de los que se conocen dos en la leche: ceramida glucosido y ceramida-glucosilgalactósido —véase MORRISON y col., 1965; FUJINO y col., 1969; MORRISON y HAY, 1970—) glicosilglicéridos, o acilglicosas.

Que nosotros sepamos es ésta la primera vez que se pone de manifiesto la presencia en un producto lácteo de un glicosilglicérido y se aclara su estructura.

La relación molar glucosa/glicerol deja pocas dudas al respecto; debe tratarse de un compuesto con la siguiente estructura.



Se desconoce por el momento el hidroxilo de la primera molécula de glucosa que participa en el enlace glucosilglucósido, que puede ser 1-4, 1-6 ó 1-2 (véase SHAW y BADDLEY, 1968).

Llama, en cierto sentido, la atención la ausencia, en este glicolípido, de galactosa, monosacárido presente en el único dihexosido conocido en la leche. Parece pertinente recordar a este respecto que en los cerebrósidos detectados por nosotros en el queso y la cuajada tampoco se encuentra más hidrato de carbono que la glucosa.

Por el momento, se desconoce el origen de este producto: aunque no se han publicado datos respecto a su presencia en la leche, es dudosa otra procedencia, dado que se encuentra ya en la cuajada y en concentraciones similares a las halladas en los quesos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es uno de los componentes de la fracción lipídica de *S. faecalis* (VORBECK, 1965) y de *L. plantarum* (SHAW y BADDLEY, 1968).

El análisis de la tabla III.58 pone de manifiesto un descenso relativamente acusado respecto a la leche y a la cuajada (del porcentaje relativo al total de lípidos) de la lecitina en los quesos fabricados con leche cruda. Pronunciadamente más acusado es el descenso del % de la fosfatidiletanolamina, con respecto a los lípidos totales, en los quesos, de un modo muy similar en ambos, al igual que ocurre con los cerebrósidos. En cambio, no se observan variaciones tan notables, respecto a la cuajada, en los porcentajes que representan la esfingomielina y los glicosilglicéridos.

Sin embargo, si se consideran los contenidos en extracto seco, puede observarse un acusado descenso de alrededor de 1/3 en la tasa de la esfingomielina y los glicosilglicéridos, y una reducción del orden del 50 % en cerebrósidos, lecitina y fosfatidiletanolamina.

Es muy posible que la degradación de los fosfolípidos sea la responsable de la aparición de las sustancias aminadas que se observan en las cromatografías en lámina

fina de los lípidos polares (manchas 1, 2 y 3 de la figura III.41), que no han sido identificadas, pero que son mucho más abundantes en ambos quesos que en la cuajada.

#### IV.6.4. *Ácidos grasos de los lípidos polares.*

La composición en ácidos grasos de los glicosilglicéridos de la cuajada y los quesos difiere considerablemente (tabla III.52), sugiriendo que son objeto de profundas transformaciones metabólicas; en los glicosilglicéridos de la cuajada domina plenamente el C-10 que supone el 70 % del total y los ácidos grasos de 16 o más átomos de carbono no representan más de un 13 %; en los glicosilglicéridos de ambos quesos el C-10 supone un 4 %, en el fabricado con leche cruda, y un 14 % en el elaborado a partir de leche pasterizada y los de 16 ó más átomos de carbono representan entre un 65 y un 70 %. En conjunto, los ácidos grasos de los glicosilglicéridos del queso son considerablemente menos saturados, pudiendo calcularse que el porcentaje de dobles enlaces se multiplican los glicosilglicéridos del queso por un factor de 5.

En términos generales, del estudio de los ácidos grasos de los fosfolípidos y cerebrósidos se deducen observaciones que confirman las de SAITO y col. (1965); estos autores concluyen que en los fosfolípidos de la leche, se encuentran en mayor abundancia que en los lípidos apolares de la misma, los ácidos grasos C-18: 1, C-18: 2 y C-18: 3 y una tasa inferior de C-14 y C-16 y la presencia de ácidos grasos de más de 20 átomos de carbono que faltan en los lípidos apolares.

Al igual que ocurre con los fosfolípidos y cerebrósidos de la leche (SMITH y LOWRY, 1962), en los del queso y cuajada se dan notables diferencias en la composición en ácidos grasos de cada uno de estos lípidos polares.

En la cuajada, el ácido palmítico es el más abundante de los saturados en los cerebrósidos, lecitina, esfingomielina y fosfatidiletanolamina; en lo que se refiere a la fosfatidiletanolamina, estas observaciones están de acuerdo con las de SMITH y LOWRY (1962) para la leche. El ácido oleico es, igualmente, el más abundante de los insaturados en todas estas fracciones de lípidos polares. Los ácidos linoleico y linolénico se encuentran en mayor proporción en la esfingomielina y fosfatidiletanolamina que en los cerebrósidos y lecitina; en esta última falta el linolénico.

Durante la maduración se dan notables cambios en la composición en ácidos grasos de casi todos los fosfolípidos y cerebrósidos.

En la esfingomielina, aumentan los porcentajes del C-12 y C-18, multiplicándose por un factor de aproximadamente 3, en ambos quesos, y desciende el C-14: 2, el C-18: 1 y el C-18: 2 que llega casi a desaparecer; en conjunto, aumenta el grado de saturación.

En la lecitina se observa un leve aumento del C-14: 1, un claro incremento del porcentaje de C-16 y una disminución del C-18 (cuyo % queda reducido a la mitad) y del C-14: 2.

En la fosfatidiletanolamina, se da un aumento del porcentaje del C-10, C-12, C-14, C-14: 1 (éste sólo en el queso fabricado a partir de leche pasterizada) y, sobre todo, del C-16 y disminuye, en cambio, el porcentaje representado por el C-18: 1 (pese a seguir siendo el mayoritario) y, sobre todo, del C-18: 2 (cuyo porcentaje se reduce a 1/2-1/4 del alcanzado en la cuajada); en conjunto, parece darse también un incremento del grado de saturación de los ácidos grasos.

En los cerebrósidos, aumenta muy considerablemente el C-8 en los quesos fabricados con leche pasterizada, el C-14 en los elaborados a partir de leche cruda y los C-16, C-16: 1 y C-18 en ambos quesos; disminuyen, en cambio, el C-18: 1 y el C-18: 2. Al igual que en la fosfatidiletanolamina y esfingomielina, se observa un incremento de los ácidos grasos saturados.

Resulta especialmente interesante, la constante presencia, en todos los fosfolípidos aislados de ambos quesos, de un ácido graso no identificado, ausente en la cuajada y cuyo tiempo de retención es ligeramente inferior al 6-20 (el señalado en las tablas III.40, III.43 y III.46 con un asterisco). A la luz de las observaciones de UMEMOTO y SATO (1973) parece probable que se trate del ácido lactobacílico, que estos autores encuentran en todos los fosfolípidos del queso y no en el resto de los lípidos polares; en cualquier caso, dada su ausencia en la cuajada, debe proceder del metabolismo microbiano.

#### IV.7. *Acidos grasos arrastrables en corriente de vapor.*

El examen de la tabla III.59 pone de manifiesto el incremento de la acidez arrastrable en corriente de vapor del queso con respecto a la cuajada; las cifras de ambos quesos son muy similares tanto en lo que se refiere a los ácidos grasos solubles como a los insolubles. Los valores para ellos obtenidos se aproximan a los hallados por DIXON y DEMAN (1968) para el queso Cheddar.

La columna y el detector de ionización de llama utilizados para los análisis cromatográficos de los ácidos grasos solubles arrastrables en corriente de vapor, de cadena corta (C-2 a C-4) separaron y detectaron una sustancia de tiempo de retención inferior al del ácido acético. Se pensó que pudiera tratarse de diacetilo, acetoína, dietilenglicol, acetaldheído o acetona, pero sus respectivos tiempos de retención fueron claramente diferentes. Esta sustancia, presente en la cuajada pero no en ninguno de los quesos se desconoce su naturaleza y cual pueda ser la significación de su desaparición a lo largo del proceso madurativo.

De los ácidos grasos de cadena corta, el acético y el butírico, son los más abundantes, tanto en la cuajada como en ambos quesos. El ácido isobutírico que alcanza tasas altas en otros quesos elaborados con bacterias, es muy escaso en éste, especialmente en el fabricado con leche pasterizada; parece, sin embargo, que la relación ácido n-butírico/ácido isobutírico es muy distinta en los diferentes tipos de quesos, dependiendo de los gérmenes participantes en la maduración.

La diferencia más apreciable entre los dos quesos es la relación acético/butírico;

en el queso elaborado con leche pasterizada es de 1,5 y en el fabricado con leche cruda es de 0,94.

La tasa total de ácidos grasos de cadena corta arrastrables en corriente de vapor se multiplica a lo largo de la maduración por un factor de 3 en el queso elaborado a partir de leche pasterizada y de algo menor de 2 en el fabricado a partir de leche cruda.

El estudio de las tablas III.63 y III.66 permite deducir que los ácidos grasos inferiores al C-5 representan, del total de ácidos arrastrables en corriente de vapor, en la cuajada el 6 %, el 2,7 % en los quesos elaborados con leche cruda y el 6,1 % en los fabricados con leche pasterizada; parece, pues, que el más elevado grado de lipólisis de este último tipo de quesos es consecuencia fundamentalmente de que la acción de las lipasas es más enérgica sobre los ácidos de cadena corta, aunque pudieran estar implicados también otros factores tales como las transformaciones metabólicas sufridas por uno y otro tipo de ácidos grasos.

Llama, en cierto modo, la atención la elevada cantidad de ácidos grasos de cadena de más de 5 átomos de carbono (hasta el C-18) arrastrado por la corriente de vapor.

La comparación de las tablas III.66 y III.31, bis nos permite deducir:

1.º) La pérdida de grandes proporciones de los ácidos grasos de cadena inferior a C-14, C-16 en el método utilizado para el aislamiento de los ácidos grasos libres por cromatografía en columna de ácido silícico y lámina fina; esta pérdida ha tenido lugar probablemente durante la extracción, ya que como solubles en agua se obtienen en la destilación en corriente de vapor (tabla III.64 y figuras III.70, III.71 y III.72).

2.º) Que en corriente de vapor son parcialmente arrastrables los ácidos grasos de hasta 18 átomos de carbono.

3.º) Que ninguno de los dos métodos utilizados permite un conocimiento preciso de la composición en ácidos grasos de la fracción ácidos grasos libres de longitud de cadena comprendida entre 6 y 15 átomos de carbono; afortunadamente casi todos estos ácidos grasos son mucho menos abundantes en el queso que los de menos de 6 y más de 15 átomos de carbono.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

1.—La flora láctica del queso tipo «Ulloa» está constituida por las especies: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Lactobacillus plantarum*. Además de la flora láctica, se encuentran también grandes cantidades de otros microorganismos: *Micrococcus spp* y dos especies de estreptococos pertenecientes al grupo D de Lancefield (*Streptococcus faecalis*, var. *liquefaciens* y *Streptococcus faecium*, en proporciones próximas a 1 : 1). Aunque sin interés en el proceso madurativo, se han encontrado también estafilococos coagulasa negativos.

2.—Todos los gérmenes, excepto los micrococos y estafilococos, aumentan bruscamente en los primeros días estabilizándose después hasta el final del proceso madurativo (25 días). Los micrococos sufren un aumento explosivo durante las primeras 24-48 horas, a partir de las cuales van disminuyendo progresivamente hasta desaparecer al final del proceso.

3.—Todas las fracciones nitrogenadas aumentan a lo largo de la maduración, alcanzándose valores, al final del proceso, comprendidos entre los siguientes límites: nitrógeno soluble (23 y 43 % respecto al nitrógeno total), nitrógeno no proteico (37,7 y 43 % sobre el nitrógeno soluble), nitrógeno amoniacal (12 y 16 % respecto al nitrógeno soluble) y nitrógeno amónico (9 y 13 % sobre el nitrógeno soluble).

4.—Se postula la conveniencia de usar para la fabricación del queso tipo «Ulloa» a partir de leche pasterizada, un «fermento» constituido por: *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum* y *S. faecalis*, var. *liquefaciens*.

Los quesos fabricados a escala semiindustrial con el cultivo de esta naturaleza elaborado en este laboratorio, alcanzaron, al final de la maduración, unos valores de sus fracciones nitrogenadas más significativas comprendidos entre los límites obtenidos para los quesos fabricados con leche cruda. Sometidos a un jurado de catadores, alcanzaron, comparándolos con un queso ideal, una alta puntuación, similar a la de los quesos elaborados con leche cruda. El atributo organoléptico que alcanzó mayor puntuación en estos quesos fue el sabor.

5.—El germen principal responsable de la proteolisis y de las características organolépticas del queso tipo «Ulloa», es el *Streptococcus faecalis*, var. *liquefaciens*.

6.—Los aminoácidos más abundantes en los quesos tipo «Ulloa» elaborados con leche cruda son los siguientes y en el orden en que se citan: leucina, fenilalanina, lisina, isoleucina y glutámico. En los quesos fabricados con leche pasterizada y el cultivo preparado por nosotros dominan los mismos aminoácidos además de la histidina y la arginina.

7.—Se confirma la extrema dificultad de una extracción completa de los lípidos del queso para un análisis fidedigno de sus componentes. El procedimiento físico de SCARPELLINO Y KOSIKOWSKI (1961) no rinde más de un 20 % del contenido

en grasa de este queso; mediante una combinación de este método y una extracción química se logran rendimientos del 80 %, no existiendo diferencias significativas entre la composición de los extractos físico y químico.

8.—La fracción lípidos apolares está constituida, tanto en la cuajada como en los quesos, por triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol e hidrocarburos. Esta fracción está cuantitativamente dominada por los triglicéridos que constituyen el 87,94 % del total de lípidos apolares, en la cuajada; el 80,95 % en el queso fabricado con leche cruda y el 80,50 % en los elaborados a partir de leche pasterizada.

9.—La lipolisis acaecida durante el proceso madurativo se traduce en un descenso de la tasa de los triglicéridos, acompañado de un aumento de los monoglicéridos y ácidos grasos libres en los quesos elaborados con leche cruda y de un incremento de los diglicéridos y ácidos grasos libres en los quesos fabricados con leche pasterizada.

No se observan, por el contrario, cambios significativos en las fracciones colesterol e hidrocarburos.

10.—Los ácidos grasos libres más abundantes en todas las fracciones de los lípidos polares de la cuajada y los quesos son, por el orden que se citan, los siguientes: C-16, C-18: 1, C-14, C-18: 2 y C-16: 1, excepto en los monoglicéridos de los quesos, en los que uno de los mayoritarios es el C-10 y en los diglicéridos de la cuajada y los quesos fabricados con leche pasterizada en los que abunda el C-9.

Durante la maduración, la composición en ácidos grasos de las distintas fracciones de lípidos apolares sufre profundos cambios; en la fracción ácidos grasos libres aumentan, en términos absolutos, todos los identificados en la cuajada (todos los saturados entre C-8 y C-18, más C-12: 1, C-12: 2, C-14: 1, C-14: 2, C-16: 1, C-16: 2, C-18: 1, C-18: 2 y C-18: 3) excepto el C-9; destacan, entre estos cambios, el incremento, en términos absolutos, de C-14: 1, C-16, C-18: 1 y C-18: 3 de los triglicéridos, que parece haber tenido lugar a expensas de profundas transformaciones metabólicas sufridas fundamentalmente por el C-14 y, en menor cuantía, por el C-12 y por todos los ácidos grasos de cadena más corta que el ácido nonanoico.

11.—En general, en los lípidos apolares se observa, a lo largo del proceso madurativo, un aumento del número de dobles enlaces.

12.—Los lípidos polares representan en la cuajada el 1,47 % del extracto lipídico total que, tras la maduración, pasan a ser el 1,02 % en los quesos fabricados con leche cruda y el 0,99 % en los elaborados a partir de leche pasterizada.

Como componentes de la fracción lípidos polares se han identificado, tanto en la cuajada como en los quesos, esfingomielina, lecitina, fosfatidiletanolamina, glicosilglicéridos y cerebrósidos. Durante la maduración desciende el contenido de todos ellos pero más acusadamente el de la fosfatidiletanolamina y el de los cerebrósidos.

13.—Es la primera vez, que el autor sepa, que se ha detectado la presencia de

glicosilglicéridos en un producto lácteo. El hallado en la cuajada y quesos tipo «Ulloa» es un glucosil-glucosil-diglicérido. Se desconoce su procedencia pero, dada la elevada proporción en que se encuentra ya en la cuajada, parece tener su origen en la leche.

Los ácidos grasos del glicosildiglicérido detectado son objeto de profundas transformaciones metabólicas durante la maduración del queso; en el de la cuajada domina netamente el C-10 que constituye alrededor de un 70 % del total de sus ácidos grasos. En el glucosildiglicérido de los quesos dominan, en cambio, el C-14, C-16 y C-18: 1 y se reducen a valores mínimos todos los de cadena más corta.

14.—Los distintos fosfolípidos y cerebrósidos de la cuajada y los quesos difieren ampliamente en su composición en ácidos grasos; en todos ellos abundan más que en los lípidos apolares C-18: 1, C-18: 2 y C-18: 3 y menos que en ellos C-14 y C-16. Durante la maduración se dan profundos cambios en sus ácidos grasos constituyentes. En conjunto, y al contrario de los que ocurren en los lípidos apolares, disminuye el número de dobles enlaces.

15.—En el transcurso de la maduración, y como reflejo de la lipolisis sufrida, se produce un incremento de la acidez volátil en una cuantía de alrededor de 110 m-equivalentes/100 gr de extracto seco. Entre los ácidos grasos arrastrables en corriente de vapor se encuentran todos los existentes en el queso de cadena no superior a 18 átomos de carbono. El incremento de la acidez volátil durante la maduración es más acusado en la fracción «insoluble» que en la «soluble» en agua. Como ácidos grasos de cadena inferior a C-5 se encuentran en la fracción «ácidos grasos solubles arrastrables en corriente de vapor» los ácidos acético, propiónico, butírico e isobutírico, con clara dominancia del acético (sobre todo en la cuajada) y el butírico. Ambos sufren, en términos absolutos, un incremento considerable durante la maduración.

#### RESUMEN

Se ha estudiado la microbiología y Bioquímica del queso gallego tipo «Ulloa». La flora láctica está constituida por *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* y *Lactobacillus plantarum*. Abundan también *Micrococcus spp.* *S. faecalis*, var. *liquefaciens* y *S. faecium*.

Se han investigado también las fracciones nitrogenadas más significativas: Nitrógeno soluble (23-43 % del N. total), no proteico (37-43 % del N. soluble), amoniacal (12-16 % del N. soluble) y amínico (9-13 % del N. soluble).

Se prepararon varios «starters» con los que se elaboraron diferentes quesos experimentales en el laboratorio y a escala semiindustrial que se valoraron comparándolos con los fabricados con leche cruda mediante el estudio de la proteolisis y sometiéndolos a un jurado de catadores. Se ha postulado la conveniencia de usar para la fabricación de este tipo de queso con leche pasterizada, un fermento constituido por *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum* y *S. faecalis*, var *liquefaciens*.

Se han estudiado también los aminoácidos libres y los componentes lipídicos y sus ácidos grasos de la cuajada y quesos fabricados con leche cruda y pasterizada utilizando el fermento de mejor resultado.

Los aminoácidos más abundantes son: leucina, fenilalanina, lisina, isoleucina y glutámico. Todos sufren un incremento durante la maduración.

Se han identificado en la fracción lípidos apolares (cuajada y quesos): triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol e hidrocarburos y en la lípidos polares: esfingomielina, lecitina, fosfatidiletanolamina, cerebrósidos y un glicosilglicerido.

La lipolisis acaecida durante la maduración se traduce en un incremento de la acidez volátil (110 m-equivalentes/100 gr de extracto seco), un descenso de los triglicéridos acompañado de un aumento de los monoglicéridos a diglicéridos y, sobre todo, de la fracción ácidos grasos libres.

La composición en ácidos grasos de los distintos lípidos apolares sufre profundos cambios durante la maduración, destacando el incremento de todos los ácidos grasos libres, excepto el C-9 y el incremento del C-14: 1, C-16, C-18, C-18: 1 y C18: 3 de los triglicéridos a expensas, probablemente, de transformaciones metabólicas sufridas por el C-14 y C-12. En lípidos apolares, aumenta el número de dobles enlaces durante la maduración y en los polares disminuye.

#### RESUME

On a étudié la microbiologie et la biochimie du fromage galicien type Ulloa. La flore lactique est constituée par *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* et *Lactobacillus plantarum*; le *S. faecalis* var. *liquefaciens* et le *S. faecium* y abondent aussi.

On a recherché également les fractions azotées les plus significatives: Azote (N) soluble (23-43 % du N total). Azote non-protéique (37-43 % du N soluble), Azote ammoniacale (12-16 % du N soluble), et Azote aminique (9-13 % du N soluble).

On prépara plusieurs «starters» avec lesquels on fabriqua de différents fromages expérimentaux à échelle laboratoire et à échelle semi-industrielle. Ces fromages furent valorés en les comparant avec ceux qui avaient été fabriqués avec du lait cru après une étude de la protéolysé et en les soumettant ensuite à un jury de dégustateurs.

On a postulé la conveniencia d'employer un ferment composé de *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum* et *S. faecalis* var. *liquefaciens* pour la fabrication de ce type de fromage avec du lait pasterisé.

On a étudié aussi les aminoacides libres et les composants lipidiques et leurs acides gras du lait caillé et des fromages fabriqués avec du lait cru et pasterisé en utilisant le ferment qui donne de meilleurs résultats.

Les aminoacides les plus abondants sont: la léucine, la phenylalanine, la

lysine, l'isoléucine et l'aminoacide glutamique. Tous ces aminoacides subissent une augmentation pendant leur maturation.

Dans la fraction de lipides apolaires (lait caillé et fromages) on a identifié des triglycérides, des diglycérides, des monoglycérides, des acides gras libres, du cholestérol et des hydrocarbures; et dans la fraction de lipides polaires on a identifié de la sphingomyéline, de la lécithine, de la phosphatidyléthanolamine, des cérobrosides, et un glycosilglycéride.

La lipolyse qui a lieu pendant la maturation se traduit en une augmentation de l'acidité volatile (110 m-équivalents/ 100 grams d'extract sec), une diminution des triglycérides accompagnées d'une augmentation des monoglycérides à des diglycérides, et surtout de la fraction d'acides gras libres.

La composition en acides gras des différents lipides apolaires subit de grands changements pendant la maturation; les plus remarquables sont l'augmentation de tous les acides gras libres, excepté le C-9, et l'augmentation du C-14: 1, C-16, C-18, C-18: 1 et C-18: 3 des triglycérides aux dépens, probablement, des transformations métaboliques subies par le C-14 et le C-12. Dans les lipides apolaires le nombre d'enchaînements doubles augmente pendant la maturation et il diminue dans les lipides polaires.

#### SUMMARY

A study has been carried out on microbiology and biochemistry of Galician cheese type Ulloa. The lactic flora is composed of *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* and *Lactobacillus plantarum*. It also contains plenty of *Micrococcus* spp. *faecalis* var. *liquefaciens* and *S. faecium*.

The most significant nitrogenous fractions have also been researched: Soluble nitrogen (N) (23.43 % of total N), non-proteic nitrogen (37.43 % of soluble N), ammonium nitrogen (12.16 % of soluble N) and aminic nitrogen (9.13 % of soluble N).

Several starters were prepared in order to make various experimental cheeses in the laboratory and at semi-industrial scale. These cheeses were evaluated by comparing them to those made with crude milk after studying their proteolyse and being analysed by a taste panel. The convenience of using a ferment or yeast composed of *S. lactis*, *S. cremoris*, *L. plantarum* and *S. faecalis* var. *liquefaciens* to make this type of cheese has been postulated.

A study has also been accomplished on free aminoacids and lipidic components and their fat acids contained in curds and in cheese made with crude and pasteurized milk using the ferment or yeast which gave the best results.

The most frequent aminoacids are: leucine, phenylalanine, lysine, isoleucine and glutamic acid. All these aminoacids have an increase during their maturity.

In the apolar lipid fraction (curds and cheeses) we have identified the following substances: triglycerides, diglycerides, monoglycerides, free fatty acids, cholesterol

and hydrocarbons; sphingomyeline, lecithine, phosphatidylethanolamine, cerebrosides and glycosilglyceride have been identified in the polar lipidic fraction.

The lipolysis occurred during ripening gives an increase in the volatile acidity as a result (110 m-equivalents/ 100 gr of dry extract), a decrease in the triglycerides accompanied of an increase in the monoglycerides to diglycerides, and specially in the free fat acids fraction.

The composition in fat acids of different apolar lipids has great changes during their maturity, the increase in all free fatty acids being remarkable, except C-9 and the increase in C-14: 1, C-16, C-18, C-18: 1 and C-18: 3 of triglycerides, probably at the expense of metabolic transformations borne by C-14 and C12. The number of double links during the ripening increases in apolar lipids and it decreases in polar ones.

#### AGRADECIMIENTO

El autor de este trabajo desea expresar su agradecimiento al Prof. Dr. D. Justino Burgos González por su ayuda, orientación y estímulo durante todo el período de realización de esta tesis y por la dirección de la misma.

También desea expresar su gratitud al Dr. D. Antonio López Pérez por el asesoramiento recibido en algunas de las experiencias que se describen en esta tesis y a todas aquellas personas, como el Prof. Dr. D. Francisco Javier Sala Trepant, que de alguna forma han contribuido a la realización de la misma.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABD-EL-MALEK y GIBSON, T. (1948): *J. Dairy Res.* **15**, 233.  
ADLER, E., GÜNTHER, G. y EVERETT, J. E. (1938): *Z. Physiol. Chem.* **225**, 27.  
ADLER, E., HELLSTRÖM, V., GÜNTHER, G. y EULER, H. von (1938): *Z. Physiol. Chem.* **255**, 14.  
ALAIS, Ch. (1970): «*Ciencia de la leche*», Ed. Continental, Barcelona.  
ALFORD, J. A. y FRAZIER, W. C. (1950): *J. Dairy Sci.* **33**, 107.  
ALFORD, J. A. y FRAZIER, W. C. (1950): *J. Dairy Sci.* **33**, 115.  
ALI, L. A. M. (1960): *Mededel Landbonwhogeschool Wageningen* **60** (4) 1.  
ANDERSON, J. I. W. (1962): *J. app., Bacteriol.* **25**, 352.  
ANDERSON, D. F. y DAY, E. A. (1965): *J. Dairy Sci.* **48**, 248.  
ANNIBALDI, S. (1962): 16th Intern. Dairy Congr. Copenhaguen B. Sect IV, 545.  
ASCHAFFENBURG, R. y MÜLLEN, J. E. C. (1949): *J. Dairy. Res.* **16**, 58.  
AUCLAIR, J. y PORTMANN, A. (1958): *Ann. Technol. (INRA)* **7**, 129.  
BAIRD-PARKER, A. C. (1963): *J. Gen. Microbiol.* **30**, 409.  
BAIRD-PARKER, A. C. (1965): *J. Gen. Microbiol.* **38**, 363.  
BARRIT, M. M. (1936): *J. Path. Bacteriol.* **42**, 441.  
BATES, J. (1962): *J. Res Nat. Bur. Stand.* **66A**, 179.  
BARIBO, L. E. y FOSTER, E. M. (1952): *J. Dairy Sci.* **35**, 149.  
BERRIDGE, N. J., HISCOX, E. R. y ZIELINSKA, M. (1963): 13th Intern. Dairy Congr. La Haya. **2**, 587.  
BILLS, D. D. y DAY, E. A. (1964): *J. Dairy Sci.* **47**, 733.  
BINGHAM, E. W. y ZITTLE, C. A. (1962): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 408.  
BLOCK, R. J. (1956): Charles C. Thomas Pub, Springfield.  
BOLCATO, V. y SPETOLLI, P. (1969): *Milchwissenschaft*, **24**, 4.  
BOTAZZI, V. (1959): *Latte* **33**, 675.  
BOTTAZI, V. (1962): 16 th. Intern. Dairy Congr. Copenhague B. Sect IV, 552.  
BRANDSAETER, E. y NELSON, F. E. (1956): *J. Bacteriol.* **72**, 68.  
BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. y SMITH, N. R. (1957): 7th Ed. Baltimore. Williams and Wilkins.  
BRUNDISH, D. E., SHAW, N. y BADDILEY, J. (1965): *Biochem J.* **97**, 158.  
BRYAN F. L.: En «*Food-Borne Infections and Intoxication*» (H. Riemman. Ed. Academic Press. New York.  
BURGOS, J., LÓPEZ, A. y SALA, F. J. (1971): *Anal. Fac. Vet. León* XVII, n.º 17, 109.

- BURTON, C. L., LOEWENSTEIN, M. y MICKLE, J. B. (1944): *Verslagen Landbouwkundige Onderzoeken*, n.º 50 (1) G.
- BUTTIAUX, R. (1956): *Rev. Médicale de Liège* XI, 521.
- BUYZE, G., VAN DEN HAMER, J. A., DE HAAN, P. G. y VAN LEEUWEN, ENHOEK, A. (1957): *J. Microbiol. Serol.* **23**, 345.
- CARY, W. E., DACK, G. M. y DAVISON, E. (1938): *J. Infect. Dis.* **62**, 88.
- CLARK, W. S. y REINBOLD, G. W. (1967): *J. Milk Food. Technol.* **30**, 54.
- COLLINS, E. B. (1962): *J. Dairy Sci.* **45**, 1263.
- COMPAIRE, C. F. (1966): «La fabricación de quesos en Galicia». Ed. Comité Nacional Lechero.
- COWMAN, R. A. y SPECK, M. L. (1967): *Appl. Microbiol.* **15**, 851.
- CZULAK, J. (1959): *Aust. J. Dairy Technol.* **14**, 177.
- CZULAK, J. y HAMMOND, L. A. (1956): Proc. 14th. Intern. Dairy Congr. Roma **2**, 158.
- CHRISTOPHERSEN, J. (1968): En «Low Temperature Biology of Foodstuffs» p. 251 (J. Hawthorn y E. J. Rolfe) Ed. Pergamon Press. Oxford.
- CHRISTOPHERSEN, J. y THIELE, H. (1952): *Kieler Milchw. Forsch. Bor.* **4**, 683.
- DACK, G. M., NIVEN, C. F., KIRSNER, J. B. y MARSHALL, H. (1949): *J. Infect. Dis.* **85**, 131.
- DACRE, J. C. (1953): *J. Dairy. Res.* **20**, 217.
- DAHLBERG, A. C. y KOSIKOWSKI, F. V. (1949): *J. Dairy Sci.* **32**, 630.
- DAVIS, J. G. (1965): «The Cheese» Vol. I. Ed. J. & A. Churchill. Ltd. London.
- DAWSON, D. J. y FRAGAN, J. T. (1968): *J. Dairy. Res.* **24**, 210.
- DAY, E. A. (1966): «Flavor Chemistry» A. C. S. publication **56**, 94.
- DAY, E. A., BASSETTE, R. y KEENEY, M. (1960): *J. Dairy Sci.* **43**, 463.
- DAY, E. A. y KEENEY, M. (1958): *J. Dairy Sci.* **41**, 718.
- DEANE, D. D. (1951): *J. Dairy. Sci.* **34**, 776.
- DEANE, D. D. y ANDERSON, T. G. (1942): *J. Dairy Sci.* **25**, 729.
- DEANE, D. D., ANDERSON, T. G., WARREN, F. G. y DAHLE, C. D. (1945): *Milk. Prod. J.* **36** (1), 25.
- DEIBEL, R. H. (1964): *Bact. Rev.* **28**, 330.
- DEIBEL, R. H. y NIVEN, C. F. Jr. (1964): *Bacteriol. Proc.* p. 164.
- DEMIETER, K. J. (1969): «Lactobacteriología». Ed. Acribia. Zaragoza.
- DEVOYOD, J. J. (1969): *Le Lait* **49**, 637.
- DITTMER, J. C. y LESTER, R. L. (1964): *J. Lipid. Res.* **5**, 127.
- DIXON, R. P. y DE MAN, J. M.: *Can. Inst. Food. Technol. J.* **1**, 51.
- DOLEZALEK, J. (1966). C. R.: XVII Congr. Intern. Lacter. Munich, D. 523.
- DOVAT, A. M., REINBOLD, G. W., HAMMOND, E. G. y VEDAMUTHU, E. R. (1970): *J. Milk Food Technol.* **33**, (9) 365.
- DOWNEY, W. K. y ANDREWS, P. (1969): *Biochem. J.* **112**, 559.
- DOUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. y SMITH, F. (1956): *Anal. Chem.* **28**, 350.
- DUCASTELLE, A. y LENOIR, J. (1969): *Le Lait* **489-490**, 615.
- DUDANI, A. J. (1950): En Deibel, R. H. (1964): *Bact. Rev.* **28**, 330.
- EFTHYMIOU, C. (1967): *J. Dairy Sci.* **50**, 20.
- ELLIKER, P. R., ANDERSON, A. W. y HANNESSON, G. (1956): *J. Dairy Sci.* **39**, 1611.
- EMMONS, D. B., MCGULAN, W. A. y ELLIOT, J. A. (1960): *J. Dairy Sci.* **43**, 861.
- EMMONS, D. B., MCGUGAN, W. A. y ELLIOT, J. A. (1961): *J. Dairy Sci.* **44**, 1157.
- EVANS, A. C. (1918): *J. Agr. Res.* **13**, 235.
- EVANS, A. C., HASTING, E. G. y HART, E. B. (1914): *J. Agr. Res.* **2**, 167.
- FEAGAN, J. T. y DAWSON, D. J. (1959): *Aust. J. Dairy. Technol.* **14**, 59.
- FOLCH, J., LEES, M. y STANLEY, G. H. S. (1957): *J. Biol. Chem.* **226**, 497.
- FORSS, D. A. (1969): *J. Dairy Sci.* **52**, 832.
- FORSS, D. A. y PATTON, S. (1966): *J. Dairy Sci.* **49**, 89.
- FRYER, T. F. (1970): *J. Dairy Res.* **37**, 9.
- FRYER, T. F., REITER, B. y LAWRENCE, R. C. (1967): *J. Dairy Sci.* **50**, 388.
- FUJINO, Y., SAEKI, T., ITO, S. y NEGISHI, T. (1969): *Jap. J. Zootech. Sci.* **40**, 349.
- FUJISHIMA, T., SATO, S., NEGISHI, T. y FUJINO, Y. (1970): *Jap. J. Dairy Sci.* **19**, A-1.
- GARVIE, E. I. (1959): *J. Dairy Res.* **26**, 227.
- GIBSON, T. y ABD-EL-MALEK, Y. (1945): *J. Dairy Res.* **14**, 35.
- GINKEL VAN, J. G. y ROOS, J. B. (1964): En «Oils, Fats y Fat products» (Boekenoogen, H. A.) Ed. Interscience Pub. London.
- GUNSLAS, I. C. y BELLAMY, W. D. (1944): 57th Ann. Rep., New York State Coll. Agr., Cornell Univ. Agr. Exper. Stat 116.
- GUNSLAS, I. C. y NIVEN, C. F. Jr. (1942): *J. Biol. Chem.* **145**, 131.
- GREENBERG, R. A. (1965): *Activities Report* **17**, 12.
- GUNTHER, H. L. (1959): *Nature* **183**, 903.
- HALLMAN: «Bakteriologie u. Serologie» Verlag Thieme. Stuttgart. 3.ª ed. p. 60.
- HAMMER, B. W. BRYANT, H. W. (1937): *Iowa State Coll. J. Sci.* **11**, 281.
- HANAHAM, D. J. y OLLEY, J. N. (1958): *J. Biol. Chem.* **813**, 231.
- HANSEN, H. C. (1937): En B. W. Hammer. *Panegyric*, p. 123 Coll. Press Inc. Ames. Iowa.
- HANSEN, H., BENDIXEN, H. A. y THEOPHILUS, D. R. (1933): *J. Dairy Sci.* **16**, 121.
- HARDY, R. y MACKIE, P. (1969): *J. Sci. Food Agr.* **20**, 193.
- HARPER, W. J. (1955): *J. Dairy Sci.* **38**, 1391.
- HARPER, W. J. (1957): *J. Dairy Sci.* **40**, 556.
- HARPER, W. J. (1959): *J. Dairy Sci.* **42**, 207.
- HARPER, W. J. y GOULD, I. A. (1959): Proc. 15th Intern. Dairy Congr. **1**, 455.
- HARPER, W. J. y KRISTOFFERSEN, T. (1956): *J. Dairy Sci.* **39**, 1773.
- HARPER, W. J. y LONG, J. E. (1956): *J. Dairy Sci.* **39**, 129.
- HARRIS, W. C. y HAMMER, B. W. (1940): *J. Dairy Sci.* **23**, 701.
- HARTMAN, P. A., REINBOLD, G. W. y SARASWAT, D. S. (1965): *J. Milk and Food Technol.* **35**, 213.
- HARVEY, R. J. (1960): *J. Dairy Res.* **27**, 41.
- HARVEY, R. J. y WALKER, J. R. L. (1960): *J. Dairy Res.* **27**, 335.
- HEINEMANN, B. (1957): *J. Dairy Sci.* **40**, 337.
- HILL, L. R. (1959): *J. Gen. Microbiol.* **20**, 277.
- HILL, D. A. y THORNTON, H. R. (1958): *Can. J. Microbiol.* **4**, 215.
- HINTZ, P. C., SLATER, W. C. y HARPER, W. J. (1956): *J. Dairy Sci.* **39**, 235.
- HODGE, J. E. (1966): En «Chemistry and Physiology of Flavors» (H. W. Schultze) p. 465. Ed. Avi. Publ. Co. Westport. Connecticut.
- HOKOMA, Y. SALLE, A. J. (1958): *J. Bacteriol.* **75**, 130.
- HUCKER, G. J. (1922): *New York State Agr. Expt. Sta., Technol. Bull.* 90.
- HUFFER, J. A. Jr., SANDERS, G. P. y TITTSLER, R. P. (1950): *J. Dairy Sci.* **33**, 401.
- IKAWA, M., CHAKRAVARTI, A. y TAYLOR, R. (1972): *Can. J. Microbiol.* **18**, 1241.
- INGRAM, M. y KITCHELL, A. G. (1967): *J. Food. Technol.* **2**, 1.
- INTERN. DAIRY FED. (FIL-IDF): Norma 2: 1958.
- INTERN. DAIRY FEDN (FIL-IDF): Norma 3: 1958.
- INTERNATIONAL SUBCOMMITTEE ON STAPHYLOCOCCI AND MICROCOCCI (1965): *Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.* **15**, 09.
- IRVINE, O. R. y BEACH, M. E. (1962): *J. Dairy Sci.* **45**, 648.
- JACKSON, H. W. (1958): *Perfum. Essent. Oil. Rev.* **49**, 256.
- JACQUET, J. y LENOIR, J. (1954): *C. R. Acad. Sci.* **238**, 2201.
- JENSEN, R. G. (1964): *J. Dairy Sci.* **47**, 210.
- JENSEN, R. G., DUGHIE, A. H., GANDER, G. W. y MORGAN, M. E. (1960): *J. Dairy Sci.* **43**, 96.
- JENSEN, R. G., SAMPUGNA, J., PARRY, R. M. y SHAHANI, K. M. (1963): *J. Dairy Sci.* **46**, 907.
- JENSEN, R. G., SAMPUGNA, J., PARRY, R. M., SHAHANI, K. M. y CHANDAN, R. C. (1962): *J. Dairy Sci.* **45**, 1527.
- JENSEN, R. G., SAMPUGNA, J., PEREIRA, R. L., CHANDAN, R. C. y SHAHANI, K. M. (1964): *J. Dairy Sci.* **47**, 1012.
- JOHNS, C. K. y COLE, S. E. (1959): *J. Dairy Res.* **26**, 157.
- JOHNSON, M. J. (1941): *J. Biol. Chem.* **137**, 575.
- JOHNSON, J. A., ROONEY, L. y SALEM, A. (1966): *Amer. Chem. Soc., Publ.* **56**, 153.
- KANDLER, O. (1961): *Milchwissenschaft* **16**, 523.
- KEENEY, M. y DAY, E. A. (1957): *J. Dairy Sci.* **40**, 874.
- KIELY, P. J., NOWLIN, A. C. y MORIARTY, J. H. (1960): *Cereal Sci. Today* **5**, 273.
- KINSELLA, J. E. (1969): *Chem. Ind.* p. 36.
- KINSELLA, J. E. (1971): *Adv. Food. Res.* **19**, 147.
- KINSELLA, J. E., PATTON, S. y DIMICK, P. S. (1967): *J. Am. Oil Chem. Soc.* **44**, 449.
- KLUYVER, A. J. y DONKER, H. L. En Kluyver, A. J. (1935): *Ergeb. Enzymeforsch* **4**, 230.
- KOCUR, M. y MARTINEC, T. (1962): Brno. (Checoslovaquia) Fac. Sci. Univ. Purkyne.
- KOSIKOWSKI, F. V. y DAHLBERG, A. C. (1948): *J. Dairy Sci.* **31**, 285.
- KRUOKOVSKY, V. N. y HERRINGTON, B. L. (1939): *J. Dairy Sci.* **22**, 137.
- KURMANN, J. A. (1966): *Le Lait* **46**, 499.
- KURMANN, J. A. (1968): *Milchwissenschaft*, **4**, 193.
- KURTZ, F. E. (1965): En «Fundamentals of Dairy Chemistry» B. H. Webb y A. H. Johnson. Avi. Publ. Co. Inc. p. 91.
- KUZDAL-SAVOIE, S. (1971): *Ann. Nutr. Alim.* **25** (4) A. 225.
- LANE, C. B. (1934): *Iowa St. Coll. J. Sci.* **9**, 173.
- LANGLER, J. E. y DAK, E. A. (1966): *J. Dairy. Sci.* **49**, 191.

- LAWRENCE, R. C. y HAWKE, J. C. (1966): *Biochem. J.* **98**, 25.
- LENOIR, J. (1962): *C. R. Acad. Agr.* **48**, 392.
- LENOIR, J. (1963): *Ann. Technol. (INRA)* **12**, 51.
- LONG, J. E. y HARPER, W. J. (1953): *J. Dairy Sci.* **36**, 175.
- LONG, J. E. y HARPER, W. J. (1956): *J. Dairy Sci.* **39**, 138.
- LÓPEZ, A. (1972): Comunicación personal.
- LUSIANI, G., BIANCHI, B. B. y SALVADORI, P. (1971): *Le Lait*, n.º 507, 431.
- MABBITT, L. A. (1961): *J. Dairy Res.* **28**, 303.
- MABBITT, L. A. y ZIELINSKA, M. (1955): *J. Dairy Res.* **22**, 377.
- MABBITT, L. A. y ZIELINSKA, M. (1956): *J. appl. Bacteriol.* **19**, 95.
- MAC LEOD, P., JENSEN, R. G., GANDER, G. W. y SAMPUGNA, J. (1962): *J. Bacteriol.* **83**, 806.
- MANDE, J. C., ROCOSA, M. y SHARPE, M. E. (1960): *J. appl. Bacteriol.* **23**, 130.
- MARTH, E. H. (1963): *J. Dairy Sci.* **46**, 869.
- MCDONALD, I. J. (1955): *Can. J. Microbiol.* **1**, 653.
- MC GILVERY, R. W. y COHN, P. P. (1948): *J. Biol. Chem.* **174**, 813.
- MILLER, I. y KANDLER, O. (1967): *Milchwissenschaft* **22**, 150.
- MOORE, P. R. y BAUMMAN, C. A. (1952): *J. Biol. Chem.* **195**, 615.
- MOORE, S., SPACKMAN, D. H. y STEIN, W. H. (1958): *Anal. Chem.* **30**, 1185.
- MOORE, S. y STEIN, W. H. (1954): *J. Biol. Chem.* **211**, 907.
- MORRISON, W. R. y HAY, S. D. (1970): *Biochem. Biophys. Acta* **202**, 460.
- MORRISON, W. R., JACK, E. L. y SMITH, L. M. (1965): *J. Am. Oil Chem. Soc.* **42**, 1142.
- MUNDT, J. O. (1963): *Appl. Microbiol.* **11**, 141.
- NAKAE, T. y ELLIOT, J. A. (1965): *J. Dairy Sci.* **48**, 293.
- NAKANISHI, T. y KAYA, K. (1971): *Jap. L. Dairy Sci.* **20**, A-1.
- NAYLOR, J. y SHARPE, M. E. (1958a): *J. Dairy Res.* **25**, 431.
- NAYLOR, J. y SHARPE, M. E. (1958b): *J. Dairy Res.* **25**, 92.
- NILSSON, R. y WILLART, S. (1961): *Milk and Dairy Res. Alnap., Suede Rept.* n.º 64.
- NIVEN, C. F. (1963): En «Microbiological Quality of Foods» (Slanetz, L. N., Chichester, C. O. Gaufin, A. R. y Ordal, Z. J.) Ed. Academic Press. New York.
- OHREN, J. A. y TUCKEY, S. L. (1969): *J. Dairy Sci.* **52**, 598.
- ORLA-JENSEN, S. (1943): «The Lactic Acid Bacteria». Copenhaguen: Einar Munksgaard.
- ORO, J. F., GUIDRY, C. L. y ZLATKIS, A. (1959): *Food Res.* **24**, 240.
- OSLER, A. G., BUCHBINDER, L. y STEFFEN, G. I. (1948): *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.* **67**, 456.
- OTERHOLM, A., ORDAL, Z. J. y WITTER, L. D. (1968): *Appl. Microbiol.* **16**, 524.
- PATTON, S. (1963): *J. Dairy Sci.* **46**, 866.
- PERRY, K. D. y SHARPE, M. E. (1960): *J. Dairy Res.* **27**, 267.
- PETERSON, W. H. y JOHNSON, M. J. (1949): *J. Bacteriol.* **58**, 701.
- PLATT, T. B. y FOSTER, E. M. (1958): *J. Bacteriol.* **75**, 453.
- RAADSWELD, C. W. (1953): 13th Intern. Dairy Congres. La Haya **2**, 676.
- RABIN, R. y ZIMMERMAN, L. N. (1956): *Can. J. Microbiol.* **2**, 746.
- RAPP, VON M. (1969): *Milchwissenschaft* **24**, 208.
- REITER, B., FRYER, T. F., PICKERING, A., CHAPMAN, H. R., LAVERENCE, R. C. y SHARPE, M. E. (1967): *J. Dairy Res.* **34**, 257.
- REITER, B., FRYER, T. F., SHARPE, M. E. y LAWRENCE, R. C. (1966): *J. appl. Bacteriol.* **29**, 231.
- REITER, B. y MOLLER-MADSEN, A. (1963): *J. Dairy Res.* **30**, 419.
- REITER, B. y SHARPE, M. E. (1971): *J. appl. Bacteriol.* **34**, 63.
- REITER, B., SOROKIN, Y., PICKERING, A. y HALL, A. J. (1969): *J. Dairy Res.* **36**, 65.
- RHODES, D. N. y LEA, C. H. (1958): *J. Dairy Res.* **25**, 60.
- ROBERTSON, P. S. y PERRY, K. D. (1961): *J. Dairy Res.* **28**, 245.
- ROCOSA, M., MITCHELL, J. A. y WISEMAN, R. F. (1951): *J. Bacteriol.* **62**, 132.
- ROCOSA, M. y SHARPE, M. E. (1959): *J. appl. Bacteriol.* **22**, 329.
- SAITO, K., FURUCHI, E., JONDO, S., KAWANISHI, G., NISIYAWA, I., NAKAZATO, H., NOGUCHI, Y., DOI, T., NOGUCHI, A. y SHINCO, S. (1965): *Dairy Sci. Abstr.* **27**, n.º 3263.
- SALA, F. J. (1973): Comunicación personal.
- SALA, F. J. (1972): *Anal. Bromatol.* XXIV-1, 51.
- SALA, F. J. (1972): *Anal. Bromatol.* XXIV, 61.
- SATO, Y. y NAKASHIMA, I. (1965): *Agr. Biol. Chem.* **29**, A-29.
- SATO, Y., UMEMOTO, Y. e IWAYAMA, S. (1967): *J. Agr. Chem. Soc. Jap.* **41**, 585.
- SCARPELLINO, R. y KOSIKOWSKI, F. V. (1961): *J. Dairy Sci.* **44**, 10.
- SCARPELLINO, R. y KOSIKOWSKI, F. V. (1962): *J. Dairy Sci.* **45**, 343.
- SCOTT, W. (1957): *Adv. Food. Res.* **7**, 83.
- SCHLENK, H. y GALLERMAN, J. L. (1960): *Anal. Chem.* **25**, 1650.
- SCHMIDT, J. L. y LENOIR, J. (1972): *Le Lait* n.º 518, 536.
- SCHORÜLLER, J. (1968): *Adv. Food. Res.* **16**, 231.
- SCHORMÜLLER, J. (1956): *Z. Lebens. Untersuch. u. Forsch.* **106**, 13.
- SCHORMÜLLER, J. y LNAGNER, H. (1960): *Z. Lebensm. Untersuch u. Forsch* **113**, 289.
- SHARPE, M. E. y MATTICK, A. T. R. (1960): *J. Dairy Res.* **27**, 277.
- SHATTOCK, P. M. F. (1949): 12th Int. Dairy Congres. Estocolmo **2**, 598.
- SHATTOCK, P. M. F. (1964): En «Chemical and Biological Hazards in Food» (Ayres, J. E., Kraft, A. A. Snyder, H. E. y Walker, H. W.) Iowa State University Press. Iowa. p. 303.
- SHAW, C., STITT, J. M. y COWMAN, S. T. (1951): *J. Gen. Microbiol.* **5**, 1010.
- SHAW, N. (1968): *Biochim. Biophys. Acta* **164**, 435.
- SHAW, N. y BADDILEY, J. (1968): *Nature*, **217**, 142.
- SHEATA, A. J., DE MAN, J. M. y ALEXANDER, J. C. (1970): *Can. Inst. Food. Technol. J.* **3**, 85.
- SHERMAN, J. M. (1937): *Bact. Rev.* **1**, 3.
- SHIPE, W. F. Jr., (1951): *Arch. Biochem.* **30**, 165.
- SILLIKER, J. H. y DEIBEL, R. H. (1960): *Bact. Proc.* **48**.
- SINGH, Ajaib; SINGH, Ajit; KUILAN R. K., DUTTA, S. M., BABBAR, I. J., SRINIVASAN, R. A. y DUDANNA A. T. (1967): *J. Dairy. Sci.* **50**, 1886.
- SJÖSTRÖM, G. y MALM, B. (1952): *Svenska Mejeritidn.* **44**, 81.
- SLANETZ, L. W. y BARTLEY, C. H. (1957): *J. Bacteriol.* **74**, 591.
- SMITH, J. G. M., HARDY, R. y DAVIE, K.: Torry Research Station Interin, Record. n.º 23.
- SMITH, L. M. y LOWRY, R. R. (1962): *J. Dairy. Sci.* **45**, 581.
- SOMKUTI, G. S., BABEL, F. J. (1969): *J. Dairy Sci.* **52**, 1186.
- SORHAUG, T. y SOLBERG, P. (1973): *Appl. Microbiol.* **25**, 388.
- STADHOUDERS, J., DE VRISS, E. y MULDER, H. (1959): 15th Intern. Dairy. Congr. Londres **2**, 709.
- STADHOUDERS, J. y MULDER, H. (1959): *Neth. Milk. Dairy J.* **13**, 291.
- STORCARDS, T. y LINDQUIST, B. (1953): 13th Intern. Dairy Congr. La Haya **2**, 607.
- SYRJANEN, H. (1965): *Karjantuote* **48**, 487.
- SZABA, G. y BALATONI, M. (1962): 16th Intern. Dairy Congr. Copenhague B, 835.
- TARASSUK, N. P. y FRANKEL, E. N. (1957): *J. Dairy. Sci.* **40**, 418.
- THATCHER, F. S. y CLARK, D. S. (1968): «Microorganisms in Food». Ed. University of Toronto Press. Canadá.
- TITTSLER, R. P., SANDERS, G. P., LOCHRY, H. R. y SAGER, O. S. (1948): *J. Dairy Sci.* **31**, 716.
- TOFT-EJESPERSEN, N. J. (1966): C. R. XVII Congr. Intern. Laiter. Munich, D. 465.
- TOURNEUR, C. (1972): *Le Lait*, n.º 513-514, 149.
- TREVELIAN, PROCTER y HARRISON, C. (1950): *Nature*, **166**, 444.
- UMEMOTO, Y. y SATO, Y. (1973): *Milchwissenschaft* **28**, (9) 550 VAN DER VEN, B. y JONGE, A. P. (1957): Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas **76**, n.º 2.
- VAN DER ZANT, W. C. y NELSON, F. E. (1953): *J. Dairy Sci.* **36**, 1104.
- VORBECK, M. L. y MARINETTI, G. V. (1965): *J. Lipid Res.* **6**, 3.
- WACHSMAN, J. T. (1956): *J. Biol. Chem.* **223**, 19.
- WALLACE, D. L. y HARMON, L. G. (1970): *J. Dairy Sci.* **53**, 394.
- WALKER, J. R. (1961): *J. Dairy Res.* **28**, 1.
- WHITEHEAD, H. R., HUNTER, G. J. E., RIDDET, W. y SAWYER, E. A. (1939): *Rept. Dept. Sci. Ind. Res.* New Zealand 1938-39: 18.
- WHITEHEAD, H. R., JONES, P. A. y ROBERTSON, P. S. (1958): *J. Dairy Res.* **25**, 24.
- WILCOX, J. C., NELSON, W. O. y WOOD, N. A. (1955): *J. Dairy Sci.* **38**, 775.
- WILSON, G. S. (1935): *Med. Res. Council. Special Reports Series*, n.º 206. London: H. M. S. O.
- WILLIAMSON, W. T. y SPECK, M. L. (1962): *J. Dairy Sci.* **45**, 164.
- WILLIAMSON, W. T., TOVE, S. B. y SPECK, M. L. (1962): *J. Bact. Proc.* **26**, 1962.
- WILLIAMSON, W. T., TOVE, S. B. y SPECK, M. L. (1964): *J. Bacteriol.* **87**, 49.
- WINKLER, S. (1954): *Milchwiss. Berichte, Wolfspassing*, **4**, 219.
- YAGUCHI, M., TARASSUK, N. P. y ABÉ N° 1964/7 Štaæe ð-í 47, 1167.
- YATES, A. R., IRVINE, O. R. y CUNNINGHAM, J. D. (1955): *Jan. J. Agr. Sci.* **35**, 337.