



**Universidad Nacional
Autónoma de México**

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**EVALUACION DE LA FABRICACION DE QUESO
TIPO OAXACA A PARTIR DE LECHE PASTEURIZADA
Y DE LECHE CRUDA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
CARLOS M. VERREY CASILLAS

ASESORES :

**QUIM. MA. LUISA BRECHU DE RIVERA
M. V. Z. RAUL VARGAS GARCIA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

R E S U M E N

EVALUACION DE LA FABRICACION DE QUESO TIPO OAXACA A PARTIR DE LECHE PASTEURIZADA Y DE LECHE CRUDA

Carlos M. Verrey Casillas

Asesores: Química María Luisa Brechú de Rivera
MVZ. Raúl Vargas García

Este trabajo se realizó con el objeto de resaltar la importancia y accesibilidad de transformar la leche en queso tipo Oaxaca como un medio de conservación en algunas regiones del país donde la leche se acidifica sin intervención de tecnología alguna.

Se mencionan algunos aspectos de la recepción y almacenamiento de la leche en la planta industrial, así como la descripción de las pruebas para determinar porcentaje de grasa, acidez, porcentaje de sólidos totales, densidad, presencia de neutralizantes, punto de congelación y prueba del alcohol, seleccionadas para evaluar en el laboratorio la leche destinada a quesería.

Se describen los procedimientos de elaboración industrial (leche pasteurizada) y rústico (leche cruda) con apego a los principios generales de la lactología incluyendo, entre otros, la depuración de la leche, estandarización, pasteurización, preparación de fermentos lácticos, acondicionamiento y coagulación de la leche, corte y desuerado de la cuajada, así como las operaciones de manipulación y tratamiento de la cuajada que llevan a la obtención de queso Oaxaca. La descripción del procedimiento rústico se apoya en la descripción industrial de los puntos afines a la tecnología, omitiendo o agregando los aspectos necesarios.

Se realizaron cinco pruebas para cada procedimiento empleando aproximadamente 400 litros de leche en cada prueba.

Se presentan los resultados de la evaluación de la leche de cada prueba y del acondicionamiento y coagulación, así como de la manipulación y tratamiento de la cuajada relacionándose con las condiciones generales de trabajo y las particularidades tecnológicas de cada procedimiento, lo que llevó a sugerir que se realicen modificaciones en los procedimientos de elaboración para incrementar el rendimiento.

Se presenta la descripción de cada una de las pruebas efectuadas para el Control de Calidad del producto terminado, así como los resultados obtenidos del análisis de las muestras de ambos procedimientos y se sugiere un Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana para "Queso Oaxaca", como primer paso en la reglamentación de este producto, proponiéndose para las especificaciones fisicoquímicas, los valores de 23% de grasa, mínimo 24% de proteínas, máximo 48% de humedad, mínimo 52% de sólidos totales, mínimo 5% de cenizas, pH de 5 y fosfatasa negativa; en las especificaciones microbiológicas, las cifras de máximo 5,000 col/g en la cuenta de coliformes, menos de 10 col/g en la cuenta de coliformes fecales, negativo en 20 g para investigación de salmonela, máximo 1,000 col/g en cuenta de estafilococo áureo, coagulasa positiva y máximo 20 col/g en el conteo de hongos y levaduras.

EVALUACION DE LA FABRICACION DE QUESO
TIPO OAXACA A PARTIR DE LECHE
PASTEURIZADA Y DE LECHE CRUDA

CONTENIDO GENERAL

	Página
INTRODUCCION.....	1
I. Recepción y Almacenamiento de la Leche.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	21
II. Evaluación de la Leche que se va a Transformar.....	23
III. Procedimientos de Elaboración..	141
IV. Control de Calidad.....	325
RESULTADOS.....	389
ANALISIS Y DISCUSION.....	399
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	417
BIBLIOGRAFIA.....	429

CONTENIDO

INTRODUCCION

I. Recepción y Almacenamiento de la Leche

- 1.1 Recepción en cántaros o bidones
- 1.2 Recepción en cisternas
- 1.3 Aptitud de la leche para permitir el desarrollo microbiano
 - 1.3.1 Substancias antibacterianas en la leche cruda
 - 1.3.2 Substancias que favorecen el desarrollo microbiano en la leche cruda
- 1.4 Almacenamiento previo
- 1.5 Temperatura y bacterias en la leche
- 1.6 Consideraciones sobre la refrigeración de la leche
 - 1.6.1 Comportamiento de los constituyentes de la leche refrigerada
 - 1.6.2 Principales gérmenes psicrótrofos en la leche
 - 1.6.3 Crecimiento de bacterias psicrótrofas en la leche cruda
 - 1.6.4 Actividad bioquímica de las bacterias psicrótrofas

MATERIAL Y METODOS

II. Evaluación de la Leche que se va a Transformar

- 2.1 Consideraciones previas
 - 2.1.1 Microorganismos en la leche
 - 2.1.2 Microorganismos patógenos en la leche
 - 2.1.3 Alteraciones de la leche provocadas por microorganismos
 - 2.1.4 Mastitis
- 2.2 Evaluación de la leche
 - 2.2.1 Temperatura
 - 2.2.2 Toma de muestras
 - 2.2.2.1 Material
 - 2.2.2.2 Procedimiento

- 2.2.3 **Apreciación sensorial**
 - 2.2.3.1 **Color, olor, sabor**
 - 2.2.3.2 **Textura**
- 2.2.4 **Composición de la leche**
- 2.2.5 **Calidad de la leche de recepción**
- 2.3 **Materia grasa**
 - 2.3.1 **Fracción saponificable e insaponificable de la grasa**
 - A. **Fracción saponificable**
 - 2.3.1.1 **Lípidos**
 - 2.3.1.2 **Lípidos simples**
 - 2.3.1.2.1 **Estructura**
 - 2.3.1.2.2 **Acidos grasos esenciales**
 - 2.3.1.3 **Lípidos complejos**
 - 2.3.1.3.1 **Glicerofosfolípidos**
 - 2.3.1.3.2 **Aglicerofosfolípidos**
 - 2.3.1.4 **Esteroles**
 - 2.3.1.5 **Tocoferoles**
 - 2.3.1.6 **Carotenoides**
 - 2.3.1.7 **Vitaminas liposolubles**
 - 2.3.1.8 **Escualeno**
 - 2.3.2 **Glóbulos de grasa**
 - 2.3.2.1 **Interior de los glóbulos grasos**
 - 2.3.2.2 **Membrana envolvente**
 - 2.3.3 **Hidrólisis de los lípidos**
 - 2.3.4 **Contenido graso y pago de la leche**
 - 2.3.5 **Determinación de la materia grasa. Método de Gerber**
 - 2.3.5.1 **Fundamento**
 - 2.3.5.2 **Aparatos y equipo**
 - 2.3.5.3 **Materiales y reactivos**
 - 2.3.5.4 **Procedimiento**
 - 2.4 **Densidad o peso específico**
 - 2.4.1 **Aparatos y equipo**
 - 2.4.2 **Materiales**
 - 2.4.3 **Procedimiento**
 - 2.4.4 **Cálculos y resultados**
 - 2.5 **Sólidos totales**
 - 2.6 **Prueba de neutralizantes**
 - 2.6.1 **Materiales y reactivos**
 - 2.6.2 **Procedimiento**

- 2.7 Punto de congelación
 - 2.7.1 Aparatos y equipo
 - 2.7.2 Reactivos
 - 2.7.3 Procedimiento
- 2.8 Acidez
 - 2.8.1 Lactosa
 - 2.8.1.1 Estructura química
 - 2.8.2 Fermentación microbiana
 - 2.8.2.1 Sistemas de transporte
 - 2.8.2.2 Vía Embden-Mejerhof (Glucólisis)
 - 2.8.2.3 Principales fermentaciones
 - 2.8.3 Bacterias lácticas
 - 2.8.3.1 Familia Streptococcaceae
 - 2.8.3.1.1 Género Streptococcus
 - 2.8.3.1.2 Género Leuconostoc
 - 2.8.3.2 Familia Lactobacillaceae
 - Género Lactobacillus
 - 2.8.4 Acidez titulable
 - 2.8.4.1 Medición de la acidez
 - 2.8.4.1.1 Análisis volumétrico
 - 2.8.4.1.1.1 Soluciones valoradas
 - 2.8.4.2 Sistemas de expresión
 - 2.8.4.2.1 Gramos de ácido láctico
 - 2.8.4.2.2 Grados Dornic
 - 2.8.4.2.3 Grados Soxhlet-Henckel
 - 2.8.4.2.4 Equivalente de los sistemas de expresión
 - 2.8.5 Técnica de titulación
 - 2.8.5.1 Aparatos y equipo
 - 2.8.5.2 Materiales y reactivos
 - 2.8.5.3 Procedimiento
 - 2.8.5.4 Cálculos y resultados
 - 2.8.5.5 Causas de error
 - 2.8.6 Variaciones de la acidez
- 2.9 Prueba del alcohol
 - 2.9.1 Materiales y reactivos
 - 2.9.2 Procedimiento
 - 2.9.3 Preparación de alcoholes

III. Procedimientos de Elaboración

3.1 Procedimiento industrial

3.1.1 Depuración de la leche

3.1.2 Estandarización de la leche

3.1.2.1 Descremadoras o desnatadoras

3.1.2.2 Estandarizadora

3.1.2.3 Factores que afectan el porcentaje de grasa en la crema

3.1.2.4 Grasa en el queso

3.1.2.5 Cuadrado de Pearson

3.1.2.6 Método de substitución

3.1.2.7 Sistema de ecuaciones simultáneas

3.1.2.8 Anexo. Determinación de Sólidos Totales. Determinación de Humedad. Determinación de Grasa en Leche Descremada, Agua, Suero y Crema

3.1.3 Reducción del contenido microbiano de la leche. Pasteurización

3.1.3.1 Fundamentos teóricos del calentamiento de la leche

3.1.3.1.1 Temperatura y duración del calentamiento

3.1.3.1.2 Tipo y número inicial de gérmenes

3.1.3.1.3 Acidez de la leche

3.1.3.1.4 Movimiento de la leche y velocidad de la transmisión de calor de los aparatos

3.1.3.2 Pasteurización en quesería

3.1.3.3 Control de la pasteurización

3.1.4 Leche de quesería

3.1.5 Adición de cloruro de calcio

3.1.6 Adición de colorante

3.1.7 Adición de fermentos lácticos

3.1.7.1 Crecimiento bacteriano

3.1.7.1.1 Factores de crecimiento

3.1.7.1.2 Curva de crecimiento

3.1.7.2 Preparación de los fermentos

3.1.7.2.1 Consideraciones previas

3.1.7.2.2 Bacterias productoras de Acido láctico

3.1.7.2.3 Selección y adquisición del cultivo conveniente

- 3.1.7.2.4 Lugar de trabajo
- 3.1.7.2.5 Fermento madre
 - 3.1.7.2.5.1 Selección de la leche
 - 3.1.7.2.5.2 Tratamiento térmico de la leche
 - 3.1.7.2.5.3 Inoculación e incubación de la leche
- 3.1.7.2.6 Fermento industrial
- 3.1.7.3 Inhibición de los cultivos lácticos
 - 3.1.7.3.1 Técnica defectuosa
 - 3.1.7.3.2 Causas intrínsecas
 - 3.1.7.3.3 Cepas de bacterias lácticas que producen sustancias inhibidoras
 - 3.1.7.3.4 Presencia de antibióticos y antisépticos
 - 3.1.7.3.5 Bacteriófagos
- 3.1.7.4 Procedimientos de control y evaluación
- 3.1.7.5 Adición de fermentos lácticos a la leche de quesería
- 3.1.8 Proteínas y coagulación de la leche
 - 3.1.8.1 Proteínas
 - 3.1.8.2 Dispersión coloidal y micelas
 - 3.1.8.3 Materias nitrogenadas en la leche. Caseína
 - 3.1.8.3.1 Composición y estructura de las caseínas
 - 3.1.8.3.2 Síntesis de proteínas. Resumen
 - 3.1.8.4 Estructura de las micelas de la leche
 - 3.1.8.5 Coagulación
 - 3.1.8.5.1 Consideraciones previas. Propiedades de las caseínas
 - 3.1.8.5.2 Aspectos tecnológicos
 - 3.1.8.5.2.1 Coagulación láctica
 - 3.1.8.5.2.1.1 Factores de la coagulación láctica
 - 3.1.8.5.2.1.2 Características del gel láctico
 - 3.1.8.5.2.2 Coagulación por acción del cuajo
 - 3.1.8.5.2.2.1 Cuajo
 - 3.1.8.5.2.2.2 Factores que influyen en la coagulación de

la leche por el
cuajo

3.1.8.5.2.2.3 Características
de las cuajadas
enzimáticas

3.1.8.5.2.3 Coagulación mixta

3.1.8.5.2.4 Coagulación de la le
che de quesería

3.1.8.5.2.5 Funciones y ventajas
de la producción de
ácido láctico

3.1.9 Tratamiento y manipulación de la cuajada

3.1.9.1 Desuerado

3.1.9.1.1 Factores que influyen en el de-
suerado y en los procesos micro-
biológicos que se desarrollan en
la cuajada

3.1.9.1.1.1 Corte de la cuajada

3.1.9.1.1.2 Agitación

3.1.9.1.1.3 Intervención de la
temperatura

3.1.9.1.1.4 Intervención de la
acidificación

3.1.9.1.2 Comportamiento y función de los
constituyentes mayores de la ma-
teria seca del coágulo en el cur-
so del desuerado

3.1.9.1.3 Características y composición
del suero

3.1.9.1.3.1 Proteínas del suero

3.1.9.2 Malaxado

3.1.9.3 Enfriado

3.1.9.4 Pesado

3.1.9.5 Salado

3.1.9.6 Trenzado

3.1.9.7 Envasado

3.1.9.8 Refrigeración

3.1.9.9 Anexo (pH)

3.2 Procedimiento rústico

3.2.1 Introducción

3.2.2 Aparatos y equipo

3.2.3 Materiales y reactivos para la determinación de
acidez

3.2.4 Aditivos

3.2.5 Otros

3.2.6 Procedimiento

- 3.2.6.1 Depuración de la leche
- 3.2.6.2 Estandarización de la leche
- 3.2.6.3 Maduración de la leche
- 3.2.6.4 Coagulación de la leche
- 3.2.6.5 Tratamiento y manipulación de la cuajada

IV. Control de Calidad

4.1 Especificaciones físicas y químicas

- 4.1.1 Determinación de humedad
 - 4.1.1.1 Introducción
 - 4.1.1.2 Aparatos y equipo
 - 4.1.1.3 Procedimiento
 - 4.1.1.4 Cálculos
- 4.1.2 Determinación de sólidos totales
 - 4.1.2.1 Aparatos y equipo
 - 4.1.2.2 Procedimiento
 - 4.1.2.3 Cálculos y resultados
- 4.1.3 Determinación de cenizas
 - 4.1.3.1 Introducción
 - 4.1.3.2 Aparatos y equipo
 - 4.1.3.3 Procedimiento
 - 4.1.3.4 Cálculos
- 4.1.4 Determinación de proteínas
 - 4.1.4.1 Introducción
 - 4.1.4.2 Aparatos y equipo
 - 4.1.4.3 Materiales y reactivos
 - 4.1.4.4 Procedimiento
 - 4.1.4.5 Cálculos y resultados
- 4.1.5 Determinación de grasa
 - 4.1.5.1 Introducción
 - 4.1.5.2 Aparatos y equipo
 - 4.1.5.3 Materiales y reactivos
 - 4.1.5.4 Procedimiento
 - 4.1.5.5 Cálculos y resultados
- 4.1.6 Determinación de pH
 - 4.1.6.1 Aparatos y equipo
 - 4.1.6.2 Materiales y reactivos
 - 4.1.6.3 Procedimiento
- 4.1.7 Determinación de fosfatasa
 - 4.1.7.1 Introducción
 - 4.1.7.2 Prueba cualitativa

- B. Procedimientos de elaboración
- C. Control de calidad

ANALISIS Y DISCUSION

- A. Evaluación de la leche
- B. Procedimientos de elaboración
- C. Control de calidad
- D. Rendimiento quesero de los distintos componentes de la leche
- E. El queso como alimento

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 4.1.7.2.1 Aparatos y equipo
- 4.1.7.2.2 Materiales y reactivos
- 4.1.7.2.3 Procedimiento
- 4.1.7.2.4 Resultado

4.2 Especificaciones microbiológicas

4.2.1 Cuenta de organismos coliformes

- 4.2.1.1 Introducción
- 4.2.1.2 Aparatos y equipo
- 4.2.1.3 Materiales, reactivos y medio de cultivo
- 4.2.1.4 Procedimiento

4.2.2 Cuenta de organismos coliformes fecales

- 4.2.2.1 Introducción
- 4.2.2.2 Aparatos y equipo
- 4.2.2.3 Materiales y reactivos
- 4.2.2.4 Medios de cultivo
- 4.2.2.5 Procedimiento
- 4.2.2.6 Cálculos y resultados

4.2.3 Investigación de Salmonella

- 4.2.3.1 Introducción
- 4.2.3.2 Aparatos y equipo
- 4.2.3.3 Materiales y reactivos
- 4.2.3.4 Medios de cultivo
- 4.2.3.5 Procedimiento

4.2.4 Determinación de cuenta de estafilococo áureo coagulasa positiva. Método de Baird-Parker

- 4.2.4.1 Introducción
- 4.2.4.2 Aparatos y equipo
- 4.2.4.3 Materiales, reactivos, soluciones
- 4.2.4.4 Medios de cultivo
- 4.2.4.5 Procedimiento
- 4.2.4.6 Cálculos y resultados

4.2.5 Conteo de hongos y levaduras

- 4.2.5.1 Introducción
- 4.2.5.2 Aparatos y equipo
- 4.2.5.3 Medio de cultivo
- 4.2.5.4 Materiales y reactivos
- 4.2.5.5 Procedimiento
- 4.2.5.6 Cálculos y resultados

RESULTADOS

A. Evaluación de la leche

INTRODUCCION

El Instituto Nacional de la Leche, cita que en 1979, la producción nacional fue del orden de 6,913'771,000 litros, de los cuales 96.07% correspondieron a leche de vaca. (49)

El destino del volumen producido, tuvo su distribución en el rubro de industrialización, en un 30.89%. De ello, el 11.19 y el 19.70%, fue canalizada a leches industrializadas y productos derivados, respectivamente; a pasteurización el 23.11% y es de señalarse que como leche bronca, se manejó un 46% del total. (49)

El consumo de leche bronca obedece a múltiples causas cuya complejidad impide hacer generalizaciones a nivel nacional y en el nivel regional frecuentemente escapan muchos factores al análisis. Debe considerarse en general la convergencia de causas económicas y culturales que muchas veces son contradictorias, o bien, simplemente van cambiando con el tiempo.

Algunas de las opiniones actuales más sobresalientes explican que el consumo elevado de leche bronca se debe al número insuficiente de plantas pasteurizadoras en el país. Según otras opiniones, aunque el número de plantas es elevado, la gran mayoría no reúne las características técnicas necesarias para pasteurizar el producto con eficiencia. (27) En 1979, el número de plantas pasteurizadoras en el país era de 131, de las cuales 16 pasteurizaban entre 150,001 y 775,000 litros al día, 44 de ellas, más de 50,001 litros y el resto cantidades menores. (49)

México cuenta con muchas regiones que presentan temporadas de clima caluroso (altamente propicio al desarrollo microbiano), en las cuales no siempre hay oportunidad de enfriar la leche inmediatamente después del ordeño. La dispersión geográfica de los núcleos productores explica en parte esa imposibilidad. La recogida de la leche se encarece y dificulta por la falta de infraestructura y recursos económicos para transportarla.

Otro factor contribuyente es una reglamentación y normalización inadecuadas. A este respecto se reporta (20) que los precios que actualmente se pagan por la leche pasteurizada al productor en algunos estados de la República, Oaxaca, por ejemplo, comparados con el precio de la leche bronca al productor, son mucho menores:

"La leche bronca se paga mucho mejor que la leche pasteurizada, con las consecuencias obvias que a esto sigue: primero, para la leche pasteurizada, por razón natural, sabemos que hay altos costos en producción por el tipo de ganado que la genera y además por todo el proceso al que se tiene que someter: el control de precio y el control sanitario que se exige, por lo tanto, los márgenes de utilidad de este producto están siendo mínimos y en ocasiones totalmente inexistentes. Por lo que respecta a la leche bronca no hay control sanitario, hay un precio que por lo tanto es libre y desde luego, va a generar muchos mayores dividendos tanto al productor como al introductor".

Si la leche pasteurizada es la más barata, señala el Director del Instituto Nacional de la Leche, es la que más se debe consumir, sin embargo, cita que en el estado de Oaxaca, solamente el 3.5% del total de leche que se consume es pasteurizada y el 96% es bronca y se consume a un precio mucho más elevado. Más adelante agrega: "La leche pasteurizada está dejando de existir por una razón perfectamente natural: no es redituable producir leche pasteurizada".

Todo consumo de leche o de productos lácteos por las poblaciones autóctonas de las regiones tropicales menos desarrolladas cultural y económicamente, depende de las costumbres alimenticias tradicionales. Estos hábitos son el resultado de una experiencia multicentenario que llevó a un perfecto ajuste la naturaleza biológica de la leche y las condiciones del clima. (90)

El consumo de leche bronca se acentúa en las regiones tropicales, cuyas características climatológicas hacen que la producción y conservación de la leche requieran mayores cuidados y demanden una efectiva participación tecnológica.

"Las propiedades de resistencia de la leche a la acidificación, tienen un valor muy relativo, ya que no son tan manifiestas para poder poner las leches tropicales al abrigo de las nefastas consecuencias ejercidas por el elevado número de

causas que actúan desfavorablemente sobre la vida comercial de la leche, creando en su conjunto, uno de los mayores problemas con que la lechería tropical se ha de enfrentar al tener en cuenta su desarrollo". (90)

El 46% de la leche producida actualmente no se consume bajo vigilancia sanitaria y sabemos que una gran parte no se aprovecha óptimamente. Las necesidades de leche aumentarán a la par que la población (en 1977 el déficit nacional de leche se consideró de 5,346'700 000 litros, teniendo en cuenta una población de 64.6 millones de habitantes; 27). Se espera que la producción de leche se incremente, pero desgraciadamente, también se calcula un aumento de la importación de leche en polvo. (27) Con relación a la leche bronca, las estadísticas revelan que en 1976 un 23.4% de la leche se pasteurizaba, 44% se consumía como leche bronca, y un 31% se iba a la industria. En 1980 se esperaba que sólo el 22.6% se pasteurizara y bastante más se canalizara como leche bronca, y para 1982, si sigue esta tendencia, la cantidad de leche pasteurizada se verá disminuida al 19.9%, la leche a la industria crecerá un poco, pero la que más crecerá definitivamente, será la leche que se venda como leche bronca. (20)

El traslado de la leche en penosas y lentas condiciones conduciría a su acidificación por la acción de los gérmenes lácticos y cuando su pH es inferior a 6 no se puede pasteurizar porque el calor del tratamiento precipita la caseína y ocasiona trastornos en los pasteurizadores; (12) el pH de 6 equivale aproximadamente entre 24-27°D. Las plantas pasteurizadoras no reciben la leche a partir de que ésta alcanza 18°D de acidez titulable. La leche bronca termina por consumirse en los lugares de producción.

Cuando se desea transformar la leche en las regiones tropicales, lo más común son las leches fermentadas o ácidas, las leches cuajadas y otros productos; pero también es factible, cuando una leche se ha acidificado (natural o artificialmente), elaborar varios tipos de queso, entre los cuales tenemos principalmente al Mozzarella, Provolone (en sus diversas formas y dimensiones identificadas por un nombre más o menos distinto), Caciocavallo, Scamorze en Italia, y en México, uno muy común y de gran aceptación es el llamado queso Oaxaca, Asadero o Quesillo que se fabrica en gran parte del territorio nacional (que requiere muy poca tecnología y mano de obra y permite la utilización de leches ácidas), logrando así alargar el período de conservación de la leche y confiriéndole agradables características de sabor.

El queso, como tal, representa uno de los alimentos

más variados y gustados a lo largo de la historia; desde su origen, reconocidos su valor nutritivo y sus propiedades de conservación, los distintos países productores realizan esfuerzos para mejorar la calidad y el sabor de sus productos a través de reglamentos y normas que aseguren también su control sanitario y la estandarización de las técnicas de elaboración.

Si consideramos la calidad de la proteína láctea (contenido en aminoácidos esenciales), así como el elevado porcentaje en que se presenta en el queso, junto con otros constituyentes tales como grasa, sales minerales, vitaminas, etc., es aún en la actualidad un producto barato y accesible que cumple en gran parte los requerimientos de una alimentación sana y completa.

La mayoría de los productores no someten su leche (acidificada o no) a las condiciones de las plantas pasteurizadoras, optando definitivamente por mayores beneficios económicos con la venta de la leche bronca. Sin embargo, al transformar dicha leche en queso y una vez establecidos un mercado y una demanda, las inversiones iniciales se justifican y las ganancias serán mucho mayores.

Uno de los principales objetivos de la Medicina Veterinaria es el de la producción de alimentos aptos para el consumo humano. La producción de leche en calidad y cantidad, debe ocupar un lugar privilegiado dadas sus magníficas características. Sin embargo, no basta producir leche, ésta debe seguir la llamada cadena de refrigeración a todo lo largo de su existencia; desde su obtención a partir de la ubre bovina, hasta su exposición a la venta y aún dentro del hogar.

La pasteurización, tiene lugar en un punto de la cadena de frío. A partir de ahí, se decide si la leche se consumirá fluida, se someterá a algún proceso industrial o se transformará en algún producto lácteo. Pero siempre que así se requiera deberá continuar bajo vigilancia sanitaria hasta llegar al consumidor. Cuando falta este control, todo el tiempo, conocimientos, esfuerzos, etc. que implicaron su producción y/o la elaboración de productos, tanto por el aspecto económico como por el social, quedan al final nulificados.

La profesión veterinaria objetará siempre el consumo de leche bronca en conocimiento de las posibles consecuencias que acarrea (tales como enfermedades e intoxicaciones); contribuirá a la formulación de normas y reglamentos que prohíban dicho consumo; difundirá los conocimientos que adviertan el peligro e instruyan sobre su consumo, etc.; pero mientras

el desarrollo social no alcance, cultural, económica y tecnológica a todas las regiones necesitadas del país, la profesión presentará alternativas frente a circunstancias por demás reales.

El presente trabajo tiene como objetivo primordial, resaltar la importancia y accesibilidad de transformar la leche en queso como un medio de conservación y en especial para aquella que se acidifica inevitablemente en algunas regiones del país sin intervención de tecnología alguna. Por ello, se escogió el queso tipo Oaxaca y los procedimientos de fabricación se dividieron en Industrial (con leche pasteurizada) y Rústico (con leche cruda), apoyándose deliberadamente este último en la descripción industrial, por considerarse que de este modo no sólo se refuerza el acercamiento entre los dos procedimientos, sino que la consulta obligada de algunos incisos correspondientes, hace que la comprensión del proceso se amplíe y enriquezca.

El marco teórico que continuamente se cita como referencia no es más que una guía que pretende comunicar el vasto trasfondo que existe al fabricar queso. Naturalmente, las características definidas para el queso tipo Oaxaca (queso fresco) dejan fuera la posibilidad de mencionar otros aspectos de la tecnología quesera, tales como las interacciones de tipo bioquímico que tienen lugar en otros quesos durante su maduración o afinado.

Las precisiones elementales o la excesiva descripción a que se recurre en algunas ocasiones, encuentran su justificación, primero, por ser este un trabajo dirigido a cualquier persona interesada y con un mínimo de la preparación requerida; y segundo, porque los factores que se dan cita en la producción de queso son tan numerosos, que únicamente la mejor comprensión de cada uno permitirá abarcar el conjunto de ellos y sus interrelaciones.

Se procuró incluir otros aspectos que proporcionarán un sentido de continuidad al trabajo; tal es el caso de la "Recepción y Almacenamiento de la Leche", en donde, aunque muy brevemente se mencionan algunos aspectos teórico-prácticos que contribuyen a conservar la calidad inicial de la leche que se recibe.

La evaluación de la leche, previa a su transformación, incluye la apreciación organoléptica y una idea general sobre su composición y su variabilidad; la evaluación de la leche se realiza desde el punto de vista de quesería y pensando en las mínimas condiciones de trabajo, por lo que únicamente se seleccionaron algunas pruebas de interés y con

carácter práctico para el análisis físico-químico de la leche.

En el "Control de Calidad" se incluyen algunos conceptos de apreciación y algunas especificaciones físico-químicas y microbiológicas que pueden practicarse en el producto terminado. Naturalmente, todo esto es sujeto de discusión posterior en el capítulo correspondiente.

Los Resultados, el Análisis y Discusión, así como las Conclusiones y Sugerencias, forman parte del conjunto esquemático en que se presenta el trabajo y esperamos que al igual que los puntos anteriores, integren un panorama general que, aunque muy modesto, resulte de utilidad para quien lo consulte.

I. RECEPCION Y ALMACENAMIENTO DE LA LECHE

Contenido

- 1.1 Recepción en cántaros o bidones
- 1.2 Recepción en cisternas
- 1.3 Aptitud de la leche para permitir el desarrollo microbiano
 - 1.3.1 Sustancias antibacterianas en la leche cruda
 - 1.3.2 Sustancias que favorecen el desarrollo microbiano en la leche cruda
- 1.4 Almacenamiento previo
- 1.5 Temperatura y bacterias en la leche
- 1.6 Consideraciones sobre la refrigeración de la leche
 - 1.6.1 Comportamiento de los constituyentes de la leche refrigerada
 - 1.6.2 Principales gérmenes psicrótrofos en la leche
 - 1.6.3 Crecimiento de bacterias psicrótrofas en la leche cruda
 - 1.6.4 Actividad bioquímica de las bacterias psicrótrofas

El lugar que la planta de lácteos destina a la recepción de la leche, comunmente llamado "plataforma de recepción" (89), constituye la prolongación de la recolección de la leche, por ello, su organización racional regula el trabajo en todos los departamentos y secciones de la fábrica; se le considera uno de los centros vitales de la empresa.

La recepción de la leche puede ser centralizada, si ésta se recibe en la planta directamente de las explotaciones agrícolas, o bien, recepción descentralizada, cuando la central dispone de establecimientos receptores delegados, en donde los distintos productores entregan su leche sin tener que cubrir la distancia completa hasta la planta.

En nuestro medio, la recepción se verifica preferentemente en el centro industrial y generalmente se trata de recepción en cántaros o bidones y recepción en camiones cisterna. Es necesario que los productores observen estrictamente las normas de higiene y las horas de recepción de leche en la fábrica o en sus explotaciones, para evitar el retraso de las operaciones y la acidificación de la leche. En la recepción deberá contarse con libros en los que se anotan el lugar de origen de la leche, número de litros o kilogramos y demás datos pertinentes o convenidos con el productor (porcentaje de grasa, acidez, temperatura, etc.).

Una sección de recepción bien organizada reviste importancia económica en cuanto a ahorro de tiempo, rendimiento de máquinas y aparatos y economía de energía. (78)

1.1 RECEPCION EN CANTAROS O BIDONES

Los bidones, que generalmente son de volumen y material variables, llegan a la planta industrial en vehículos de transporte que se aproximan a la plataforma de recepción (si éste existe) para su descarga.

La recogida mediante bidones presenta la ventaja de permitir la individualización de los suministros hasta la recepción. (1)

Los envases se vacían a mano en los tanques de almacenamiento o en los recipientes de las básculas de donde se toman las muestras para el control de laboratorio (ver II. Evaluación de la Leche).

Los bidones vacíos se conducen al lugar destinado para su sanitización (lavado y desinfección) que se realiza manual o automáticamente, dependiendo de las instalaciones. Es preferible que la planta tenga sus propios bidones.

Es común que una vez limpios y escurridos los cántaros se dispongan para el transporte del suero de quesería. Sin embargo, el retorno de subproductos a la granja en los mismos bidones destinados a la leche, es una práctica peligrosa. (1) El suero de quesería está siempre muy contaminado por lo que deberán disponerse bidones destinados exclusivamente para el suero y marcados de algún modo para distinguirlos de los que solamente contendrán leche.

El transporte en bidones metálicos tiene varios inconvenientes, entre ellos: el peso elevado de los recipientes, la capacidad del vehículo se reduce, el mantenimiento de un gran número de bidones ocupa mucho tiempo, personal, etc. cuando no se cuenta con máquina lavadora, etc. Cuando los bidones son de plástico también presentan algunas desventajas: dificultan el enfriamiento de la leche contenida en ellos, su ligereza no es compatible con el buen funcionamiento del material automático de lavado, las frecuentes rajaduras interiores albergan flora contaminante muy difícil de erradicar, etc.

1.2 RECEPCION EN CISTERNAS

Cuando el camión cisterna llega a la planta, las muestras de leche para el análisis deben tomarse de la cisterna llena. La leche pasa después por medio de bombas o por diferencia de nivel al equipo de medición para determinar el peso, y después al depósito de almacenamiento previo. (78)

Entre las ventajas que ofrece el transporte de leche en camiones cisterna podemos mencionar la economía en la mano de obra, equipo y otros servicios, evitando la necesidad de suministrar, mantener y reemplazar bidones, así como la limpieza e higienización de los mismos; la leche está menos

expuesta a la contaminación, hay menos pérdidas en el transporte, etc.

La cisterna, al igual que los cántaros, deberá lavarse y desinfectarse en forma correcta para poder disponer de ella nuevamente.

Es oportuno hacer hincapié en que según una fórmula frecuentemente citada, "las fábricas deben ser primero, empresas de transporte". (89) Es indudable que si el transporte se realiza bajo la responsabilidad de la fábrica por personal competente habrá mayor interés en conservar la calidad higiénica inicial de la leche.

Otra forma de recepción, aún poco usual en México, es por medio de tuberías desde la granja a la fábrica.

1.3 APTITUD DE LA LECHE PARA PERMITIR EL DESARROLLO MICROBIANO

Tras el ordeño, la leche forma en los recipientes una masa tibia cuya temperatura se acerca a los 33°C y que se enfría muy lentamente al aire, aunque el ambiente sea fresco. La leche del ordeño de la tarde puede de esta forma permanecer 10 a 12 horas a una temperatura que decrece poco a poco de 33° a unos 20°C; es decir, en condiciones muy favorables para la multiplicación de numerosas especies bacterianas mesófilas. Esta multiplicación se produce a una velocidad variable según las leches. (1)

La microflora que contamina la leche después del ordeño, no suele desarrollarse sino al cabo de un determinado tiempo de conservación de la leche a la temperatura ambiente, esta fase (de adaptación bacteriana) tiene una duración muy variable. Durante las dos o tres horas que siguen al ordeño, la leche cruda parece estar a salvo de un desarrollo masivo de bacterias; (89) además de la especie bacteriana contaminante y la temperatura ambiente adecuada para el desarrollo microbiano, intervienen sustancias antibacterianas y sustancias activadoras del crecimiento, de la leche, cuyo contenido no es constante. Todo esto, aunado a las relaciones favorables o inhibitorias entre las distintas bacterias y el medio de cultivo, determinan la aptitud de la leche para permitir el desarrollo microbiano en un momento determinado.

El estudio de esta aptitud tiene importancia desde

los puntos de vista higiénico (desarrollo de microorganismos patógenos), tecnológico (calidad de conservación de la leche y su empleo en la preparación de fermentos) y en cuanto a los tratamientos a que puede someterse (modificación de las propiedades biológicas).

1.3.1 Substancias Antibacterianas de la Leche Cruda

a) Inhibición específica. La glándula mamaria es una glándula endotelial exócrina capaz de producir anticuerpos locales contra virus y bacterias. (46)

La actividad antibacteriana de la leche fresca debe ser considerada como la consecuencia del paso a la leche de anticuerpos aparecidos en la sangre seguido de la inmunización natural por microorganismos que tienen una constitución antigénica vecina a la de los gérmenes sensibles. Estos microorganismos inmunizantes pertenecen probablemente a la flora intestinal de la vaca. De este modo, se sabe que el Streptococcus bovis posee un antígeno común con el S. cremoris. (89)

El estímulo para la producción de anticuerpos en la glándula mamaria no se deriva exclusivamente de los antígenos intestinales. Cuando se infectan oralmente becerros recién nacidos con Salmonella pullorum, en la leche de la vaca aparecen los anticuerpos, mismos que previamente no fueron detectados en el calostro o en el suero sanguíneo. Esto sugiere fuertemente que con el acto de mamar se infecta la glándula y responde produciendo anticuerpos específicos. (46) Algo similar sucede cuando la glándula se infecta a través de una máquina ordeñadora.

Las aglutininas. Son anticuerpos susceptibles de aglutinar a las bacterias sensibles de una manera específica; son activas sobre un gran número de estreptococos lácticos y lactobacilos. La sustancia descrita como lactenina 1-3 pertenece a este grupo; se muestra activa contra Streptococcus cremoris cepa 760. (1) No se destruye por la pasteurización clásica. (89) Su concentración varía poco en las diferentes leches y en el curso de la lactación. (1)

Las aglutininas inmovilizan las bacterias sensibles, formando masas agrupadas que son arrastradas a la superficie con los glóbulos grasos (formación de la nata), o bien, se depositan en el fondo de los recipientes, en la leche desnatada; el resultado es una verdadera inhibición de estas bacterias por separación física. (1)

La leche contiene aglutininas específicas de diversas especies bacterianas: lácticas (Streptococcus, Lactobacillus) y enterobacterias (Escherichia coli, etc.). Estas aglutininas son mucho más abundantes en el calostro que en la leche.

b) Lactenina L-1. Substancia inhibidora, aparentemente específica contra Streptococcus pyogenes (1, 89) y de naturaleza desconocida. El pH de su estabilidad máxima se encuentra próximo a 6.5; se destruye por calentamiento a 70°C durante 20 minutos. (1, 89) Se encuentra presente en el calostro en concentración elevada.

c) Inmunidad celular. La cuenta de células somáticas de la leche bovina se usa comunmente para determinar el estado de salud de la ubre. La leche normal de glándulas sanas contiene cerca de $1-3 \times 10^5$ células/ml; 80-90% son células epiteliales y de degeneración, más del 8% leucocitos polimorfonucleares (PMN) y linfocitos y menos del 1% macrófagos. (46)

La leche de cuartos infectados contiene un número muy elevado de células ($10^6 - 10^7$ /ml), la mayoría de las cuales (más del 90%) son PMN que provienen de la sangre. Los PMN de la leche tienen una reducida actividad bactericida comparados con los PMN suspendidos en un medio adicionado de suero, debido a la ávida ingestión previa de glóbulos grasos y de caseína (...). La actividad fagocítica de los polimorfonucleares parece ser importante en la prevención del paso de una infección crónica a una mastitis gangrenosa. (46)

Hay autores que sugieren que el contenido celular de la leche continúa ejerciendo una acción fagocitaria después de que el líquido ha sido ordeñado (24; Paape-Wergin; Russell-Reiter, citados por: 85).

d) Actividad bactericida del sistema Lactoperoxidasa/Tiocianato/Peróxido de Hidrógeno (LP/SCN⁻/H₂O₂) (Sistema LP). Inicialmente, el sistema LP demostró inhibir temporalmente algunos grupos de estreptococos tales como los grupos serológicos B y N y producir la muerte de otros, como el grupo A. (46)

Pocos estreptococos se muestran sensibles, pero para aquellos que lo son, la inhibición es muy acusada, los gérmenes no se desarrollan prácticamente en leche(...); se destruye por calentamiento a 75°C durante 30 minutos o a 82°C durante 20 segundos. (1, 89, 24)

La leche de vaca contiene altas concentraciones de lactoperoxidasa (LP) sintetizada en la glándula mamaria; el tiocianato (SCN^-) se acumula en la leche derivado de la reacción catalizada de la rodanasa con el tiosulfato en el hígado y en el riñón o de la hidrólisis de los glúcidos de plantas como la Brassicaceae, Raphanii y otras (la leche de vaca contiene normalmente de 1 a 15 mg/lit de tiocianato; 1, 89). El tercer componente, H_2O_2 , se produce metabólicamente por los estreptococos, por lo cual, estos son "autoinhibidores". En el sistema LP la enzima se combina con el agua oxigenada y oxidan al SCN^- en un producto de oxidación intermediario que es inhibidor. La adición de agentes reductores tales como la cisteína, ditionina, etc., reducen el producto oxidado y por lo tanto invierten la inhibición. (46)

Es una enzima de oxidación indirecta porque libera el oxígeno de los peróxidos como el agua oxigenada, pero se trata de oxígeno atómico, que es aceptado por una substancia en el medio. Se ha identificado como la Lactenina L-2 y por esta propiedad se diferencia de las peroxidases vegetales. (1)

Recientemente se ha encontrado que los organismos gramnegativos, aunque catalasa positivos, pueden ser destruidos por el sistema LP cuando se adiciona agua oxigenada exógena en concentraciones muy bajas no bactericidas o cuando se genera enzimáticamente. Cepas de E. coli, Pseudomonas fluorescens, Ps. aeruginosa y Salmonella typhimurium se destruyen cuando se suspenden en leche que contiene glucosa oxidasa y glucosa o en un medio sintético que contiene el sistema LP más otra fuente de agua oxigenada. Los mismos resultados se obtuvieron con leche humana y leche de cerda. El sistema demostró ser activo contra todos los serotipos de E. coli de origen humano, porcino y bovino probados hasta ahora, y contra múltiples cepas resistentes a los antibióticos de Klebsiella aerogenes aislada de heces de infante (Reiter & Marshall, datos inéditos, citado por: 46).

La actividad bactericida del sistema LP llega a ser óptima abajo del pH natural de la leche bovina (aproximadamente 6.6), lo cual es importante debido a que la acidez en el estómago (pH < 2.0) que es la barrera más efectiva contra la infección entérica, se destruye por el efecto buffer de la leche (el pH aumenta por encima de 5.0 en el becerro).

Debido a que la enzima LP resiste un pH bajo y el SCN^- se deriva de la leche o de la secreción estomacal, únicamente se requiere una fuente de agua oxigenada para probar el sistema in vivo. (...46)

e) Lisozima (N-acetil muramyl hidrolasa). Esta en-

zima tiene un origen leucocitario. (89) La leche de vaca normal es pobre en leucocitos y no contiene lisozima en cantidad apreciable; por el contrario, sí la contiene cuando hay abundancia de leucocitos (1) presentes en la glándula mamaria cuando la vaca padece alguna enfermedad.

Las lisozimas son beta-glucosamididasas o muramididasas, que provocan la hidrólisis del polisacárido que constituye la pared de ciertas bacterias, conduciéndolas a su destrucción (este polisacárido está constituido por un encadenamiento de glucosamina y ácido murámico, al cual están ligados péptidos; 1). La acción bactericida de la lisozima es importante sobre las bacterias gramnegativas. Esta diferencia en el comportamiento se explica por la diferente naturaleza de las membranas celulares de los tipos de gérmenes. (89)

La pasteurización a 62° durante 30 minutos ocasiona en la lisozima la pérdida de aproximadamente 50% de su actividad. El calentamiento a 72°C durante 15 segundos ocasiona una pérdida del 30%. (89)

Algunos autores (89, 1), mencionan que la leche de vaca tiene 3,000 veces menos lisozima que la leche humana; más específicamente, Reiter, (46) afirma que la leche humana contiene 39 mg/100 ml de lisozima, mientras que la leche de vaca únicamente 13 microgramos/100 ml.

La lisozima de la leche se encuentra nuevamente y por completo en el lactosuero, de donde se le puede aislar. (1) La fuente más rica y accesible de lisozima la constituye la albúmina de huevo, pero difiere de la lisozima de las secreciones biológicas como la leche; (46) se le encuentra también en las lágrimas, secreciones nasales, sangre, saliva, riñón, placenta, bazo, bacterias. (88)

La lisozima de la leche ha demostrado ser activa contra numerosos organismos grampositivos y gramnegativos, los cuales son completamente resistentes a la lisozima albuminosa a menos que sean previamente tratados con cloroformo o EDTA. (46)

Vakil J. R. y colaboradores, (88) en un artículo titulado "Susceptibilidad de varios microorganismos a las lisozimas de la leche", describe la sensibilidad encontrada de organismos grampositivos como *St. lactis*, *Lactobacillus casei*, *Staphilococcus aureus*, etc. y gramnegativos como *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas*, etc., frente a la lisozima de leches bovina y humana bajo diferentes condiciones.

f) Lactoferrina. Es una proteína fijadora de fierro

que se encuentra en la leche, en otras secreciones biológicas y en los leucocitos polimorfonucleares. Puesto que las bacterias requieren fierro para crecer, la lactoferrina y otros agentes pueden inhibir a las bacterias bajo ciertas condiciones (...) (46) La lactoferrina requiere bicarbonato para fijar el fierro, mol/mol (...) Los organismos gramnegativos tienen requerimientos de fierro mucho más elevados que las bacterias lácticas. (46)

La concentración de lactoferrina en la leche puede llegar hasta 6 mg/ml y se incrementa cuando existe una invasión por patógenos. (85)

La lactoferrina presente en la leche de vaca es aproximadamente 1/100 de la cantidad presente en la leche humana y porcina. (Ver 3.1.9.1.3.1, D)

g) La leche de las vacas al final de la lactación y la secreción de vacas secas contienen otras sustancias antibacterianas; se han puesto de manifiesto por su acción sobre las bacterias esporuladas aerobias. Son de dos clases: una sustancia inhibidora que resiste al calentamiento a 80°C durante 10 minutos y otra lítica (que disuelve las células bacterianas) que se destruye en dichas condiciones. (1)

Otros sistemas antibacterianos que pueden considerarse son la properdina, presente únicamente a bajas concentraciones en la leche, y las proteínas fijadoras de vitamina B-12 y ácido fólico, presentes en variadas concentraciones en la leche de diferentes especies animales.

Si la leche recién ordeñada se mantiene a una temperatura de 10°C, conserva por mucho tiempo sus propiedades bacteriostáticas. (13)

1.3.2 Substancias que Favorecen el Desarrollo Microbiano en la Leche Cruda

A) Factores de crecimiento. La leche contiene los factores de crecimiento (especialmente vitaminas B) necesarios a la mayor parte de las bacterias lácticas, pero las variaciones en las concentraciones pueden ser causantes de variación en la actividad de estas bacterias en las diferentes muestras de leche. (1)

B) De los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, los aminoácidos y péptidos son los más eficaces para estimular el crecimiento; el contenido de la leche en es

tas sustancias es un factor de limitación para muchos microorganismos. (1) Tal es el caso del Streptococcus thermophilus. (89) Las proteínas y ciertos componentes no proteícos (urea y ácido úrico), son desfavorables para el desarrollo de las bacterias lácticas.

Numerosos aminoácidos y péptidos pueden estimular el crecimiento de bacterias; en particular las estreptogeninas, que son polipéptidos formados en el curso de la hidrólisis dirigida de la caseína; contienen de 11 a 12 aminoácidos, siendo los más importantes la valina y la prolina. (1)

El efecto favorable de un previo desarrollo de diversos gérmenes en la leche antes de la siembra de bacterias lácticas, puede atribuirse a actividades proteolíticas limitadas que conducen a la formación de polipéptidos. (1) La característica de muchas bacterias psicrótrofas proteolíticas de contaminación, explica su influencia favorable sobre el desarrollo del Streptococcus thermophilus. (89)

El desarrollo de bacterias lácticas está más condicionado por el contenido de la leche en sustancias estimulantes, que por el contenido de sustancias inhibitoras. De ahí la gran importancia de frenar el desarrollo microbiano mediante la refrigeración de la leche después del ordeño.

La finalidad de la refrigeración es conservar la calidad inicial de la leche hasta el momento de su utilización o transformación. En ningún caso puede, por lo tanto, mejorar la calidad de la leche recogida en malas condiciones, pero impide la proliferación de la contaminación y es beneficiosa cualquiera que sea la calidad inicial. (1)

En la granja o en el establo es suficiente y satisfactorio disminuir la temperatura de la leche a 10°C durante las pocas horas que lleguen a mediar entre el ordeño y la entrega de la leche a la fábrica.

Por otra parte, la refrigeración debe intervenir lo más rápidamente posible. Sin embargo, no debe olvidarse que la leche presenta una fase de latencia durante las dos horas siguientes al ordeño. Es en este lapso de tiempo que debe intervenir.

1.4 ALMACENAMIENTO PREVIO

La planta de lácteos debe asegurarse que la leche de

recepción ha sido refrigerada después del ordeño o que se trata de una leche recién ordeñada. Preferentemente se encontrará entre 8 y 10° al llegar a la industria. Esta temperatura retrasa fuertemente el desarrollo de las bacterias lácticas responsables de la acidificación.

La determinación de acidez, según se tratará posteriormente, es una prueba muy importante que nos permite suponer si la leche fue o no refrigerada inmediatamente después del ordeño y el tiempo que transcurrió, incluidas las condiciones del transporte, hasta su entrega a la planta. La acidez nos indicará también la estabilidad de la leche frente al tratamiento térmico, es decir, si podrá o no pasteurizarse. Y si es posible almacenarla hasta su utilización.

Cuando la leche no fue debidamente obtenida y refrigerada, cuando el pasteurizador no se encuentra a disposición para pasteurizar y transformar la leche inmediatamente después de recibida, o cuando por algún motivo tiene que almacenarse la leche de varios días, la planta debe contar para estos casos con tanques de almacenamiento refrigerantes que se emplean exclusivamente para la leche cruda a fin de evitar el peligro de contaminar una leche higienizada.

La capacidad de los depósitos de almacenamiento previo de una planta lechera debe calcularse en función del volumen total de leche que se recibe diariamente y considerando las épocas de mayor aprovisionamiento y la eventualidad de un almacenamiento de la entrega de varios días.

Generalmente se emplean tanques, empotrados o no, en los que la leche no está en contacto con el aire atmosférico, son fáciles de higienizar y ofrecen una mejor protección térmica, así como la posibilidad de homogeneizar la leche por medio de agitadores. Estos últimos conservan una composición uniforme en la leche y permiten los cambios de calor en el caso de tanques de enfriamiento. De cualquier modo, para que los tanques de refrigeración cumplan su cometido con eficacia, deberá vigilarse el sistema de refrigeración y ser siempre correctamente lavados y desinfectados.

La agitación de la leche nos lleva a considerar, entre otras, las siguientes observaciones:

- Aumenta el contenido aparente de microbios por disgregación de los aglomerados bacterianos presentes en la leche (y al verse libres, se encuentran en mejores condiciones para multiplicarse; 8).
- La oxigenación de la leche retarda la acción de las bacte

rias lácticas (53) pues éstas se desarrollan óptimamente en condiciones anaeróbicas y por lo tanto se retarda la acidificación de la leche.

- La agitación, junto con otros tratamientos que alteran la membrana que recubre los glóbulos de grasa (homogeneización; cambios bruscos y repetidos de temperatura; refrigeración seguida de calentamiento), favorecen el enranciamiento de la grasa láctea por activación de las enzimas lipasas, (1, 89) cuya acción en la leche, normalmente se halla limitada por la protección que ofrece la membrana globular.

En el transcurso de la refrigeración, la lipasa se fija irreversiblemente sobre los glóbulos grasos. La formación de espuma y la reducción del tamaño de los glóbulos durante la agitación y la homogeneización favorecen a la enzima. (89) (Ver: 1.6.1 y 2.3.3)

Estos mismos tratamientos protegen contra la aparición del sabor oxidado. (1)

- El oxígeno del aire disuelto es un factor que estimula la oxidación de las grasas con la consecuente aparición de anomalías en la leche. (La contaminación bacteriana frena los procesos de oxidación, por una parte absorbiendo oxígeno -fenómeno de respiración que rebaja el potencial oxidorreductor- por otra, produciendo sistemas reductores propios de las bacterias. Algunas de éstas, presentes sin excepción en las leches obtenidas sin cuidado, tales como las bacterias coliformes, son eficaces desde el punto de vista de su actividad reductora. Evidentemente, este no es un remedio para los defectos de oxidación; 1, 51)
- La leche contiene relativamente poco ácido ascórbico (vitamina C), 20 mg/l (...) esta cantidad mediocre es disminuida por las manipulaciones al aire y los tratamientos térmicos. (1) A su vez, el ácido ascórbico sólo en las cantidades presentes normalmente en la leche, actúa en los fenómenos de oxidación de la materia grasa de la leche. (Ver: 2.2.3.1, B. c.) Pero si su proporción es elevada, siendo un reductor, protege a las grasas de la oxidación. (1, 51)

Estas observaciones nos indican que cualquiera que sea el tratamiento que se aplique a la leche, presentará siempre ventajas y desventajas y, por lo tanto, habrá que hacer una correcta evaluación para decidir el tipo o modalidad

des de tratamiento que se aplicará a la leche conforme a los objetivos finales de la transformación.

Casos en que definitivamente el número de desventajas es mayor, siempre tienden a evitarse; tal es, por ejemplo, el caso de la exposición de la leche a la luz solar. El efecto benéfico consiste en la transformación de esteroides biológicamente inactivos en vitamina D y la destrucción de algunas enzimas lipasas, contra muchos otros perjudiciales, principalmente para el valor nutritivo de la leche, entre los que podemos mencionar: activación de las reacciones de oxidación de lípidos y vitaminas A, C, D y E; destrucción de las vitaminas poco sensibles a la oxidación, como la vitamina B2; modificaciones del sabor (ver: 2.2.3.1, B. c.); etc.

1.5 TEMPERATURA Y BACTERIAS EN LA LECHE

La influencia de la temperatura sobre la proliferación de las bacterias en la leche es considerable y se ejerce de dos formas:

- Cuantitativamente (número ascendente de bacterias a determinada temperatura a través del tiempo).
- Cualitativamente. No son las mismas especies las que predominan a las diferentes temperaturas de conservación o de tratamiento. La temperatura tiene un papel selectivo importante, que se aprovecha en las industrias lácteas, (1) y que da lugar a una importante distinción entre las bacterias en dicha industria:
 - a) A temperaturas medias de 20-40°, es en general la flora láctica mesófila (la temperatura óptima de crecimiento de los gérmenes mesófilos se sitúa alrededor de los 30°C; 89), la que invade la leche y provoca su coagulación por acidificación, sobre todo los estreptococos. Las bacterias coliformes que son muy tolerantes a las variaciones de temperatura también pueden intervenir.
 - b) A temperaturas relativamente bajas (por debajo de 20°C, algunas veces de 15 o de 10°C, según los autores), predomina una microflora constituida por bacterias muy diversas (...) entre las cuales se encuentran gérmenes proteolíticos y lipolíticos. La leche se altera enton

ces muy lentamente y se vuelve generalmente alcalina; por este motivo, la leche cruda no puede conservarse largo tiempo en frigorífico o en recipiente refrigerado. (1)

Los microorganismos que tienen la facultad de desarrollarse a una temperatura igual o inferior a 7°C, independientemente de su temperatura óptima de crecimiento se llaman psicrótrofos. El calificativo psicrófilos está reservado a los gérmenes que tienen un crecimiento máximo situado por debajo de 20°C. (89)

- c) A temperaturas superiores a 40°C se seleccionan las especies termófilas. Su crecimiento máximo se observa a temperaturas cercanas a 45°C. (89) Ver: Pasteurización de la Leche.

Una cosa es la multiplicación bacteriana a determinadas temperaturas y otra es la actividad óptima de los sistemas enzimáticos microbianos cuya zona de temperatura no es, muchas veces, la de multiplicación activa. (1)

Por otro lado, pocos gérmenes tienen un desarrollo óptimo a una temperatura inferior a 15-20°C. Los verdaderos psicrófilos son, pues, raros. En cambio, gérmenes mucho más numerosos tienen la posibilidad de multiplicarse a baja temperatura sin que por ello se presenten como verdaderos psicrófilos, es decir, sin tener un crecimiento óptimo por debajo de 20°C. Son estos gérmenes los que tienen la importancia práctica más grande. Pueden provocar alteraciones de la leche o de los productos lácteos mantenidos en frío. (89)

Los psicrófilos que aún pueden desarrollarse a una temperatura igual o superior a 7°C son psicrófilos psicrótofos. Cuando la multiplicación exige una temperatura superior a 70°C se trata de psicrófilos no psicrótrofos. (89)

1.6 CONSIDERACIONES SOBRE LA REFRIGERACION DE LA LECHE

El enfriamiento figura entre los mecanismos tecnológicos más importantes de que se vale frecuentemente la industria de lácteos, pues no solamente regula la actividad de los gérmenes microbianos sino que se utiliza, solo o combinado con otros mecanismos para provocar diversas transformaciones industriales.

Esta excepcional importancia tecnológica nos ocupará, además de la refrigeración de la leche de recepción, en el desarrollo de varios temas: refrigeración de la leche pasteu-

rizada, elaboración de fermentos lácticos, refrigeración del producto final, etc.

1.6.1 Comportamiento de los Constituyentes de la Leche Refrigerada

La leche refrigerada a una temperatura final superior a 0°C presenta ciertas características que la distinguen de la leche fresca no refrigerada, y que hacen que no pueda ser tratada industrialmente, especialmente en quesería, en las mismas condiciones que la leche fresca. (89)

Entre estos caracteres, tres parecen esenciales en la tecnología:

- A. El aumento de la estabilidad de la solución coloidal.
- B. Disminución de la estabilidad de la emulsión de la materia grasa.
- C. Desarrollo de la lipólisis.

Estos tres aspectos serán aclarados a su debido tiempo y después de explicar la terminología que los haga comprensibles.

1.6.2 Principales Gérmenes Psicrótrofos de la Leche

El mantenimiento de la leche y los productos lácteos a baja temperatura para prolongar la duración de conservación se realiza a sabiendas de que la mayoría de los microorganismos de la leche frenan su desarrollo a una temperatura inferior a 15°C. Sin embargo, es falsa la seguridad que presenta el enfriamiento cuando se aplica a leches de mala calidad bacteriológica. La existencia de gérmenes capaces de desarrollarse en la leche a baja temperatura puede conducir a graves accidentes de conservación. (89)

Además de los diferentes hongos y levaduras que tienen la capacidad de desarrollarse en los productos lácteos almacenados en frío, son las bacterias psicrótrofas las que presentan el interés tecnológico mayor en la medida que la leche constituye para algunas de ellas, un medio privilegiado.

Estas bacterias pertenecen a un pequeño número de géneros que presentan algunos caracteres comunes y forman un grupo ecológico bien delimitado. (89)

La mayoría de las bacterias psicrótrofas son gramnegativas, esporuladas, aerobias y en forma de bastoncitos. (89)

En orden de frecuencia citaremos los géneros siguientes:

- . Género Pseudomona
- . Género Achromobacter (ahora Alcalígenes -6-)
- . Género Flavobacterium
- . Género Escherichia
- . Género Aerobacter (actualmente, móviles: enterobacter; inmóviles: klebsiella-6-)
- . Etc.

Finalmente, numerosas especies bacterianas habitualmente no psicrótrofas, pueden presentar cepas mutantes que tengan ese carácter. Se han aislado cepas de Streptococcus lactis, Str. cremoris, Str. faecalis, psicrótrofos. (89)

Los gérmenes psicrótrofos se encuentran principalmente en el suelo, las plantas, el agua y algunas veces en el aire.

La leche muestreada asépticamente dentro de la glándula mamaria generalmente no contiene gérmenes psicrótrofos. Su presencia en la leche resulta pues, de una contaminación. Dada la ubicuidad de los gérmenes en cuestión puede predecirse que las fuentes de contaminación son numerosas y variadas. (89) Sin embargo, el material de lechería insuficientemente desinfectado constituye la principal fuente de contaminación de bacterias psicrótrofas. Los hipocloritos y los compuestos iodados son, entre los inhibidores, los más activos. (89)

1.6.3 Crecimiento de Bacterias Psicrótrofas en la Leche

Dos casos pueden considerarse: la leche mantenida a una temperatura superior o inferior a 7°C,

En el primer caso, toda la flora de la leche se multiplica, incluyendo las bacterias psicrótrofas cuya mayoría tienen una temperatura de crecimiento óptima situada entre 20 y 25°C. Sin embargo, si la temperatura de conservación de la leche es superior a 15°C, el desarrollo de las bacterias psicrótrofas es inhibido por el de las bacterias lácticas mesófilas y la leche contiene finalmente una flora dominada por estas últimas. Entre 7°C y 15°C se retarda la flora láctica y la proporción de bacterias psicrótrofas es más elevada. (89)

En el segundo caso, por definición, sólo las bacterias psicrótrofas se multiplican. Después de un tiempo de conservación prolongado, pueden representar una fracción importante de la flora total, por ejemplo, 30 a 50%, o algunas veces más. (89)

Entre los factores que determinan la importancia de la flora psicrótrofa de las leches crudas conservadas en frío, figuran especialmente:

- La contaminación inicial. Cuando ésta es inferior a 500 gérmenes psicrótrofos por mililitro, se observan siempre menos de 15,000 gérmenes psicrótrofos por mililitro después de tres días a 3-5°C. Por encima de 500 gérmenes por mililitro la progresión llega a ser muy rápida y la leche conservada presenta más de un millón de gérmenes psicrótrofos por mililitro. (89)
- La naturaleza de la contaminación inicial. Las diferentes especies tienen velocidades de multiplicación muy variables. Las Pseudomonas tienen a menudo el crecimiento más rápido. (89)
- La temperatura y velocidad de refrigeración (...). Se ha constatado que el enfriamiento rápido de la leche a 0°C y su mantenimiento a esta temperatura impiden todo crecimiento microbiano durante una semana.

Cuando la leche se enfría a 4°C el desarrollo microbiano es más precoz y más rápido cuanto más contaminada está inicialmente la leche y más lento sea el enfriamiento. (89)

Los resultados de diversos experimentos muestran que un enfriamiento a 4°C en dos horas, seguido del mantenimiento de la leche a esa temperatura, evitan todo desarrollo microbiano durante 24 horas cuando la leche está fuertemente contaminada, 48 horas cuando la contaminación es media y tres o cuatro días cuando la leche es de buena calidad bacteriológica.

Cuando la temperatura de almacenamiento de la leche alcanza entre 6 y 7°C, pueden observarse desarrollos notables de gérmenes psicrótrofos y cuando la temperatura alcanza entre 8 y 10°C, la multiplicación resulta considerable. (89)

En función de lo anterior, podría pensarse que lo más conveniente en la práctica, es enfriar la leche lo más rápidamente posible a una temperatura próxima a 0°C. Pero debemos recordar el efecto del enfriamiento sobre la actividad lipolítica: la lipasa se fija irreversiblemente sobre los glóbulos en el curso del enfriamiento. El fenómeno es más notable cuanto más baja es la temperatura. La velocidad del enfriamiento es igualmente importante. De este modo, un descenso de la temperatura de 30°C a 5°C en 10 segundos produce una lipólisis mínima, mientras que un enfriamiento del mismo orden en 25 minutos provoca una lipólisis máxima y en dos horas, nuevamente una lipólisis débil. (Kenzdzal-Savoi, citados por Veisseyre; 89)

Las modalidades del enfriamiento de la leche cruda están dadas por los requerimientos bacteriológicos y las consideraciones fisicoquímicas. Se admite generalmente que hay una ventaja al enfriar lo más rápidamente posible y a muy baja temperatura (0°C - 1°C) una leche fuertemente contaminada para evitar un desarrollo importante de bacterias psicrótrofas. Por otro lado, es preferible enfriar menos bruscamente (a 4°C en 2 horas), una leche de buena calidad bacteriológica ya que conviene reducir los riesgos de la lipólisis. (89)

1.6.4 Actividad Bioquímica de las Bacterias Psicrótrofas

La actividad bioquímica de estas bacterias es intensa y afecta esencialmente la degradación de lípidos y proteínas.

La actividad sobre los glúcidos es débil y a menudo nula, por lo tanto, no hay producción de ácido. (1, 89)

Numerosas bacterias psicrótrofas tienen una actividad lipolítica elevada. Las lipasas producidas tienen la particularidad de ser a menudo termorresistentes, mientras que los gérmenes mismos no lo son en absoluto. (1, 89) De este modo, *Pseudomona fragi* (actualmente en espera de confirmación taxonómica), secreta una lipasa que muestra una actividad apreciable después de un calentamiento a 72°C durante

30 minutos. La inactividad completa exige un calentamiento a 99°C durante 20 minutos; Achromobacter butyri (ignorada en la última edición del Manual Berguey's; 6), produce también una lipasa termorresistente que se encuentra nuevamente en la leche pasteurizada; la lipasa de Achromobacter lipoliticum pierde menos del 50% de su actividad después de un tratamiento a 71°C durante tres horas. (89)

Sin embargo, no todas las lipasas producidas por los gérmenes psicrótrofos son termorresistentes. La producida por Pseudomona fluorescens se destruye por calentamiento a 63°C mantenidos 30 minutos, lo mismo que las elaboradas por los gérmenes de los géneros Alcaligenes y Flavobacterium. Ver: 2.3.3 Hidrólisis de los Lípidos)

La gran mayoría de bacterias psicrótrofas tienen una poderosa actividad proteolítica resultante de la elaboración de proteasas extracelulares. La temperatura óptima para la producción de estas enzimas es muy diferente de la temperatura óptima de crecimiento. La producción máxima de proteasa por Pseudomona fluorescens tiene lugar a 0°C. A medida que la temperatura aumenta, la cantidad de enzima elaborada disminuye. En contraposición, la elevación de la temperatura favorece la actividad de la proteasa producida (óptimo a 40-45°C). (89)

La consecuencia más perjudicial de la actividad de estos gérmenes es la aparición de malos olores y sabores. El sabor a rancio (lipólisis), amargo (proteólisis y lipólisis) u otros difíciles de definir. En general, los defectos aparecen después de pasadas 48 horas; a veces aparecen claramente a los tres días. (1) (Ver: 2.2.3)

Las leches conservadas durante bastante tiempo en el frío dan malos resultados en mantequería y en la fabricación de quesos frescos o de pasta blanda. (1)

Finalmente, en razón de sus propiedades proteolíticas, las bacterias psicrótrofas pueden estimular el crecimiento de bacterias lácticas, sobre todo porque estas últimas son muy exigentes en el plano nutricional, en polipéptidos, aminoácidos, etc. (89)

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se elaboró queso tipo Oaxaca en forma industrial y en forma rústica. El procedimiento industrial sirvió como control y la forma rústica como procedimiento a prueba.

Se dispuso aproximadamente de 400 litros de leche para cada elaboración, procedentes del establo del Instituto de Investigaciones Pecuarias de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

El cumplimiento de los objetivos primordiales se realizó paulatinamente según la disponibilidad de aparatos, equipo, materiales, reactivos, aditivos, etc., en la Planta de Lácteos y en el Laboratorio del Centro Nacional de Lactología, del Instituto Nacional de la Leche, ubicado en Ajuchitlán, Querétaro, en el Laboratorio Nacional de Referencia de la Secretaría de Salubridad y Asistencia, en el Distrito Federal, y en la planta "Productos de Leche Noche Buena, S. A.", en Tulancingo, Hgo.

II. EVALUACION DE LA LECHE QUE SE VA A TRANSFORMAR

Contenido

- 2.1 Consideraciones previas
 - 2.1.1 Microorganismos en la leche
 - 2.1.2 Microorganismos patógenos en la leche
 - 2.1.3 Alteraciones de la leche provocadas por microorganismos
 - 2.1.4 Mastitis
- 2.2 Evaluación de la leche
 - 2.2.1 Temperatura
 - 2.2.2 Toma de muestras
 - 2.2.2.1 Material
 - 2.2.2.2 Procedimiento
 - 2.2.3 Apreciación sensorial
 - 2.2.3.1 Color, olor, sabor
 - 2.2.3.2 Textura
 - 2.2.4 Composición de la leche
 - 2.2.5 Calidad de la leche de recepción
- 2.3 Materia grasa
 - 2.3.1 Fracción saponificable e insaponificable de la grasa
 - A. Fracción saponificable
 - 2.3.1.1 Lípidos
 - 2.3.1.2 Lípidos simples
 - 2.3.1.2.1 Estructura
 - 2.3.1.2.2 Acidos grasos esenciales
 - 2.3.1.3 Lípidos complejos
 - 2.3.1.3.1 Glicerofosfolípidos
 - 2.3.1.3.2 Aglicerofosfolípidos
 - B. Fracción insaponificable
 - 2.3.1.4 Esteroles
 - 2.3.1.5 Tocoferoles
 - 2.3.1.6 Carotenoides
 - 2.3.1.7 Vitaminas liposolubles

- 2.3.1.8 Escualeno
- 2.3.2 Glóbulos de grasa
 - 2.3.2.1 Interior de los glóbulos grasos
 - 2.3.2.2 Membrana envolvente
- 2.3.3 Hidrólisis de los lípidos
- 2.3.4 Contenido graso y pago de la leche
- 2.3.5 Determinación de la materia grasa. Método de Gerber
 - 2.3.5.1 Fundamento
 - 2.3.5.2 Aparatos y equipo
 - 2.3.5.3 Materiales y reactivos
 - 2.3.5.4 Procedimiento
- 2.4 Densidad o peso específico
 - 2.4.1 Aparatos y equipo
 - 2.4.2 Materiales
 - 2.4.3 Procedimiento
 - 2.4.4 Cálculos y resultados
- 2.5 Sólidos totales
- 2.6 Prueba de neutralizantes
 - 2.6.1 Materiales y reactivos
 - 2.6.2 Procedimiento
- 2.7 Punto de congelación
 - 2.7.1 Aparatos y equipo
 - 2.7.2 Reactivos
 - 2.7.3 Procedimiento
- 2.8 Acidez
 - 2.8.1 Lactosa
 - 2.8.1.1 Estructura química
 - 2.8.2 Fermentación microbiana
 - 2.8.2.1 Sistemas de transporte
 - 2.8.2.2 Vía Embden-Mejerhof (glucólisis)
 - 2.8.2.3 Principales fermentaciones
 - 2.8.3 Bacterias lácticas
 - 2.8.3.1 Familia Streptococcaceae
 - 2.8.3.1.1 Género Streptococcus
 - 2.8.3.1.2 Género Leuconostoc
 - 2.8.3.2 Familia Lactobacillaceae

- 2.8.3.2.1 Género Lactobacillus
- 2.8.4 Acidez titulable
 - 2.8.4.1 Medición de la acidez
 - 2.8.4.1.1 Análisis volumétrico
 - 2.8.4.1.1.1 Soluciones Valo
radas
 - 2.8.4.2 Sistemas de expresión
 - 2.8.4.2.1 Gramos de ácido láctico
 - 2.8.4.2.2 Grados Dornic
 - 2.8.4.2.3 Grados Soxhlet-Henckel
 - 2.8.4.2.4 Equivalencia de los sistemas
de expresión
- 2.8.5 Técnica de titulación
 - 2.8.5.1 Aparatos y equipo
 - 2.8.5.2 Materiales y reactivos
 - 2.8.5.3 Procedimiento
 - 2.8.5.5 Causas de error
- 2.8.6 Variaciones de la acidez
- 2.9 Prueba del alcohol
 - 2.9.1 Materiales y reactivos
 - 2.9.2 Procedimiento
 - 2.9.3 Preparación de alcoholes

2.1 CONSIDERACIONES PREVIAS

2.1.1 Microorganismos en la Leche

La presencia de un gran número de especies microbianas en la leche es un hecho comprobado. Casi todos los gérmenes pueden proliferar fácilmente en la leche debido a que ésta constituye un excelente medio de cultivo; sin embargo, para un cierto número de especies banales o patógenas, la leche puede ser un vehículo ocasional; no se desarrollan mejor en este líquido que en el agua, la cual puede igualmente servir de medio de transporte (1) ... en la práctica no hay ninguna leche cruda exenta de gérmenes, lo que obliga a considerar a los microbios como componentes "fisiológicos" de la leche. (35)

Los microbios que se encuentran en la leche pueden tener dos orígenes:

A. MICROORGANISMOS DE ORIGEN MAMARIO

Cuando la leche sale de la glándula mamaria al exterior, a través del pezón, atraviesa múltiples conductos desde los alvéolos hasta el orificio final, arrastrando parte de la microflora banal propia de esos conductos; de ahí que la primera leche es siempre la que más gérmenes contiene.

Esta población originaria de la mama sana es, en general, poco numerosa en la leche en el momento del ordeño; es raro que rebase los 1,000 gérmenes por cc, (de 100 a 3,000; 89) y puede estar compuesta solamente por algunas decenas de gérmenes. Cuando el contenido de gérmenes es elevado, suele ser debido a una proliferación de los gérmenes típicos de la mamitis contagiosa: estreptococos y estafilococos. (Ver 2.1.4) Sin embargo, hay animales que dan, a la salida de la mama, una leche de contenido microbiano elevado: 10,000 gérmenes por cc, y más, aunque la glándula parezca sana; es un defecto persistente, con amplias variaciones que no puede descubrirse más que por el examen microbiológico de la leche,

ya que la mama es normal y la composición de la leche también. (1)

Cuando por alguna causa disminuye la resistencia o la oposición del tejido glandular a la proliferación bacteriana, el número de microorganismos aumenta considerablemente.

Los gérmenes de origen mamario que vamos a encontrar en la leche, penetraron en la glándula mamaria por: a) vía ascendente a través del canal del pezón, b) por vía sanguínea (tal es el caso de los gérmenes productores de brucelosis y tuberculosis), c) otra modalidad (picaduras de insecto, heridas, intervenciones quirúrgicas, etc. en la glándula mamaria).

B. CONTAMINACION DE LA LECHE EN EL EXTERIOR DE LA MAMA

Aunque muy amplio, este aspecto del contenido microbiano de la leche, es tanto o más importante que el anterior, debido a que comprende todos los aspectos en que directa o indirectamente se contamina la leche, algunos de ellos son:

- El ambiente (atmósfera del establo, de la sala de ordeño, polvo, moscas, etc.).
- Higiene del animal (animales no bañados antes de la ordeña y/o que desprenden de su piel partículas de excremento, tierra, vegetales, pelos, material de la cama, etc. que pueden caer en los recipientes o utensilios de la ordeña manual o mecánica; animales bañados mal secados que escurren agua sucia); por descamaciones cutáneas, estado de salud del animal, etc.
- Salud e higiene del ordeñador.
- Utensilios y máquinas sucias o mal lavados y/o esterilizados, así como la calidad del agua, sustancias desinfectantes, etc. que entran en contacto con la leche.
- Condiciones de refrigeración, transporte y manipulaciones diversas de la leche.
- Personal, maquinaria, ambiente de la fábrica de lácteos.
- Etc.

Cada una de las materias contaminantes alberga una po-

blación microbiana determinada que está sujeta, además, a toda clase de variaciones.

Los gérmenes más comunmente presentes en la leche pueden ser hongos, levaduras o bacterias. De ellos, múltiples especies de los más diversos géneros que ocuparían una larga descripción taxonómica, que por ahora no nos ocupa.

El efecto de los microorganismos en la leche y los productos lácteos es sumamente importante, en general, por los siguientes tres aspectos:

- a) Uso tecnológico. La tecnología lechera se basa fundamentalmente en el uso y manejo de microorganismos. Microorganismos útiles, necesarios para imprimir ciertas características deseables en los productos lácteos (aspecto, textura, sabor, olor, etc.).

La inherente, aunque modesta participación tecnológica de los microorganismos en la elaboración de queso Oaxaca (queso fresco) queda comprendida, principalmente, en los procesos de acidificación, fermentación y características organolépticas, según comprobaremos oportunamente.

- b) Alteraciones de diversa índole que afectan la capacidad de conservación de la leche, su aptitud para la transformación, su valor nutritivo, su calidad higiénica, etc. (ver inciso 2.1.3).
- c) Infecciones e intoxicaciones alimentarias. Aspectos de higiene y salud pública (ver inciso siguiente), que demandan una continua y estricta vigilancia de la leche y sus derivados.

2.1.2 Microorganismos Patógenos en la Leche

La leche (al igual que otros productos lácteos) puede contener múltiples microorganismos patógenos para el hombre. El origen de estos gérmenes puede ser:

- a) El animal, a través de la glándula mamaria (según se estableció anteriormente), o por otros orificios naturales a través de excrementos, expectoraciones y secreciones diversas.

El animal es entonces a causa de esta relación con el hombre, productor de enfermedades de tipo zoonosis, en las que participan muchos microorganismos, tales como: Mycobacterium tuberculosis var. bovis, Brucella abortus y Brucella melitensis (bacilos de la fiebre ondulante y la fiebre de Malta), estreptococos diversos, Staphylococcus pyogenes, virus de la fiebre aftosa, Escherichia coli, salmonelas, leptospiras, rickettsias (fiebre Q), encefalitis transmitida por garrapatas, (87) aunque no está probada su transmisión a través de la leche, los datos epidemiológicos hacen pensar que existe la transmisión de carbunco, listeriosis y toxoplasmosis. (87)

b) El medio exterior. Desde el momento del ordeño en adelante la leche puede entrar en contacto con muchos materiales biológicos o no, que pueden contener o albergar gérmenes patógenos. De este modo la leche puede transmitir infecciones por Clostridium perfringens (welchi), carbunco, botulismo (toxina), etc. (87)

c) El hombre, a través de manos, cabellos, prendas de vestir, expectoraciones, etc., en una palabra, falta de higiene o padecimientos de salud.

Numerosos son los gérmenes patógenos que puedan proliferar en la leche seguida de la contaminación humana, entre ellos tenemos la presencia de Salmonella typhi y paratyphi (bacilos tíficos), Shigella dysenteriae (bacilos de la disentería), Corynebacterium diphtheriae (bacilo de la difteria), Streptococcus scarlatinae (germen de la escarlatina), virus de la poliomielitis, gastroenteritis producida por enterotoxinas estafilocócicas, cólera, colibacilosis, estreptocócicas, etc.; aunque no está probada su transmisión a través de la leche, los datos epidemiológicos hacen pensar que existe la transmisión de hepatitis infecciosa por adenovirus, amebiasis, balantidiasis, oxiurosis. (87)

La presencia demostrable de bacterias patógenas no es la única causa de peligro para el hombre, las sustancias tóxicas elaboradas por muchas bacterias revisten gran importancia en salud pública. Las principales son producidas por estafilococos.

El peligro no reside en la simple presencia de un pequeño número de estos gérmenes toxígenos, sino que se manifiesta cuando las condiciones son favorables a su multiplicación, especialmente durante la permanencia prolongada de la leche a temperaturas medias en los bidones o depósitos; entonces proliferan estos gérmenes y forman su toxina. (i) Evitar el

crecimiento de estas bacterias por medio de la refrigeración, es mucho más importante de lo que parece: durante la pasteurización morirán las bacterias productoras de toxinas, pero estas substancias, una vez producidas, permanecen activas por resistir la acción del calor. Algunas bacterias, en especial las enterobacterias comunes en la leche, contienen endotoxinas que no pasan al medio más que tras la autólisis del cadáver microbiano. Estas substancias tienen un efecto tóxico menos acusado que las precedentes; sin embargo, pueden alcanzar una concentración peligrosa si la proliferación de gérmenes productores es intensa. (1)

El número de enfermedades que pueden provocar en el hombre los microorganismos patógenos, es tan variado como múltiples sean las especies consideradas como productoras de trastornos en la salud humana, en un momento determinado. Debemos recalcar que la sola presencia de los gérmenes no asegura la enfermedad en el hombre, son "simplemente" una posibilidad peligrosa que debe evitarse.

La mayoría de los gérmenes patógenos no provocan modificaciones sensibles de la composición y de la estructura de la leche y no pueden ser puestos en evidencia más que por el análisis bacteriológico. (89)

La determinación de bacterias patógenas en la leche por técnicas de detección serológica o por medios de cultivo, no forman parte de este inciso; en cambio, describiremos los procedimientos para la determinación de algunos de los microorganismos más importantes en el queso (ver IV Control de Calidad).

2.1.3 Alteraciones de la Leche Provocadas por Microorganismos

Los microorganismos no son los causantes de todos los defectos de la leche. Es sabido que ésta puede presentar sabores anormales en ausencia de cualquier desarrollo microbiano. (1) Procesos químicos o la acción de las enzimas propias de la leche constituyen ejemplos de ello (ver 2.2.3).

No obstante, numerosos componentes de la leche pueden degradarse por vía microbiana con la consecuente modificación del medio. Las substancias más abundantes de la leche, y que son las que confieren sus propiedades de calidad nutritiva son por ello, las que más utilizan y transforman las bacterias; naturalmente, cuanto más numerosa y diversa sea

la población bacteriana, más rápida, variada y cuantitativa podrá ser la transformación.

a) Lactosa. Es el principal alimento energético de las bacterias y puede experimentar diferentes fermentaciones (láctica, butírica, propiónica, alcohólica...), por numerosos microorganismos: estreptococos, lactobacilos, micrococos, bacterias coliformes, etc. Las proporciones de los productos de fermentación varían también con las condiciones de cultivo.

Entre las distintas fermentaciones que experimenta la lactosa por variados microorganismos (individualmente o en forma asociada), nos interesa especialmente la fermentación anaeróbica o glucólisis en que se produce ácido láctico (ver: 2.8. Acidez).

b) Proteínas. El ácido láctico proveniente de la degradación de la lactosa inhibe considerablemente la acción de otros microorganismos, por ello la proteólisis ocurre generalmente antes (ejemplo: gérmenes proteolíticos psicrótrofos; 1.6.4) o después de la desaparición del ácido láctico (la reducción del contenido en ácido láctico, se realiza también por varios gérmenes, hongos principalmente).

Los microorganismos que coagulan la leche son también proteolíticos y pueden intervenir sin que haya una acidificación previa importante. (89)

En general, las principales alteraciones de las proteínas ocurren posteriormente a la coagulación enzimática con formación de sustancias fijas y gases. (1)

Los procesos proteolíticos resultan especialmente perjudiciales en la leche. En la proteólisis intervienen no sólo enterobacterias (E. coli, etc.) y distintas otras bacterias gramnegativas, así como algunos cocos, sino también y con carácter preponderante, los gérmenes esporulados aerobios (y anaerobios). Los anaerobios revisten a este respecto escasa importancia, ya que no encuentran el medio exento de oxígeno necesario para su desarrollo. La proteólisis no sólo deja sentir sus efectos inmediatos sobre los caracteres de la leche (alteraciones de olor, sabor y viscosidad), sino también en la elaboración de productos lácteos. (35)

c) Materias grasas. Son hidrolizadas por las lipasas microbianas; esta reacción es bastante lenta, pero influye rápidamente sobre el sabor. (1) (Ver: Hidrólisis de los lípidos)

2.1.4 Mastitis

A todas las enfermedades de las hembras lecheras responde la glándula mamaria con un trastorno en su secreción. Las influencias externas, aunque en bajo grado, ya pueden influir sobre la composición de la leche. Pero es en las enfermedades graves o en las afecciones específicas de la mama (mastitis) cuando la leche resulta alterada con particular intensidad. (35) Las leches patológicas son aquellas que provienen de glándulas enfermas. (89)

La mastitis es una enfermedad compleja que tiene diferentes causas, diferentes grados de intensidad y variaciones en la duración y efectos. (50)

La mastitis, como cualquier otro padecimiento de graves consecuencias, reviste múltiples aspectos de estudio. Nosotros mencionaremos solamente tres de ellos, por su importancia higiénica y tecnológica:

- A. Microorganismos que pueden encontrarse presentes en las leches provenientes de animales enfermos de mastitis (o de algún otro padecimiento general). Entre ellos tenemos:

Bacillus anthracis, formas vegetativas y esporuladas (carbunco); Mycobacterium tuberculosis var. bovis u otras variedades (tuberculosis; Brucelas (brucelosis); salmonelas (salmonelosis, mastitis salmonelósica); Listeria monocytogenes (listeriosis); virus de la glosopeda (glosopeda); Coxiella burneti (rickettsiosis - fiebre Q); leptospiras (leptospirosis); estreptococos (especialmente agalactiae, disgalactiae y uberis); estafilococos; neumococos; coliaerógenes; klebsielas; Corynebacterium pyogenes y otras especies; Pseudomona aeruginosa; Nocardia asteroides; Actynomices bovis; Bacillus cereus; Clostridium perfringens; blastomicetos; algas; micoplasmas; micrococos; pasteurelas; proteus; etc.

La mastitis puede presentarse como procesos infeccio

sos o no infecciosos (no se evidencian gérmenes). La mastitis como proceso infeccioso puede tener lugar en el curso de las enfermedades infecciosas generales (v. gr.: tuberculosis, brucelosis, salmonelosis, listeriosis, glosopeda-asociación, etc.), o bien, desarrollarse como enfermedad orgánica de localización específica (glándula mamaria). De ahí que la incidencia de los distintos agentes patógenos (individualmente o en asociación), varía muchísimo; dependerá del país, la región geográfica, los distintos procedimientos de manejo y ordeña del animal, etc.

Son más de 20 los microorganismos capaces de producir mastitis pero más del 90% de los casos son causadas por estreptococos y estafilococos. (50)

- B. Alteraciones en la leche producidas por animales enfermos. Todas las enfermedades infecciosas de los bóvidos pueden influir desfavorablemente sobre la secreción láctea. En particular, la fiebre siempre origina un descenso en la producción y una alteración en la composición de la leche. (35)

En la mastitis, las alteraciones más comunes consisten en inflamación y atrofia del tejido glandular. La inflamación del epitelio secretor se acompaña de modificaciones en el aspecto bioquímico, fisiológico y bacteriológico:

1. En el aspecto bioquímico:

- a) Disminución del número de moléculas elaboradas específicamente por la célula alveolar:
- . Disminución de la materia grasa (del 5 al 12%; 8)
 - . Disminución de la caseína (la leche es más rica en proteínas distintas de la caseína normal; 51)
 - . Disminución de la lactosa: 10 a 20% como norma general. (8)
 - . Disminución de los citratos

- b) Aumento de los productos de filtración provenientes del plasma sanguíneo.

Siempre que la mama presenta una anormalidad, la composición de la leche tiende a aproximarse a la de la sangre; la sangre contiene más cloro y tiene un pH más elevado, (50) por ello habrá:

- . Aumento de seroalbúmina y globulina.
- . Aumento de cloruros y de iones de sodio (en este caso su presencia puede confundirse con una leche de retención en la que la lactosa se reabsorbió y se reemplazó con un exceso de cloruro de sodio).

- c) Las proporciones de potasio, calcio y fósforo también disminuyen y se encuentran algunas variaciones en la tasa de vitamina A. Puede haber un cambio en el contenido de riboflavina y ácido ascórbico. (8)

La acción y actividad de algunas enzimas se modifica. (8) La actividad de la lipasa se incrementa en leches mastíticas. (Natzke R.P.; 85)

Al aumentar el pH se altera su fluidez, apareciendo flóculos o coágulos; (51) la acidez titulable disminuye de un 15 a un 20%, aumentando la conductividad eléctrica. (8)

En términos generales, puede decirse que la composición de las leches de animales mastíticos sufre una doble modificación desde el punto de vista bioquímico: (8)

- . La cantidad de extracto seco total disminuye
- . Se modifica la relación entre los diversos constituyentes de la leche

Estas modificaciones varían dependiendo del grado y tipo de infección.

2. En el aspecto fisiopatológico:

En este aspecto, la inflamación del epitelio secretor se acompaña de una descamación epitelial y de una hiperleucocitosis que van a la leche junto con otras substancias que las células elaboran: diasta-

sa, catalasa, glucógeno, histamina, etc.

Las modificaciones fisiológicas dan lugar a un gran número de pruebas de laboratorio para determinar células, enzimas, etc.

Naturalmente, el daño tisular se acompaña de una dis-minución considerable de la producción de leche.

Durante la inflamación, los vasos sanguíneos de la zona afectada se dilatan y transportan mayor cantidad de sangre; los capilares aumentan de porosidad y la velocidad de flujo disminuye; todo esto facilita la llegada de los fluidos sanguíneos al área inflamada. Estos fluidos transportan los factores de la coagulación del plasma y de la leche en los alvéolos y conductos galactóforos. En algunos casos precipita la caseína, pero la mayor parte de las veces los flóculos y coágulos de la leche son el producto de la coagulación de los fluidos sanguíneos. La ruptura de los vasos sanguíneos permite el paso de la sangre a la leche o a los tejidos, lo que explica su presencia en la leche. (51)

Existe mucha variación en las estimaciones de los efectos que producen las infecciones intramamarias en la producción y en la composición de la leche. Mucho de esto es debido a los métodos usados en tales investigaciones, las mediciones de los parámetros y las diferencias de respuesta entre vacas a la infección. Por lo tanto, podemos encontrar en la literatura datos que nos indican pérdidas entre el 20% y el 70% de producción. (Cobo Abreu; 85)

3. En el aspecto bacteriológico:

Presencia de gran número de bacterias por la infección microbiana que producen las modificaciones físicas y químicas en la leche (fermentación de la lactosa, disminución del pH, viscosidad de la leche, aumento de la conductibilidad eléctrica, etc.).

C. Influencia de las leches mamáticas en la elaboración de quesos. Las leches provenientes de vacas con mastitis son impropias para su utilización en quesería. La importancia técnica de las alteraciones en estas leches, se acentúa por los siguientes aspectos:

. Las alteraciones físicas y químicas modifican el

valor de la materia prima (reducción de sólidos totales), lo que se traduce en:

- . Menor valor nutritivo
- . Reducción del poder acidificante
- . Retardo de la coagulación por el cuajo a causa de una reducción de la cantidad de sólidos no grasos y la menor acidez.

(Hay un coeficiente de correlación de 0.87 entre el grado de inflamación de la mama y el tiempo de coagulación por el cuajo; 8)

Además:

- . La leche puede ser inestable al calor
- . Perturbación de los procesos de fermentación bacteriana debido a las modificaciones que experimenta la leche y la presencia de residuos de antibióticos
- . Retención de suero o desuerado perezoso
- . El gusto y la aptitud para la conservación de los productos lácteos también se afectan negativamente

Podría suponerse que la mezcla de leches de varias vacas oculta por disolución, las alteraciones particulares de la leche de una vaca enferma, sin embargo, según Alais Ch., (1) estos inconvenientes se presentan igualmente cuando las leches mamáticas se encuentran mezcladas con grandes volúmenes de leche normal.

La mastitis (afecciones de la glándula mamaria) merece mayor atención de la que pudimos brindarle; aconsejamos se acuda a libros o artículos especializados que traten ampliamente todos los aspectos que reviste este padecimiento y su importancia técnica, económica e higiénica. Algunos textos de la bibliografía utilizada pueden servir como referencia. (50, 51, 52, 5, 25, 35, 1, 45, 85, 86, 89, 8, 43)

2.2 EVALUACION DE LA LECHE

La evaluación de la leche que llega a una planta de transformación es sin lugar a dudas, una de las actividades más significativas de la industria lechera: permite el aprovechamiento óptimo del producto.

Una correcta evaluación implica la utilización máxima y adecuada de los constituyentes de la leche a través del destino tecnológico que se le asigne; permite mejorar su capacidad de conservación, reduce o elimina los riesgos sanitarios, retribuye o mejora sus características organolépticas, etc. No obstante, la evaluación de la leche no libera al productor de sus responsabilidades en el establo, es decir, el laboratorio de una industria no es un organismo al servicio del productor de leche en donde se detectan anomalías o enfermedades de las vacas, ni es guía o auxiliar de su diagnóstico, para que posteriormente y por vía ascendente, se localice el problema y se corrija. Los productores no deben atenderse a ello ni los profesionales de la leche permitirlo.

El productor de leche es el único responsable de su explotación y debe prever todas las anomalías posibles según las condiciones en que trabaja, el tipo de instalaciones, manejo de animales, alojamientos y equipo de todo tipo que directa o indirectamente entran en contacto con la leche; programas de medicina preventiva, revisiones periódicas del estado de salud de animales y personal, controles bacteriológicos regulares de las instalaciones de ordeña, ubres, agua, et. Amplia gama de actividades que requieren atención especial y separada de la industria, en cuanto a análisis de laboratorio y programas internos se refiere.

El laboratorio de la planta industrial se responsabiliza de todos los procesos que ocurren en su área. Culminar en productos de la mejor calidad posible para el consumo humano es su objetivo. Por ello, desde el momento en que la leche se entrega a la industria comienza el análisis. Los resultados de un examen cualitativo de la leche permiten inferir los distintos productos lácteos que pueden elaborarse, el grado de calidad esperado (físicoquímica y bacteriológicamente) y las precauciones que deberán tomarse para la conservación y el manejo de los mismos.

La correcta evaluación de la leche requiere, entre otros, el conocimiento de los procesos de biosíntesis láctea en la ubre del animal, de ahí, la composición media de la leche considerada normal, los factores (tanto internos como externos al mamífero) que hacen variar la composición de la leche, las condiciones en que fue producida, obtenida y manipulada, el grado y tipo de contaminación, las posibles adulteraciones y alteraciones y, finalmente, su aptitud para transformarse en determinado producto lácteo.

Las consideraciones anteriores deben ser objeto de

amplio estudio; algunas publicaciones al respecto se encuentran enumeradas en la bibliografía.

Cuando las muestras de leche llegan al laboratorio, los análisis que pueden practicarse en un líquido de naturaleza tan compleja son muchos y muy variados dependiendo de lo que se investigue; algunos son sencillos, otros más complicados. En la práctica diaria, sólo se realizan los que se consideran necesarios y prácticos (valga la redundancia) para determinar si una leche satisface o no, los requisitos sanitarios y del procedimiento a que será destinada. (Sirven también, conociendo la calidad de la leche que se recibe, para asignar el pago correspondiente).

En nuestro caso, sabemos que la obtención de quesos de primera calidad así como la regularidad y la uniformidad en el tipo fabricado, sólo puede lograrse cuando se dispone de una leche con correcta composición química y bacteriológica. La determinación de la calidad del producto natural tiene también por objeto eliminar las leches alteradas u ostensiblemente modificadas (leches de vacas que padecen enfermedades infecciosas).

La elaboración de queso de alta calidad depende en gran medida de la aptitud de la leche para el desarrollo microbiano. (1.3) En tal sentido conviene conocer su riqueza en los componentes fundamentales (grasas, proteínas, hidratos de carbono, sales minerales) y la influencia de los mismos en la proliferación de los microorganismos. Muchas veces las bacterias lácticas no se desarrollan en la leche o lo hacen con dificultad; ni en uno ni en otro caso la leche es apta para la elaboración de queso, por exigir ésta el desarrollo de procesos llevados a cabo por algunos microorganismos y ciertos sistemas enzimáticos de origen microbiano.

La aptitud de la leche para la elaboración de queso depende de sus caracteres organolépticos y fisicoquímicos y de la naturaleza de su microflora. Es idónea cuando posee un color, sabor y olor y una composición normales y cuando cuenta con una microflora apropiada y una buena aptitud para la coagulación. (13) Para algunos autores, (8) la verdadera causa de la aptitud o no de la leche para una correcta fabricación de quesos, descansa fundamentalmente sobre factores microbianos más o menos conocidos.

Actualmente, en nuestro medio, la leche que se destina a la elaboración de queso ha de ser objeto de una rigurosa selección, debiendo, en cualquier caso, reunir todas las exigencias higiénicas y técnicas que permitan la fabricación

de quesos aptos para el consumo humano. La descripción del proceso de elaboración permitirá formular un criterio adecuado para evaluar una leche destinada a la fabricación de queso Oaxaca y que permita, a su vez, cumplir ampliamente con las exigencias sanitarias vigentes para el producto.

No podemos dejar de señalar, en cuanto a evaluación de la leche se refiere, la situación ideal. Evaluación, es en sí mismo, un término muy difícil de manejar en cualquier área que se aplique, debido a la gran cantidad de factores que lo constituyen y/o modifican; muchos de ellos escapan o definitivamente no están al alcance del "evaluador", reduciéndose entonces su participación a una simple opinión personal, con todo lo que esto implica.

En nuestro caso, las necesidades de una planta elaboradora de productos lácteos (queso tipo Oaxaca en particular), son las dictaminadoras del criterio de evaluación.

Una planta industrial que cuente con una explotación productora de leche o una cuenca lechera muy próxima a sus instalaciones y que la provea de la cantidad necesaria de leche, se encuentra ya en una situación muy favorable; y aún mejor, si la explotación pertenece a la planta y se dispone de personal técnico y profesional, especializados en controlar todos los factores que intervienen en la obtención de leche con las características deseadas; las ventajas de ello saltan a la vista (la evaluación de la leche, entre otras, se reduce a un mínimo indispensable). Conjuntamente al aspecto técnico se trabaja entonces en el campo de la producción de la materia prima y su aprovisionamiento a la planta para culminar en productos de óptima calidad, constituyéndose como un todo armónico.

2.2.1 Temperatura

La temperatura de la leche se anota al ser entregada, para determinar así el grado de enfriamiento en los establos y las medidas tomadas en el transporte para mantener la temperatura satisfactoriamente hasta que la leche sea entregada en las plantas (...). Como las temperaturas de entrega no indican necesariamente: 1) prontitud del enfriamiento en el establo, ni 2) mantenimiento continuo de temperaturas bajas después del enfriamiento inicial, los datos así obtenidos no indican infaliblemente que el enfriamiento es adecuado. (41)

La temperatura de la leche, como indicamos anterior-

mente (1.4) debe ser de 8-10°C al llegar a la planta, pues esta temperatura retrasa fuertemente el desarrollo de las bacterias acidificantes.

Cuando en las pruebas de plataforma se toma rutinariamente la temperatura, se deben impartir instrucciones para: 1) mantener los termómetros libres de contaminaciones, 2) conservarlos a una temperatura uniforme que permita a la columna de mercurio reposar rápidamente, y 3) leerlos rápidamente una vez retirados, si no se pueden leer mientras están sumergidos. (41)

La lectura de la temperatura se anota en los libros de recepción junto con la fecha y hora de entrega de la leche, sobre todo en los casos de existir alguna prima por la entrega de leche refrigerada.

2.2.2 Toma de Muestras

Para que un análisis cualquiera tenga verdadero valor, debe partir de una muestra bien tomada, y este procedimiento, que a primera vista es muy sencillo y al que en muchos casos no se le concede la importancia que exige, debe hacerse con la mayor atención y ajustándose a normas científicamente establecidas. (44)

La muestra debe ser siempre característica del lote que representa, por eso nunca se deben muestrear leches congeladas, coaguladas o con gránulos de grasa (no poseen una composición uniforme).

La toma de muestras debe realizarse sabiendo qué tipo de pruebas se van a aplicar a la leche, pues según ésta, serán las exigencias y necesidades del material y procedimientos a seguir (por ejemplo, las precauciones para las determinaciones microbiológicas suelen ser mayores que para las determinaciones físicoquímicas y el volumen de muestra necesario también puede variar mucho).

El material y procedimientos siguientes se consideraran adecuados a la índole de pruebas a realizar. (2.2.5)

En el apartado de recepción de la leche hicimos alusión al momento de la toma de muestras: (1.1)

2.2.2.1 Material

- Agitador: pala sanitaria de longitud adecuada para tanques y bidones
- Recipiente de vidrio, limpio, con tapa y capacidad para contener un litro de leche
- Instrumento para transferir muestras: un cucharón de metal limpio y seco

2.2.2.2 Procedimiento

El muestreo debe realizarse en los tanques de almacenamiento o en los recipientes de las básculas que contienen la leche cruda que no ha recibido ningún tratamiento. (1.1)

La leche se debe agitar durante algunos segundos (30 o más) por medio del agitador automático del tanque o de la pala sanitaria.

Debe evitarse la formación de espuma y recibirse la muestra (1 litro aproximadamente) en el recipiente de vidrio previamente identificado. Se cierra herméticamente y se lleva al laboratorio.

Cuando se trata de recepción en camiones cisterna, (1.2) las muestras de leche deben tomarse de la cisterna llena, también previa agitación manual o automática siguiendo el mismo procedimiento.

2.2.3 Apreciación Sensorial

La apreciación organoléptica de la leche involucra principalmente a los sentidos de la vista, el olfato y el gusto; sobre este último debemos hacer hincapié en su limitación, dado el peligro que entraña probar la leche cruda. (2.1.2)

El laboratorio de una planta de lácteos debe analizar el aspecto organoléptico periódica y regularmente junto con las pruebas de tipo microbiológico y físicoquímico.

La muestra de estudio, al igual que para los otros análisis, es únicamente representativa del hato en particu-

lar y la mezcla de leches de la producción de varias vacas puede ocultar la apreciación de alteraciones en su color, olor y sabor individuales.

2.2.3.1 Color, olor, sabor

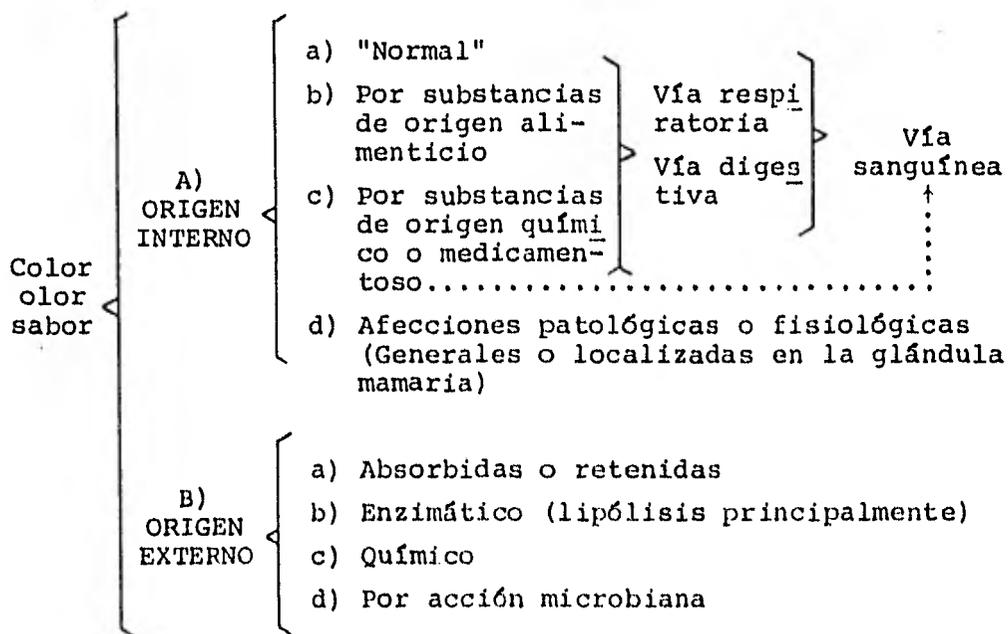
El aspecto, color y fluidez se observan mejor sobre una superficie negra (ejemplo: reconocer la formación de flóculos).

La definición de olor y sabor de un producto natural complejo, como la leche, es muy difícil, ya se trate del olor y sabor normales o de olores y sabores anormales. La apreciación de estas sensaciones varía grandemente según los individuos, a causa de las diferencias importantes en la agudeza de los sentidos (...). El sabor es una "respuesta integrada", encontrándose los integradores en la nariz y en la boca. (1)

Algunas alteraciones se pueden detectar sólo por el olor. Frecuentemente se deben a sustancias volátiles, que algunas veces se aprecian más claramente cuando se calienta la leche. Se vierte una cantidad de 10-20 ml en un vaso de precipitado pequeño y limpio, se calienta a unos 60° (25°C son suficientes, según Lerche; 35) y a veces se aprecia un cierto olor. Si la alteración no se ha podido detectar por el olfato, se puede poner se manifiesto por el gusto, pero únicamente cuando sea absolutamente necesario y, en todo caso, no se ingerirá la leche. (84)

CLASIFICACION

La literatura que fue posible consultar pone de manifiesto (salvo excepciones), que la apreciación organoléptica es relegada a un segundo plano; se menciona muchas veces de modo meramente accidental, por ello no siempre se ofrece un panorama o una clasificación satisfactoria de los colores, olores y sabores que pueden encontrarse en la leche. Según lo anterior, proponemos, para la leche cruda, una simple clasificación general que resulta de utilidad, al menos, para nuestra descripción:



Entendemos como características de origen interno, aquellas que se encuentran ya en la leche a su salida de la mama. Las de origen externo, son aquellas adicionales o sobrepuestas a las que posee la leche después de su salida de la glándula; se desarrollan en la leche durante su almacenamiento y se deben a alteraciones enzimáticas, microbiológicas o químicas.

A) ORIGEN INTERNO

Las características de origen interno, propias o adquiridas en la leche en el interior de la glándula mamaria, le son comunicadas por vía sanguínea.

La sangre, en su recorrido por el organismo se convierte en el agente conductor de sustancias comunicadoras de olor, color y sabor a la leche, de origen alimenticio o químico, en su paso por las vías digestiva y respiratoria principalmente. Los gases eructados que pueden dar lugar a sabores extraños de origen interno a la leche, utilizan también, en última instancia, la vía respiratoria o digestiva para llegar a la sangre y de ahí al tejido secretor de la glándula.

La mayoría de estas características extrañas procedentes de la vía digestiva o respiratoria acaban por ser excretadas o exhaladas, siempre y cuando medie el tiempo necesario, por inversión de las dos rutas, pues la concentración de los aromas extraños en la leche depende de la que alcanzan en la sangre, que a su vez depende de la suministrada a los pulmones o al rumen de las vacas.

Al disminuir la cantidad que va en la sangre, la concentración de ésta llega a ser inferior a la alcanzada en la leche y el aroma difunde de la leche a la sangre. (51)

a) "Normal"

Las características organolépticas propias de la leche se emplean muchas veces como parte de la definición del producto:

La leche es un líquido blanco, opaco, dos veces más viscoso que el agua, de sabor ligeramente azucarado y de olor poco acentuado. (89)

Color. La leche es un líquido opalescente que parece blanco si el espesor es suficiente. Este aspecto característico resulta principalmente de la dispersión de la luz por las micelas de fosfocaseinato de cal. (1)

Pigmentos. La leche contiene dos pigmentos:

- . El caroteno, colorante amarillo (que se ubica en el inciso 2.3: Materia grasa), colorea la fase grasa; por ello la leche entera rica en grasa presenta una ligera coloración amarilla, cuando los forrajes que ingiere la vaca contienen el pigmento en cantidad considerable.

La ausencia de este pigmento en la leche desnatada la hace aparecer de un tono blanco-azulado. (1)

- . La riboflavina, pigmento amarillo-verdoso fluorescente, que no se pone de manifiesto más que en el lactosuero. (1) (Ver: 3.1.9.1.3)

La leche cruda de buena calidad es un líquido con un ligero sabor característico debido a compuestos de bajo peso molecular, tales como la acetona, el acetaldehído, el sulfuro de metilo, trazas de ácidos grasos C₄ - C₁₀, metilcetonas y lactonas (...). La ligera dulzura de la leche normal se

debe a un equilibrio entre el sabor dulce de la lactosa y el sabor salado del cloro. (51) No hay que olvidar componentes menores de sabor fuerte como la lecitina; (1) individualmente muchos de los aminoácidos que forman las proteínas tienen sabor amargo. (13) Las proteínas son insípidas; sin embargo, su papel es importante, ya que forman una masa que atenúa y equilibra los sabores. (1)

La leche recién ordeñada tiene un olor especial que desaparece rápidamente en el curso de las manipulaciones. (1) Para Schmidt, (51) la leche de buena calidad carece de olor o, si lo tiene, es muy suave y evoca "una sensación bucal suave y rica".

b) Por sustancias de origen alimenticio

Se pueden detectar sabores y olores a alimentos o plantas inmediatamente después del ordeño. (84) Los olores del pienso y el ambiente pasan del aire a los pulmones de la vaca y son captados por la sangre y transportados a las células epiteliales de la mama, de donde difunden a la leche. (51)

Los olores que llegan por vía digestiva son absorbidos por la sangre en el tracto digestivo e igualmente transmitidos a la leche. Otras veces son consecuencia de que la digestión parcial de los alimentos en el rumen produce sustancias volátiles que son eructadas, inhaladas por los pulmones y transferidas primero a la sangre y luego a la leche. (51)

Sabores procedentes de la alimentación aparecen en el ordeño tanto más frecuentemente cuanto más reciente haya sido la distribución de los alimentos; esta influencia de la alimentación se reduce o elimina cuando se distribuye el alimento varias horas antes del ordeño.

Estos defectos aparecen más a menudo cuando en la alimentación del ganado disminuye la hierba fresca o seca (heno) y aumenta la proporción de vegetales ensilados, remolacha, subproductos de las fábricas de azúcar, destilerías y cervecerías; estos alimentos, sobre todo los ensilados de calidad dudosa y las pulpas (remolacha azucarera tras la extracción) son la causa de sabores desagradables.

Dunkley (citado por 51) afirma que existen al menos 46 hierbas y 10 tipos de alimentos que confieren aromas ex-

traños a la leche si se les suministra a las vacas cinco horas antes del ordeño. Entre ellas se encuentra la ambrosía, las cebollas, los ajos, el nabo y el ensilaje. La mayor parte de los compuestos aromáticos del ensilaje pasan a la leche. El ácido butírico (componente volátil del ensilado) influye de manera secundaria en la aparición de sabor a ensilado, (35) o bien, influye marcadamente (5) o no se detecta. (14)

Las malas hierbas que dan origen a los sabores extraños deben eliminarse de la dieta de las vacas lecheras, porque la mayor parte de estos aromas extraños persisten durante más de 12 horas. (51)

La administración de harina de pescado en gran cantidad o de baja calidad, presta a la leche sabor y olor a pescado. (35)

La cantidad de alimento ingerida es también significativa: por debajo de una cierta proporción de alimentos, como la remolacha, es posible que no aparezca ningún sabor; mientras que una proporción aumentada del mismo alimento en la ración dará un sabor desagradable a la leche, (1) que se debe a la presencia de trimetilglucocola, (35) que puede encontrarse tras la administración de hojas de remolacha ensilada.

Cualquier cambio brusco en la alimentación es probable que resulte con un correspondiente cambio en el sabor de la leche. (5)

La velocidad de transmisión varía con el alimento y con su forma. Tras una distribución de alfalfa verde, aparece el sabor al cabo de una hora o dos; tras la ingestión de jugos de alfalfa como bebida, el plazo es de 30 minutos. (1) El ajo hace notar su presencia en la leche cuatro horas después de ingerido. (35)

La formación del color azul o el principio de una coloración azul que se manifiesta del todo en contacto con el aire puede ya originarse en la ubre cuando las vacas ingieren determinadas plantas en gran cantidad con el pienso (35) -no mencionamos las especies.

c) Por sustancias de origen químico o medicamento-
SO

A veces la leche adquiere olores y sabores de cier-

tos productos con olor fuerte (...) al inhalar aire impuro las vacas encerradas en establos deficientemente ventilados...; (41) puede aparecer, por ejemplo, un olor fétido en la leche. (5)

Medicamentos como el cloroformo, éter, esencia de trementina, hidrocarburos clorados (insecticidas), pesticidas ingeridos con plantas (5) y otras substancias empleadas en la lucha contra los parásitos pueden influir de manera perjudicial sobre el sabor de la leche. También la administración de productos aromáticos con mezclas de sales minerales o "brebajes" puede transmitir a la leche las esencias aromáticas. (35)

El tiempo transcurrido desde la exposición de la vaca a un aroma indeseable hasta su aparición en la leche depende de la ruta por la que penetre en la sangre. Doughert y colaboradores (14) observaron que las substancias que provocan aromas extraños en la leche se detectan más aprisa cuando se dan por vía respiratoria que cuando se administran por vía digestiva. En el primer caso, substancias como el acetato de etilo, aparecieron a los 15 minutos después de su introducción; por vía digestiva aparecieron en la leche de la mayoría de las vacas entre 30 y 60 minutos.

La coloración roja de la leche se observa también tras la administración de fenotiacina. (35)

d) Afecciones patológicas o fisiológicas
(Generales o localizadas en la glándula mamaria)

El ordeño brutal y las lesiones de la ubre originan el paso de sangre a la leche. En el ordeño brusco se desgarran pequeños vasos del parénquima, en cuyo caso en el examen microscópico de la leche aparecen glóbulos rojos. (35)

En condiciones fisiológicas se encuentra sangre en el calostro, lo que se traduce en leche roja. (35)

Fisiológicamente, la leche adopta color amarillo cuando es calostrual. (35)

Patológicamente, el color amarillo puede aparecer en la leche como consecuencia de ictericias, globopeda, carbunco y mastitis. (35)

El defecto de la leche gris se presenta cuando pasan

a la leche grandes cantidades de hierro (superiores a 5 µg/cc). (35) El aspecto grisáceo más o menos translúcido, puede deberse a una disminución de la proporción de caseína bajo la forma micelar; es el caso del calostro del primer día, así como el de la leche de fuerte retención y de algunas leches patológicas. (1)

Animales que padecen cetosis, pueden presentar el paso de cuerpos cetónicos de la sangre a la leche, (1) lo que le comunica un olor característico.

Sabor salado y/o amargo. En las enfermedades leves y en los trastornos secretores la leche presenta un sabor salado; en las mastitis avanzadas sube marcadamente la concentración de cloro y con ello un sabor salado y amargo; la leche calostrada tiene el mismo sabor. En las enfermedades generales de curso febril se modifica la composición de la leche (menos caseína y lactosa) y con ello el sabor de la leche, que recuerda al calostro. (35) Se presenta también en leches de final de lactación y ocasionalmente en vacas en las primeras etapas de lactación. (5)

Numerosas afecciones de tipo fisiológico o patológico incrementan la tasa normal de lipasa propia de la leche, esto origina posteriormente el enranciamiento de origen externo enzimático. (Ver: Hidrólisis de los lípidos; 2.3.3)

B. ORIGEN EXTERNO

a) Absorbidos o retenidos

A veces la leche adquiere olores y sabores de ciertos productos con olor fuerte, al absorberse del aire viciado (ventilación inadecuada) del lugar donde las vacas son ordeñadas o donde la leche es almacenada..., (41) porque la leche entera tiene una gran capacidad para la absorción de emanaciones diversas; (1) puede adquirir por ejemplo olor a gasolina, chapopote, etc. (89)

b) Enzimático

Sabor rancio, debido a la hidrólisis de los triglicéridos de la grasa por acción de las lipasas normalmente presentes en la leche (ver: Glóbulos grasos; 2.3.2, 2.3.3) Este trastorno de origen externo puede deberse, indirectamente

a afecciones patológicas o fisiológicas del animal que aumentan la tasa normal de la lipasa de la leche (vacas con elevado contenido de estrógenos en sangre, vacas que padecen quistes ováricos, así como en las afectadas de ninfomanía y las que se hallan en estado avanzado de gestación; 35).

El sabor a jabón tiene el mismo origen que el sabor rancio. (1)

c) Químico

Se ha descrito en la leche otro gran número de aromas y sabores extraños. Algunos se deben a productos químicos de origen ajeno a la leche, fundamentalmente contaminantes de la misma después de que ésta haya salido de la vaca. Ciertos desinfectantes y pomadas fenólicos utilizados para el tratamiento de las llagas del pezón y de las abrasiones de la ubre hacen que la leche adquiera un ligero aroma fenólico, que se intensifica en presencia de cloro, en cuyo caso se produce un aroma clorofenólico característico. (51) Otros ejemplos son el uso de yodóforos como desinfectantes y el empleo de insecticidas en spray. (5)

Aroma oxidado (metálico, a sebo, aceitoso, a cartón, a papel). Es consecuencia de la acumulación de compuestos carbonílicos producidos por autooxidación de los ácidos grasos no saturados de los fosfolípidos de la leche (ver Materia Grasa, 2.3); la oxidación de los ácidos grasos no saturados es catalizada por el cobre en presencia de un prooxidante, el ácido ascórbico -vitamina C. (51, 35, 5)

Las variaciones en la susceptibilidad a la oxidación son parcialmente dependientes de la composición de la leche y de su contenido bacteriano. (Ver: 1.4 c. y d. y Materia Grasa: caroteno, tocoferol y vitamina E). Cuando se retira a vitamina C no se produce el sabor oxidado por alta que sea la tasa de cobre presente. (35)

La manipulación de la leche en recipientes de acero inoxidable reduce mucho su exposición a catalizadores de la oxidación como el fierro y el cobre.

El sabor oxidado aparece más frecuentemente en las leches de principio de lactación. Pueden existir variaciones según la raza. (1)

La exposición de la leche a la luz solar produce

otro tipo de aroma oxidado, detectable 10 minutos después de haber sido expuesta la leche a la luz solar, (51, 5) que probablemente sea el mismo que describen Alais (1) y Lerche (35) como catálisis de las reacciones entre moléculas nitrogenadas que no constituyen reacciones clásicas de oxidación. Lo que se denomina en inglés sunlight-flavor o solar activated flavor (en español podría decirse "sabor solar"), es la consecuencia de estas reacciones. La substancia responsable es el metional formado a partir de la metionina, aminoácido que puede proceder de diversas proteínas de la leche, con intervención de la riboflavina. El sabor característico aparece con 0.1 ppm de metional.

d) Por acción microbiana

Las bacterias presentes en la leche en un momento de terminado y que provocan las alteraciones de color, olor y sabor pudieron llegar a ella por cualquiera de las vías mencionadas en el inciso 2.1.1.

Algunos de los aromas más frecuentes son de origen microbiano y son producidas por procesos fermentativos. Generalmente puede haber concentraciones microbianas muy elevadas sin que se presenten en la leche sabores extraños detectables de este origen. (51)

Entre los sabores extraños más comunes cuyo origen se encuentra en enfermedades microbianas, cabe citar el sabor ácido, que es consecuencia de la fermentación de la lactosa y su conversión en ácido láctico por diversos géneros microbianos (ver: 2.8 Acidez). En la leche en la que se ha desarrollado una ligera acidez, a veces se puede percibir un olor ácido. (91)

El sabor a malta (que puede confundirse con el sabor a cocido) se produce cuando la leucina (aminoácido) es fermentada por el Streptococcus lactis variedad maltigenes, para dar el aldehído-3-metil-butanal; este microorganismo no es termorresistente por lo que la leche pasteurizada no es susceptible de sufrir esta alteración. (1, 51, 35)

La hidrólisis de las proteínas de la leche por los microorganismos origina un sabor amargo, que resulta de un acúmulo de polipéptidos, (51) debido especialmente al Streptococcus liquefaciens (actualmente: Str. faecalis subesp. liquefaciens; 6) y a veces a levaduras como la Torula amara. Se han encontrado Actinomicetes en las leches de sabor amargo y mohoso. (1)

A veces es difícil diferenciar los sabores procedentes de acciones microbianas, de los que tienen su origen en otras causas. Los defectos de sabor de origen microbiano, no se hacen aparentes más que tras una conservación bastante larga, corrientemente de más de un día. (1)

Sabor a patata. Se debe a Pseudomona graveolens (ignorada en la 8a. edición del Manual Berguey's), germen que se desarrolla bien a temperaturas bajas. Este sabor persiste tras la pasteurización. (1)

Las bacterias coliformes se manifiestan en ocasiones por sabores desagradables difíciles de definir. (1)

Otras bacterias producen sabores aromáticos, a frutas, no desagradables; en general no son persistentes y suelen ser reemplazados por otros menos agradables. (1)

Muchos de los gases producidos por microorganismos tienen un olor característico. (91)

Sabor rancio, producido por la hidrólisis de las grasas por acción de lipasas de origen bacteriano. (Ver: Hidrólisis de los lípidos, 2.3.3) El sabor a jabón tiene el mismo origen. (1)

La actividad lipolítica y proteolítica de los gérmenes psicrófilos tratados durante la refrigeración de la leche cruda (1.6) es el origen de malos olores y sabores demostados en las leches enfriadas de calidad bacteriológica dudosa: gusto rancio, pútrido, amargo, frutal... Estos malos gustos son graves porque no desaparecen generalmente con tratamientos ulteriores de la leche cruda. (89)

Las leches coloreadas a causa de los microorganismos, son raras (a pesar de que la leche contiene corrientemente gérmenes variados cuyas colonias sobre medio sólido lo son). Se citan varios microorganismos identificados en los productos coloreados: Pseudomona cyanógenes: azul (no se encuentra catalogada en ceparios -species incertae sedis), Pseudomona synxantha: amarillo, Serratia marcescens: rojo; la coloración roja también la producen Oidium rubrum, Saccharomyces ruber, Sarcina ruber (ignorada en la 8a. edición del Manual Berguey's), Sarcina rosea (actualmente Thiosarcina rosea; 6), Bact. lactis erythrogenes (referida en J. Bacteriological 30:639-464; 6), etc.

La coloración marrón se aprecia a veces en la superficie de la leche agria, lo que obedece a la oxidación de la

tirosina por acción del Pseudomona fluorescens. (35)

Dos o más microorganismos que actúan conjuntamente pueden ser los responsables de una alteración. Si se desea, podrá comprobarse su capacidad de producir colores, sabores y olores; deberán aislarse primero en cultivo puro y después sembrarse en leche reciente y pasteurizada en el laboratorio.

2.2.3.2 Textura

Finalmente, podemos mencionar alteraciones de tipo físico que no producen cambios en el color, olor o sabor de la leche (siempre y cuando no se acompañen de algunos de los descritos anteriormente), sino en el aspecto o textura de la leche.

Textura filamentosa (viscosa), pero diferente de la leche viscosa por mastitis. Esta leche no desarrolla su aspecto sino hasta varias horas después del ordeño. Bacterias coliformes y algunos estreptococos forman una membrana gelatinosa alrededor de sus cuerpos y las gomas y mucinas de ello forman el aspecto hilado de la leche. A menos que las bacterias hayan causado fermentación ácida, el sabor es normal y puede beberse. (5)

Quajo dulce. Algunas bacterias (Bacillus subtilis, Bacillus cereus y Streptococcus liquefaciens), secretan una enzima parecida a la renina que coagula la leche sin incremento de la acidez. (5)

2.2.4 Composición de la Leche

La leche constituye un edificio químico y fisicoquímico muy complejo cuyo perfecto conocimiento es indispensable para cualquiera que desee comprender los principios de su tratamiento y de la transformación del producto. (89)

La composición promedio de un litro de leche es la siguiente: (89)

I. Constituyentes Plásticos o Energéticos	<u>Gramos</u>
Agua*.....	900-912
Extracto seco {	Materia grasa..... 35-45
Total {	Extracto { Lactosa..... 47-52
(125-130 g) {	Seco { Materias nitrogenadas. 33-36
	Magro { Materias salinas..... 9-9.5
II. Biocatalizadores (indosificables o al estado de trazas): pigmentos, enzimas, vitaminas	
III. Gases disueltos: Gas carbónico, oxígeno, nitrógeno (4 a 5% del volumen al salir de la glándula)	

La mama constituye igualmente un emuntorio, por ello se pueden encontrar también en la leche sustancias de eliminación sin valor nutritivo. (1, 51)

En la leche se distinguen tres fases: la emulsión de la materia grasa, la suspensión de caseína, ligada a las sales minerales y la solución o fase hídrica que forma el medio general continuo.

La característica esencial de la composición de la leche es su armonía, lo que hace de ella un alimento de valor nutricional inestimable... (89)

La comprensión de la composición de la leche, así como de todas las variaciones que puede experimentar, exige el conocimiento de numerosos factores tanto internos como externos al animal. Nos limitaremos a enumerar algunos de ellos, debido a que su extensa descripción está fuera del alcance de este trabajo, pero convidamos nuevamente a emprender su estudio.

Al momento de analizar la composición de la leche en el laboratorio, es pues, conveniente tener algún conocimiento de los siguientes factores que la modifican:

Especie, raza o razas productoras, heredabilidad de la composición y rendimiento lácteo durante las distintas etapas de la lactación, calostro, edad del animal y peso al parto, etapa de gestación, duración del período seco, efectos estacionales, efectos de la temperatura ambiente, enfermedades del ganado (la mastitis en especial), estado general

*El agua se encuentra como agua libre (disolvente ± 87.5%) y agua ligada (± 3.7%).

al momento del parto, plano nutritivo, niveles de grasa y proteína en la dieta, variaciones en la dieta; fracción del ordeño a que corresponde la muestra, número de ordeños al día, forma de obtención y manipulación de la muestra, etc.

Muchos de estos aspectos son netamente de carácter individual y varían de un animal a otro; sin embargo, algunos comprenden las prácticas de manejo comunes a todas las vacas y pueden repercutir en alguna forma sobre la composición de la leche del conjunto de vacas de un establo o de una misma región.

Del análisis de la composición de la leche, aun en forma individual y según las consideraciones anotadas, se desprende que no siempre resulta fácil establecer un límite entre las influencias fisiológicas y patológicas (ambas de carácter interno) que determinan la composición de la leche en un momento dado, y puede existir cierta transición en los resultados de las investigaciones.

Siempre que sea posible, la leche remitida al laboratorio debe acompañarse de un informe que ubique al analista y haga más verídico su dictamen.

Es un hecho conocido que en ciertas regiones que parecen privilegiadas, la calidad de determinados quesos es siempre superior a la de otros fabricados en distinto lugar. La calidad bacteriológica y los detalles de las técnicas de fabricación no dan una explicación suficiente a estas diferencias. La composición química es la que realmente interviene en numerosos casos; (1) pero dado el número de factores que pueden modificarla, no siempre se dispondrá de leche apta para elaborar queso (ejemplos de ello son las leches mastíticas o patológicas, la leche calostrada y la ordeñada durante los primeros 10 a 11 días después del parto; la leche del final de lactación es salina y amarga, etc.).

Otro tipo de sustancias suelen encontrarse presentes en la leche. Tal es el caso de residuos y productos químicos de los ingredientes de limpieza; contaminación por residuos de antibióticos (cuya importancia volveremos a mencionar en la elaboración de fermentos lácticos), residuos de diferentes pesticidas (organoclorados y derivados, DDT y derivados, etc.), contaminación por micotoxinas (aflatoxinas principalmente), contaminación por elementos radiactivos (principalmente yodo-131, cesio-137, estroncio-90), metales tóxicos (plomo, arsénico), etc.

2.2.5 Calidad de la Leche de Recepción

Al hablar de la calidad de la leche, debemos considerar los siguientes aspectos:

- A. La riqueza de la leche en sus diferentes componentes
- B. La calidad bacteriológica
- C. Las relaciones entre ambas

Para medir o apreciar estas calidades, pueden utilizarse diversos métodos, entre los que podemos citar: (1)

1. Las pruebas fáciles, de ejecución rápida, que solamente precisan material sencillo y productos poco costosos. Su precisión es limitada y en ciertos casos su valor es escaso por su falta de especificidad.
2. Los métodos analíticos más o menos complejos, que no pueden realizarse más que en laboratorios bien equipados y por personal preparado.

Los exámenes sistemáticos a realizar sobre gran número de muestras, precisan, naturalmente, métodos simples, rápidos y que no exijan grandes gastos.

A. La riqueza de la leche en sus diferentes componentes

Se puede admitir, desde un punto de vista general, que cuanto más rica es la leche en materias grasas, materias nitrogenadas, vitaminas, etc., mejor será la calidad química, llamada así para diferenciarla de la calidad bacteriológica. (1)

Son muchas las pruebas y determinaciones de tipo físicoquímico que pueden realizarse a la leche para conocer su composición o detectar las anomalías y adulteraciones que presente.

Hemos incluido, de acuerdo a composición, solamente la determinación de grasa por el método de Gerber y la prueba de densidad a partir de las cuales, con ayuda de fórmulas o tablas, se puede inferir la riqueza en sólidos totales de la leche problema. (Ver: 2.3.5, 2.4 y 2.5) Por lo que respecta a adulteraciones, la prueba de neutralizantes (2.6) y

el punto de congelación, (2.7) para evaluar el equilibrio que guardan los distintos componentes de la leche.

B. La calidad bacteriológica

La calidad bacteriológica está en relación directa con el número y la naturaleza de gérmenes presentes en la leche en un momento dado. (1)

La apreciación de la calidad bacteriológica se realiza por numerosos y diversos métodos. Los más precisos y significativos son aquellos que permiten el recuento de la microflora total y de los grupos microbianos más importantes, especialmente desde el punto de vista higiénico y técnico (bacterias patógenas, coliformes, termorresistentes, esporulados, productores de gas, etc.) pero son también los más delicados y los más largos; además, no pueden realizarse más que en laboratorios bien equipados y regidos por controles de salud pública. Evidentemente este sistema no se utiliza comunmente para controles de rutina de la leche de recepción.

Los métodos son directos e indirectos. Nosotros únicamente veremos la importancia de dos pruebas indirectas, basadas en el desarrollo de la flora acidificante: la determinación de acidez (inciso 2.8) y la prueba del alcohol. (2.9)

Una amplia descripción de las pruebas microbiológicas aplicadas a la leche se encuentra en libros y publicaciones especializadas (recomendamos en especial: 2, 11 y las Normas Oficiales).

C. Las relaciones entre ambas

Existen, desde luego, relaciones entre la calidad bacteriológica y la composición de la leche. La proliferación de las bacterias se acompaña de modificaciones del medio, siendo la más importante, en la práctica, la descomposición de la lactosa con formación de ácido láctico. Esta modificación es el principal factor de la reducción de la calidad técnica (...). Este aspecto es el más significativo, en general, para el industrial transformador de leche. (1)

2.3 MATERIA GRASA DE LA LECHE

La grasa de la leche, como todas las grasas ordinarias, es insoluble en agua, poco soluble en alcohol y muy so

luble en los disolventes orgánicos, éter ordinario, éter de petróleo, benceno, acetona, etc.

La grasa de la leche o grasa butírica es uno de los principales componentes, pero su contenido porcentual en la leche está sujeto a múltiples factores externos e internos del animal; podemos citar entre ellos, la raza de ganado, herencia, salud y edad de los animales, tipo de alimentación recibida, periodo de lactancia y de gestación, frecuencia de la ordeña, intervalo entre ordeños, primeras o últimas porciones de la leche ordeñada, clima, etc. Entre los factores más importantes cabe señalar la raza y el volumen de producción, puesto que a mayor producción de leche, menor es la riqueza grasa y viceversa, (44, 51) de ahí que sea importante tener en cuenta algunos de los factores relacionados con el aumento de la producción de leche (peso, edad, temperatura ambiente templada o fría, buen estado de carnes al llegar al parto, plano nutritivo, etc.) y los factores que tienden a descender el rendimiento lácteo (fase tardía de lactación, gestación avanzada, periodos secos cortos, temperatura y humedad ambiente altos, enfermedades que afectan a la ubre o al consumo de alimentos, descenso del plano nutritivo, etc.).

La materia grasa se altera más lentamente que la lactosa; sus modificaciones no provocan grandes cambios en la estructura fisicoquímica de la leche, pero son importantes por ser causa de la aparición sabores desagradables. (1)
(Ver: 2.2.3.1, B incisos b y d; 2.3.3)

Desde el punto de vista energético, la materia grasa de la leche de vaca es su componente más importante; ella sola constituye la mitad del poder calorífico de la leche. (1) Cada gramo de grasa de leche contribuye con unas 9 Kcal de energía térmica al valor nutritivo de la leche o los productos lácteos. (91)

La grasa de la leche contribuye al aroma del queso, aumenta el rendimiento quesero y mejora su consistencia.
(...13)

La materia grasa de la leche se encuentra en emulsión bajo la forma de pequeños glóbulos que estudiaremos más adelante; la composición de éstos tanto en el interior como en su exterior (membrana envolvente), comprende muchos tipos de substancias, algunas de las cuales describiremos primero bajo la división de la materia grasa en fracciones saponificable e insaponificable (ver tabla I).

2.3.1 Fracciones Saponificable e Insaponificable de la Grasa

Sometamos la materia grasa a la acción de una base (NaOH, KOH, NH₃OH, etc.) en ebullición. Diluyamos con un volumen de agua igual al de la solución obtenida y agreguemos un solvente orgánico no miscible en agua, como el éter de petróleo.

Una fracción de la materia grasa quedará en la solución hidroalcohólica (jabón): son las sustancias saponificables, solubles en agua e insolubles en los solventes de las grasas. Constituyen el 99% de la materia grasa.

Otra fracción se disolverá en la fase etérea; no reacciona con la base adicionada y no da jabones, por lo tanto, es insoluble en agua en medio alcalino. Son las sustancias insaponificables asociadas a la materia grasa y sólo contribuyen con el 1%.

A. FRACCION SAPONIFICABLE

2.3.1.1 Lípidos

Existen diversas clases y subclases de lípidos, cuya estructura química varía mucho en complejidad atendiendo a la función que desempeñen.

Los lípidos de la leche que describiremos aquí están comprendidos en la clasificación SIMPLES y COMPLEJOS. En los lípidos simples intervienen únicamente los elementos carbono, hidrógeno y oxígeno, mientras que en los compuestos o complejos encontramos, además de los elementos anteriores, nitrógeno, fósforo o azufre.

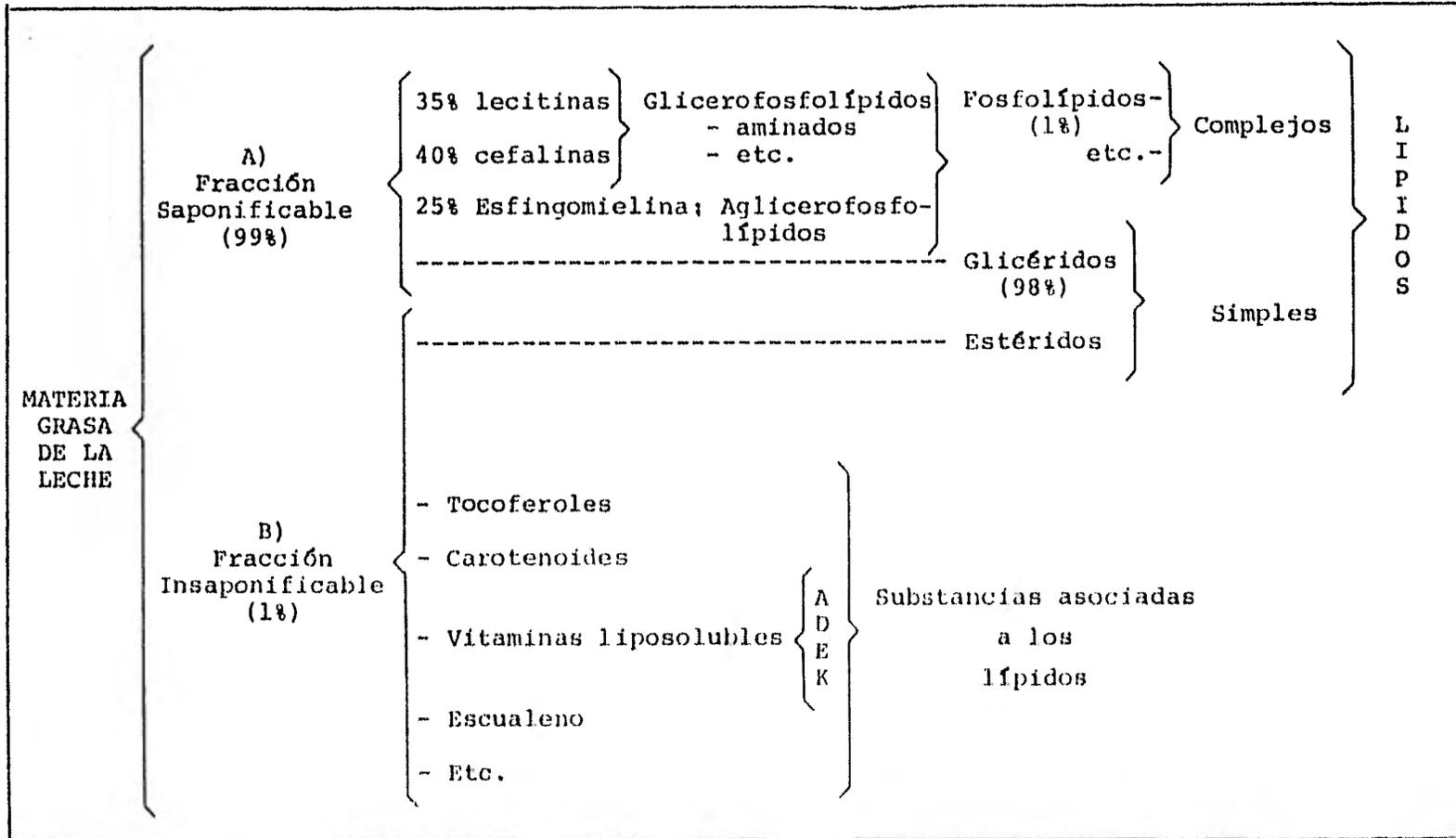
Los lípidos representan el 99% de la materia grasa (fracción saponificable). El 1% restante corresponde a la denominación insaponificable.

La composición media de los lípidos contenidos en un litro de leche, en % de los lípidos totales es la siguiente: (89)

- Lípidos simples (Glicéridos y Estéridos)..... 99-99.5%
- Lípidos complejos (Lecitinas y Cefalinas)..... 1- 0.5%

TABLA I

FRACCIONES DE LA MATERIA GRASA DE LA LECHE



2.3.1.2 Lípidos Simples

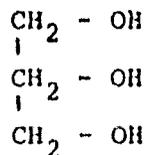
Son ésteres de ácidos grasos y alcohol. Se les llama glicéridos cuando el alcohol es el glicerol y estéridos cuando se trata de un esteroide.

Los glicéridos constituyen casi la totalidad de los lípidos simples de la leche. Los estéridos no intervienen más que de 0.1 a 0.17 g/litro; (89) por estar comprendidos en la fracción insaponificable, se tratarán más adelante.

Precisemos que casi todos los glicéridos son triglicéridos porque, en la naturaleza, casi no se encuentran mono ni diglicéridos. Cuando estos existen, resultan a menudo de la hidrólisis parcial de los triglicéridos naturales. (89)

2.3.1.2.1 Estructura

Brevemente diremos que los triglicéridos son ésteres del glicerol y de ácidos grasos alifáticos (no cíclicos). Los ésteres resultan de la acción de un ácido sobre un alcohol. En este caso es un trialcohol (polialcohol que tiene tantos hidróxidos como átomos de carbono constituyen su molécula), llamado triita, propanotriol, glicerol o glicerina:



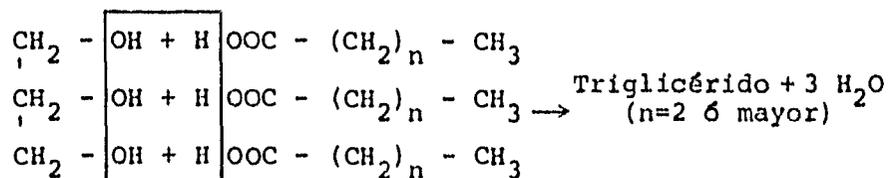
Glicerol

Los ácidos en cuestión (ácidos orgánicos por contener carbono), son los ácidos grasos monobásicos; es decir, que sólo un agrupamiento funcional (-COOH) llamado carboxilo, forma parte de la cadena carbonada. Estos ácidos pueden ser saturados, cuando entre los átomos de carbono no existen dobles ligaduras (-CH₂ - CH₂ -), o no saturados (insaturados), cuando poseen una o varias dobles ligaduras (-CH=CH-).

Los triésteres resultantes de la glicerina, son compuestos conocidos también como "grasas", glicéridos o triglicéridos, que se dividen en holo-glicéridos si las moléculas

de ácido son iguales, y hetero-glicéridos, cuando las moléculas de ácido son desiguales. (37) Son los llamados triglicéridos simples y triglicéridos mixtos (89) respectivamente.

Formación de un triglicérido:



La valoración de la grasa láctea, ha dado lugar a muchas pruebas y determinaciones con el objeto de establecer mejor su contenido en ácidos grasos volátiles, solubles, insolubles, etc. Por lo que se llegaron a establecer diferentes índices: índice de yodo, de saponificación, de Polenske, de Reichter-Meissl, de Henner, de Acetilo, de Refracción, etc.

El interés de estos índices ha perdido mucha importancia después del desarrollo de los métodos físicos de análisis que permiten, en la actualidad, determinar con precisión la proporción de los diversos ácidos grasos en la materia grasa. (89)

Actualmente, gracias a la cromatografía y a la espectofotometría se conocen alrededor de 150 ácidos grasos diferentes. Sin embargo, solamente una quincena de ellos están en cantidades notables. (89)

Los ácidos grasos saturados más comunes son los siguientes:

Nombre trivial	Número de átomos de carbono
Butírico.....	4
Caproico.....	6
Caprílico.....	8
Cáprico.....	10
Láurico.....	12
Mirístico.....	14
Palmítico.....	16
Estearico.....	18

TABLA II

COMPOSICION PORCENTUAL DE LOS TRIGLICERIDOS DE LA LECHE DE VACA

Acidos Grasos	A	B	C	D	E
Saturados:					
Butírico	10	3-4	3.5	3.6	1.4
Caproico	3	1.5-3	1.4	2.0	2.2
Caprítico	1	0.5-2	1.7	0.5	1.8
Cáprico	2	1-3.5	2.6	2.3	3.6
Láurico	3	2-5	4.5	2.5	4.0
Mirístico	9	8-11	14.6	11.1	13.0
Palmítico	21	25-29	30.2	29.0	30.2
Esteárico	11	8-13	10.5	9.2	13.7
Con más de 18 carbonos			1.6	2.4	
Total-----	60%	55-60%	70.6%	62.6%	69.9%
No Saturados:					
Decenoico			0.3	0.1	
dodecenoico		3-4	0.2	0.1	
Tetradecenoico			1.5	0.9	
Hexadecenoico			5.7	4.6	
Octadecenoico (Oleico)		30-40	18.7	26.7	27.1
Octadecadienoico (linoleico)		4-5	2.1	3.6	3.0
C20 y C22		0.5-1.5	0.9	1.4	
Total-----	40%	45-40%	29.4%	37.4%	30.1%
TOTAL	100%	100%	100%	100%	100%

A = Schmidt (51)

B = Veisseyre (89)

C = Jack et al (citado por Ramos Córdova; 44)

D = Hilditch y Jasperson (citado por Ramos Córdova; 44)

E = S. Kudzal Savoie. Citado por Alais Charles (1)

Están presentes también, aunque en muy pequeñas cantidades, los ácidos grasos saturados de número impar de átomos de carbono (de C₇ a C₂₃) formando parte de la grasa láctea junto con otros ácidos grasos saturados de cadena ramificada con uno o varios grupos metilo (CH₃).

Los ácidos grasos insaturados generalmente tienen más de 10 átomos de carbono y una o varias dobles ligaduras. (ver tabla II)

OBSERVACIONES A LA TABLA II

- Las diferencias porcentuales, algunas muy marcadas, pueden deberse a los distintos métodos de análisis.
- Los ácidos grasos saturados constituyen aproximadamente el 60% de los ácidos grasos presentes en la leche.
- Los más abundantes son los de 14, 16 y 18 carbonos, ellos solos representan cerca del 50% de la totalidad de ácidos grasos.
- El resto de los ácidos grasos saturados constituyen del 8 al 9% de los ácidos grasos, proporción claramente superior a la revelada en otras grasas animales o vegetales. (89)
- Dentro de los ácidos saturados con más de 18 átomos de carbono, figura el ácido lignocérico con 24 átomos de carbono (ver: 2.3.1.3.2)
- Los ácidos grasos insaturados constituyen alrededor del 40% de los ácidos grasos presentes en la leche.
- Dentro de los ácidos grasos insaturados de 18 átomos de carbono figuran:
 - a) El ácido oléico, que es el más importante, por representar del 30 al 35% del conjunto de ácidos grasos (tiene una doble ligadura entre los átomos de carbono 9 y 10).
 - b) El ácido linoléico, con dos dobles ligaduras en los carbonos 9-10 y 12-13.

- c) El ácido linolénico, con tres dobles ligaduras en los carbonos 9-10, 12-13 y 15-16.
- Dentro de los ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono, figura el ácido araquidónico con cuatro dobles ligaduras en los carbonos 5-6, 8-9, 11-12 y 14-15.
 - Los ácidos grasos insaturados tienen actividad bacteriostática. Los quesos desnatados, que no tienen esta protección, entran en putrefacción más fácilmente que los quesos grasos del mismo tipo sometidos a las mismas condiciones de conservación. (1)

Una descripción sumamente detallada de los distintos ácidos grasos presentes en la leche, así como de su estructura química y las diferentes modalidades en que se presentan puede encontrarse en el libro *Fundamentals of Dairy Chemistry* de Webb, Johnson and Alford. (92)

La grasa de la leche se diferencia de otras grasas animales, entre otras cosas, por el hecho de contener una diversidad mucho mayor de ácidos grasos y ser por ello más rica en ácidos grasos insaturados.

La proporción de triglicéridos trisaturados en la grasa de la leche es de 20-30%. El resto (70-80%) está representado por glicéridos no saturados en cuya composición interviene casi siempre el ácido oléico. (89)

(...) se ha demostrado que los ácidos grasos saturados de la grasa de la leche presentan una cierta disposición por la posición central del triglicérido, (C-2) contrariamente a la que se observa en la mayoría de otras grasas, exceptuando la grasa de cerdo. (89) A este respecto, Schmidt (51) nos dice que los ácidos grasos saturados de 12 a 16 carbonos se esterifican en la posición C-2 del glicerol y los ácidos grasos C₄ y C₆ se localizan primordialmente en los átomos C-1 y C-3 (los extremos) del glicerol. El ácido estearico tiene también esta misma preferencia. Esta disposición de los ácidos grasos es importante, porque explica la diversidad en características de grasas que pueden poseer una composición similar.

2.3.1.2.2 Ácidos grasos esenciales

Los ácidos grasos linoléico y linolénico, no pueden

ser sintetizados por los mamíferos, quienes tienen que obtenerlos de fuentes vegetales; (33, 51) por esta razón se denominan ácidos grasos esenciales. (33)

Estos dos ácidos, junto con el oléico y el palmítico, forman las cuatro familias distintas de ácidos poliénoicos (poliinsaturados) que son los precursores de todos los ácidos poliénoicos hallados en los animales mamíferos. (33)

El ácido araquidónico es el derivado más importante del ácido linoléico. (33, 9) No obstante esta transformación que se realiza fácilmente en el organismo, hay quienes (16) llaman al ácido linoléico semiesencial y al ácido araquidónico esencial, por ser precursor de prostaglandinas (substancias que influyen en muchas funciones del organismo). Por otro lado, el ácido linoléico tiene un efecto negativo porque retarda la transformación de ácido araquidónico en prostaglandinas. (16)

2.3.1.3 Lípidos Complejos

De la gran cantidad de lípidos compuestos que existen, la leche posee algunos de los clasificados como fosfolípidos. Para su estudio se han dividido en Glicerofosfolípidos, que pueden ser aminados y no-aminados y en Aglicerofosfolípidos. (37)

2.3.1.3.1 Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos aminados se llaman también "glicerofosfoaminolípidos". Las lecitinas y cefalinas de la leche representan a este grupo:

Lecitinas o fosfatidilcolinas, constituyen el 35% de los fosfolípidos de la leche; (89, 1) están formados por la unión del glicerol, en el que se esterifican dos ácidos grasos y una molécula de ácido fosfórico; unida a ésta, una base nitrogenada: la colina (trimetil-etanol-amina).

Los ácidos grasos pueden ser: estéarico, palmítico, linoléico, araquidónico o el oléico. (37)

En razón de la presencia simultánea en el seno de la molécula, de cadenas grasas por un lado (ácidos grasos) y de las funciones ácido fosfórico y amonio cuaternario por otro

lado, las lecitinas son a la vez lipófilas e hidrófilas (afinidad por los lípidos y el agua respectivamente). Esta doble afinidad o anfifilia explica las propiedades emulsionantes de estas sustancias cuyo papel es fundamental para asegurar la estabilidad de la emulsión de los triglicéridos en la fase acuosa de la leche. (89) La lecitina es un excelente agente emulsionante. (1) Por otro lado, la anfifilia confiere también por consecuencia a las lecitinas, propiedades tensodepresivas. Es su presencia que explica, en gran medida, la formación de espuma en la leche agitada. (89)

Cefalinas, o fosfatidil-etanol-aminas, constituyen el 40% de los fosfolípidos de la leche. (89, 1) Se forman, al igual que los anteriores, por un alcohol: el glicerol, al cual se esterifican dos moléculas de ácidos grasos y una molécula de ácido fosfórico a la que se une también una base nitrogenada, pero en este caso se trata de la colamina (etanolamina).

Los ácidos grasos, de preferencia no saturados, pueden ser el oléico, el linoléico y el araquidónico. (37)

2.3.1.3.2 Aglicerofosfolípidos

Los aglicerofosfolípidos de la leche están representados por la esfingomielina, que constituye el porcentaje restante (25%) de los fosfolípidos de la leche.

Está formada por un alcohol, que como su clasificación lo indica, no es el glicerol, sino la esfingosina (un amino-alcohol) al que se une el ácido graso saturado lignocérico (C-24) en su parte aminada y en su función alcohol se esterifica una molécula de ácido fosfórico. La base nitrogenada que se une al radical fosfato es la colina (trimetil-etanolamina).

El papel de las lecitinas, cefalinas y esfingomielinas en la leche es importante en razón de la naturaleza de los ácidos grasos que ahí se encuentran. En efecto, los ácidos grasos poliinsaturados están mucho mejor representados en los fosfoaminolípidos que en los triglicéridos. De ello resulta una sensibilidad particular a la oxidación que hace que los fosfoaminolípidos sean los primeros constituyentes de la materia grasa en ser afectados por la alteración oxidativa. (89)

B. FRACCION INSAPONIFICABLE

2.3.1.4 Esteroles

Aunque lípidos simples, corresponden a la fracción que ahora nos ocupa.

Dentro de este grupo, se comprenden los esteroles, alcohólos policíclicos complejos, que se encuentran en la materia grasa de la leche bajo dos formas ponderablemente innegables: (89)

- a) Esteroles libres. Los esteroles libres representan aproximadamente 0.1 g por litro de leche, es decir, 0.3 a 0.4% del peso de la materia grasa. (89, 1)

El principal representante de los esteroles es el Colesterol o Colesterina. (37) Se mezcla con los glicéridos y los fosfolípidos y confiere a las mezclas de lípidos la propiedad de absorber agua. (33)

El colesterol interviene en la materia grasa bajo la forma de solución; en la constitución de la membrana (ver 2.3.2.2) y en la formación de complejos con las proteínas en la fase no grasa de la leche; el colesterol contribuye a mantener la estabilidad de la emulsión de la materia grasa, (89) probablemente por estar asociado a la lecitina, regulando su poder hidrofílico. (1) El colesterol tiene un efecto inhibitor sobre la acción de las lipasas. (1)

El Ergosterol, compuesto muy semejante al anterior, presente en muy pequeña cantidad, precursor de la vitamina D₂ o Calciferol cuando se somete a radiaciones ultravioleta.

7-Dehidrocolesterol. Esterol también muy semejante a los anteriores y precursor de la vitamina D₃ cuando se le somete a radiaciones ultravioleta.

- b) Estéridos. Los estéridos de la leche están representados esencialmente por los colestéridos, ésteres de ácidos grasos y del colesterol (alcohol tetracíclico C₂₇H₄₅OH). Se encuentran en muy pe-

queñas cantidades (0.1 a 0.17 g/l) mientras que en plasma sanguíneo constituyen el 80% de los lípidos totales. (89)

En libros generales de bioquímica, fisiología, nutrición, etc. se encuentran mayores detalles acerca de la configuración química y las conversiones de estas sustancias.

2.3.1.5 Tocoferoles

Estos compuestos contienen un sistema aromático portador de un grupo hidroxilo y una cadena lateral isoprenoide, los más abundantes son el alfa, beta y gammatocoferoles. (33) El alfatocoferol se identifica como la vitamina E.

Los tocoferoles presentan una propiedad química muy notable: su sensibilidad frente al oxígeno y a los oxidantes, especialmente en presencia de luz. Esta sensibilidad explica su papel de antioxidantes naturales. (89)

Conjuntamente con los fosfoaminolípidos impiden el ataque destructor, no enzimático, del oxígeno molecular sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos y carotenos (protección de la grasa contra la alteración oxidativa).

Su contenido en la leche parece ser muy variable, de 0.2 a 1.2 mg por litro. (1)

2.3.1.6 Carotenoides

Coloración de la grasa. La fase grasa se encuentra coloreada por el caroteno; éste es un colorante amarillo que existe en la leche bajo dos formas: los isómeros alfa y beta; su fórmula se caracteriza por una cadena que tiene por unidad el isopreno.

La importancia del colorante de la grasa láctea reside en que es el precursor de la vitamina A, en la que se convierte por hidrólisis en el organismo, con escisión de dos moléculas y fijación de agua. El caroteno beta, en razón de su simetría, da dos moléculas de vitamina A, en tanto que el isómero alfa sólo proporciona una molécula por la variante en su fórmula (posición del doble enlace). El beta caroteno es, con mucho, el más abundante.

La cantidad de caroteno existente en la leche depende

estrechamente de la alimentación, de aquí las amplias variaciones observadas de una estación a otra en la mayor parte de las regiones (...). Parece ser que determinadas razas son más aptas que otras para dar un nivel de caroteno más alto, tal es el caso de la raza anglo-normanda de Guernesey. (1)

Los carotenos son sustancias muy insaturadas, lo que explica su tendencia a oxidarse. (89)

En el curso de la oxidación de las grasas, el caroteno se transforma en un derivado incoloro. La materia grasa se blanquea. (1)

2.3.1.7 Vitaminas Liposolubles

Una cosa son los precursores de las vitaminas (provitaminas) y otra las vitaminas de la leche, especialmente en lo que se refiere a su actividad biológica.

Las vitaminas liposolubles, además de ser insolubles en agua pero extraíbles con disolventes orgánicos, poseen un segundo denominador común: todas derivan, en último término, de unidades isoprenoides. La estructura isoprenoide es muy aparente en las vitaminas A, E y K, pues fácilmente se observa que están constituidas por múltiples unidades de isopreno. La vitamina D, por otra parte, es un derivado esteroide, pero los esteroides también derivan de precursores isoprenoides. (33)

Vitamina A (axeroftol o retinol)

Los pigmentos amarillos (carotenos) de la hierba y los forrajes verdes, se convierten en las paredes intestinales de la vaca en vitamina A, que posteriormente pasa a la leche. Las razas difieren entre sí en cuanto a su eficiencia para convertir el caroteno en vitamina A. La vaca Guernesey, por ejemplo, es menos eficiente a este respecto que la Frisia, aporta a la leche más caroteno y menos vitamina A, por lo que el color de la leche, o de la mantquilla, no constituye una indicación fidedigna de su actividad en vitamina A. Tampoco es de valor para el hombre todo el pigmento amarillo de la leche de vaca; un 20 por ciento del mismo consiste en carotenoides inactivos (...). El contenido en vitamina A y caroteno de la leche varía mucho según la dieta de la vaca. (15).

Las vacas poseen de 7 a 16 microgramos de carotenoi-

desdes por gramo de materia grasa y de 42 a 63 microgramos de actividad vitamínica A/100 g (actividad vitamínica A: 1 micro gramo de vitamina A = 3.3 UI) (15), o bien de 500 a 3,000 UI por litro. (89)

Vitamina D

La vitamina D está constituida por un grupo de vitáme ros (nombre que reciben las formas múltiples de las vitami nas). Es el grupo de factores antirraquíticos, de los cuales, el calciferol o vitamina D₂ es el más importante (ver: estero les, 2.3.1.4).

La vaca deriva la vitamina D de su leche de dos mane ras: por la acción directa del sol sobre las substancias pre cursoras de esa vitamina que existen en su piel y también, de las pequeñas cantidades de vitamina D que encierra el heno, las cuales se forman también en éste al marchitarse por la ac ción del sol. Los forrajes verdes frescos no contienen sino vestigios de vitamina D. (15)

La leche contiene de 15 a 20 UI por litro (una unidad internacional de vitamina D: 0.025 microgramos de calciferol; 89).

Vitamina E

La leche contiene poca cantidad de vitamina E y sola mente bajo la forma de alfatocoferol con actividades antioxi dantes (ver: 2.3.1.5).

La cantidad de alfatocoferol presente en la leche guarda una estrecha relación con la presente en la dieta del animal productor; es el doble durante el verano, cuando las vacas consumen vegetales verdes, que durante el invierno. (51)

Se encuentra en cantidades de 1 a 3 microgramos/li tro. (89)

Sabor a oxidado (2.2.3). La aplicación suplementaria de vitamina E a las vacas previene este sabor; sin embargo, se requieren de 400 a 500 UI por vaca para reducir el defecto, lo que hace muy costosa esta práctica. (5) Donde la legisla ción lo permite, es más eficiente y menos costoso agregar un antioxidante a la leche.

Vitamina K

La leche es pobre en vitamina K. (51, 1, 89) A diferencia de lo que ocurre con las demás vitaminas liposolubles, el contenido en vitamina K de la leche no puede modificarse alterando sus niveles en la dieta, porque puede sintetizarse en grandes cantidades en la panza. (51)

Se encuentra en cantidades de 0.02 a 0.2 microgramos por litro. (89)

2.3.1.8 Escualeno

Es un hidrocarburo cuya presencia, siempre en pequeñas dosis en la materia grasa, parece estar en relación con el contenido relativamente importante de vitamina A. El escualeno desempeña un papel biológico particular porque constituye un intermediario en la biogénesis del colesterol. (89)

2.3.2 Glóbulos de Grasa

La grasa en la leche se encuentra emulsificada en pequeños glóbulos esféricos o ligeramente ovoides, cuyo diámetro varía, entre otros factores, según la raza de la vaca, y puede oscilar entre 0.1 y 14 micras o mayores; el 80% de ellos tiene un diámetro de 2 a 5 micras; (44) debido a su tamaño, una gota de leche puede contener hasta cien millones. En un kilogramo de leche hay alrededor de 2.6 billones de glóbulos grasos con una superficie de 190 m². (78) Por otro lado, se ha demostrado la existencia de cierta correlación entre el contenido de materia grasa de la leche y el diámetro medio de sus glóbulos grasos. El aumento de grosor de estos acompaña el aumento de riqueza en materia grasa. (89)

En la leche caliente la grasa está totalmente fundida (punto de fusión: 31 a 36°C; 89); en la leche fría se halla en gran parte en estado sólido, formando una emulsión muy fina. (13) La dispersión de glóbulos es inestable y las substancias que la componen son las más fáciles de extraer de la leche sin modificar los otros componentes. (1)

2.3.2.1 Interior de los glóbulos grasos

La parte interior del glóbulo graso está formada por

triglicéridos en el seno de los cuales se encuentran disueltos constituyentes de la fracción insaponificable. De cualquier modo no es homogénea. (89)

Los triglicéridos más insaturados, de bajo punto de fusión y líquidos a la temperatura ambiente, se encuentran al centro de los glóbulos grasos. (89)

Es de suponer que todas las sustancias que describimos anteriormente como integrantes de las fracciones saponificable e insaponificable de la grasa y que no se especifiquen como integrantes exclusivos de la membrana envolvente de los glóbulos, se encuentren dispersos en el interior de los mismos.

2.3.2.2 Membrana envolvente

Los glóbulos se encuentran recubiertos por una envoltura, membrana o película protectora muy fina, que se forma por el fenómeno de adsorción y que impide la reunión de los glóbulos grasos en una fase continua.

La estructura de la membrana es compleja y difícil de conocer dada su fragilidad. (89) Está formada por la asociación de diversas sustancias que enumeraremos brevemente:

a) Proteínas

Son proteínas diferentes de las de la fase acuosa de la leche. Su cantidad de nitrógeno es claramente menos elevada (12% en lugar de 15.6% en la caseína y proteínas solubles). Por disolución en una solución de cloruro de sodio 0.02 molar pueden separarse dos fracciones, una de las cuales, soluble, es una glicoproteína y la otra, insoluble, se relaciona a una seudoqueratina. (89) Los glicoprotéidos son proteínas de la fracción proteosa-peptona que contienen alrededor de 6% de glúcidos. (1) (Ver: Proteínas y coagulación de la leche)

b) Lípidos simples

Son triglicéridos de alto punto de fusión. (89, 1) Se caracterizan por una proporción muy elevada de ácidos grasos saturados de C₁₆ y C₁₈ (más del 75% de los ácidos totales). El ácido oléico no figura más que en 5-6% y los ácidos poliinsaturados están en muy pequeña cantidad. (89) Estos triglicéridos forman un elemento de continuidad con la fracción glicerídica, de la misma naturaleza de la que entra a formar parte de la membrana. (89)

c) Lípidos complejos

Se trata de los fosfolípidos descritos anteriormente. El 60% de las lecitinas y cefalinas de la leche se encuentran fijadas sobre la membrana de superficie de los glóbulos grasos. (89)

d) Materias insaponificables

Se trata de los carotenos, vitaminas A, E y el colesterol.

e) Metales

Una notable parte del hierro y el cobre de la leche. (89) El cobre no es, por lo común, químicamente activo. (91)

f) Enzimas

De la gran cantidad de enzimas presentes en la leche, algunas de ellas se encuentran concentradas en la membrana:

- Reductasa aldehídica (xantina-oxidasa). Se trata de la enzima de Schärddinger. Cuando menos el 50% de esta enzima se encuentra en la membrana de los glóbulos. (89) Esta enzima, que se destruye por calentamiento a 80°C durante 10 segundos, da lugar a varias reacciones de oxidorreducción. (1)
- Fosfatasa. La leche contiene dos enzimas que hidrolizan los ésteres fosfóricos:
 - . Fosfatasa alcalina, con un máximo de actividad hacia pH 8.
 - . Fosfatasa ácida, con un máximo de actividad hacia pH 4.

Cuando menos el 30% de la fosfatasa alcalina se encuentra en la membrana de los glóbulos; (89) es la más interesante en razón de su sensibilidad al calor, que sirve de base a una prueba analítica importante. Se trata de una metaloproteína que contiene zinc (...); desaparece completamente en la leche desnatada y se concentra en la crema. (1)

La resistencia al calor de esta enzima es ligeramente superior a la de las bacterias patógenas, que pueden

existir en la leche. Por este motivo es posible efectuar el control de la pasteurización cualquiera que sea el método empleado (alta o baja) (ver: Pasteurización de la leche).

- Lipasa membranaria. (Ver: 2.3.3)

g) Vitamina B2 (riboflavina)

Esta vitamina se encuentra, ya sea libre o asociada a las proteínas y al ácido fosfórico (complejo enzimático en la superficie de los glóbulos grasos). (1)

Además de sus múltiples funciones fisiológicas, en la leche interviene en los fenómenos de oxidación que se producen, particularmente en la destrucción de la vitamina C; interviene también en la formación de sabores anormales. Es la vitamina más sensible a la acción destructora de la luz solar. (1) (Ver: 3.1.9.3.1. D)

h) Aglutininas

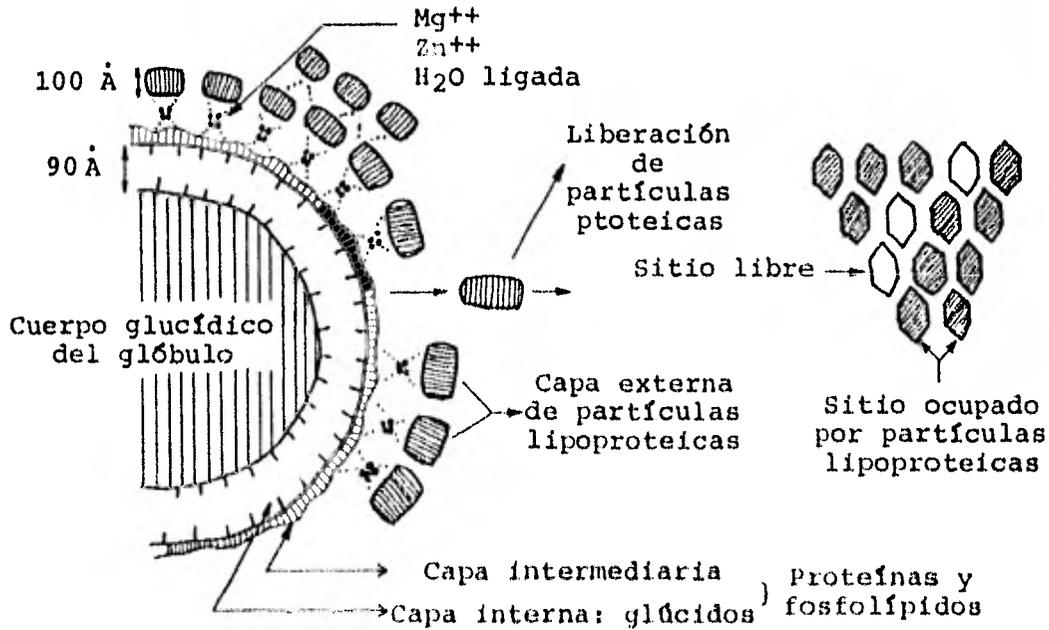
La integridad de la estructura de los glóbulos regula la estabilidad de la materia grasa de la leche. En particular, toda alteración de la membrana resultante de la acción directa de algunos microorganismos, del desarrollo de la acidez, o bien, por acciones físicas brutales, favorecen el acercamiento y la soldadura de los glóbulos. En este aspecto deben distinguirse dos tipos de agrupación: (89)

Puede haber una simple yuxtaposición; los glóbulos forman "aglomerados" (clustering) que ascienden mucho más aprisa a la superficie de la leche que los glóbulos aislados. Es a este tipo de agrupación que se debe el ascenso normal de la crema (ver: 3.2.4.2). Los factores que aceleran esta unión son las aglutininas superficiales de los glóbulos (globulinas), y la acidificación de la leche, que provoca la neutralización parcial de las cargas eléctricas de las proteínas de la membrana.

Dentro del segundo tipo de agrupación, la membrana se rompe y el glóbulo pierde su individualidad. El agrupamiento de glóbulos (clumping) resulta irreversible, hay desestabilización de la emulsión. El fenómeno puede producirse por enfriamiento enérgico. Algunos glicéridos cristalizan y la parte central de los glóbulos se retracta provocando la ruptura de la membrana. Los glicéridos de bajo punto de fusión, permanecen líquidos, exudan; y los glóbulos más o menos alterados se aglomeran en pequeños gránulos.

Algunos gérmenes microbianos, Bacillus cereus y Bacillus mycoides especialmente, pueden también desestabilizar la emulsión. Secretan una lecitinasa que hidroliza la lecitina de la membrana globular y provoca de este modo la agregación de los glóbulos grasos. (89)

Todos estos constituyentes se encuentran asociados a la superficie de las membranas formando varias capas dispuestas de tal manera que los grupos hidrófilos son orientados hacia la fase acuosa y los grupos hidrófobos hacia la fase lipídica. (89) De este modo, la sección diametral de un glóbulo graso se ha propuesto por diferentes autores. Reproducimos un esquema de Morton-Hyashi, (citado por 89) por parecernos uno de los más completos:



La superficie de la película posee carga eléctrica. Por eso pueden emigrar los glóbulos grasos en el seno de un campo eléctrico. (78) Un estudio más detallado de esta membrana es importante si se desea conocer la capacidad de la grasa para la producción de nata o para la elaboración de mantequilla.

A causa del equilibrio existente entre la película protectora y el plasma, la composición de la primera puede modificarse, especialmente en el curso de los cambios de temperatura que modifican el estado físico de la materia grasa.

La película normal es aquella que se forma sobre los glóbulos grasos semisólidos a las temperaturas medias. El calentamiento, que licúa la materia grasa, reduce la adsorción de materias nitrogenadas. (1)

La membrana del glóbulo de grasa es una concentración de materiales en la superficie de contacto grasa/suero, es decir, alrededor de la superficie del glóbulo de grasa. Esta concentración es el resultado de dos fuerzas: en primer lugar la tensión superficial hace que la pequeña cantidad de grasa en el glóbulo adopte la forma esférica, que es la que presenta menor área de superficie para el volumen de grasa de que se trata. En segundo lugar, las diferentes cargas eléctricas de los iones de los materiales en esa superficie de contacto, tanto dentro de la grasa cuanto dentro del suero, hacen que los materiales se acerquen unos a otros. Los materiales se congregan tanto como es posible en la superficie de contacto del glóbulo/suero. Cada lado de la superficie de contacto contribuye a una desusada concentración de materiales que actúa, en cierta forma, como una membrana, aun cuando no es un verdadero tejido. Entre otras cosas este complejo de fuerzas y materiales en la superficie de contacto grasa/suero, inhibe la tendencia de cada glóbulo para adherirse o fusionarse a otro. Actúa en parte como una cápsula gelatinosa para el glóbulo. (91)

2.3.3 Hidrólisis de los Lípidos

Los ésteres del glicerol pueden descomponerse nuevamente en glicerina y ácidos grasos de muchas formas, por ejemplo, interponiendo una molécula de agua entre cada ácido y el alcohol exactamente a la inversa de la formación de lípidos; cuando esto sucede se trata del enranciamiento de tipo hidrolítico de las grasas. Este enranciamiento puede producirse por las enzimas lipasas propias de la leche o de origen microbiano, fenómeno conocido entonces como lipólisis.

Se distinguen principalmente una lipasa mayor plasmática o lipasa de la leche "normal", asociada a la fracción caseína y una lipasa membranaria o lipasa "naturalmente activa", adsorbida preferente e irreversiblemente sobre el material superficial de los glóbulos grasos, especialmente cuando la leche está recientemente ordeñada y refrigerada. (89, 51) Este sistema lipásico parece comprender otras lipasas llamadas menores que algunos autores adjudican a isoenzimas, es decir a enzimas de estructuras muy semejantes. Pueden resultar, especialmente de una polimerización de subunidades de base de bajo peso molecular, inferior a 10,000. (89)

Todas las leches individuales contienen lipasa pero su concentración varía según los animales y el estado de lactación. Su cantidad aumenta del principio al final del periodo de lactación. (91, 35, 89, 1) La materia grasa de las leches mamíferas presenta una predisposición a la rancidez (1) y en algunas leches provenientes de vacas con alteraciones ováricas se observa una lipasa anormal (1, 89) muy activa, capaz de provocar espontánea y rápidamente el gusto a rancio. (89, 35). (Ver: 2.2.3.1 B. b.)

El modo de alimentación no es indiferente; la actividad lipásica aumenta en pastoreo y en los animales nutridos con alimentos secos, la lipasa membranaria está presente en cantidad elevada.

La acción de estas dos lipasas (plasmática y membranaria) es diferente. En la leche recientemente recolectada, es la adsorción de la lipasa "naturalmente activa" de la superficie de los glóbulos grasos quien origina la lipólisis, mientras que la otra lipasa permanece en el plasma y no interviene. (89) Para provocar su acción hay que recurrir a algunos tratamientos tales como la agitación, la homogeneización, el calentamiento (mencionados en 1.4), que lesionan la membrana de los glóbulos que protege a los triglicéridos (51, 1) y que permiten concentrar en la interfase grasa-plasma la fracción caseína que transporta la enzima.

La lipasa mayor tiene un pH óptimo de acción de 9.2. A este pH la temperatura óptima de actividad es de 37°C. (89) Debido a este pH, la acción de esta enzima se inhibe fuertemente por una acidez elevada. (1) La presencia de metales pesados y sobre todo de cobre conducen igualmente a una pérdida de actividad; otro tanto sucede con los fluoruros y cloruros (1) (cloruro de sodio y cloruro de magnesio; 89).

La lipasa plasmática es una enzima muy sensible al calor, se destruye a 63°C/8 min, (89) a 65°C/2 min, (1) 70°C/15 seg, (1) 72°C/10 seg, (89) 78°C/1 seg; (1) pero la presencia de materia grasa en la leche la protege parcialmente de la fotoinactivación.

La leche pasteurizada no suele exhibir lipólisis (a menos que se trate de lipasas termorresistentes producidas por microorganismos), porque la lipasa es inactivada por la pasteurización convencional.

La liberación de los ácidos grasos por la lipólisis, comprende los ácidos de bajo peso molecular (ácido butírico principalmente) que comunican a la leche un sabor particularmente desagradable. (51, 89) Los ácidos de cadena corta de

la leche producen un sabor amargo. Estos sabores y olores se hacen más manifiestos al templar o calentar la leche, porque estos ácidos grasos son volátiles; para el desarrollo de este aroma basta con un grado de lipólisis limitado. (51)

Las consideraciones anteriores acerca de la grasa láctea nos permiten aclarar el comportamiento de los constituyentes de la leche en refrigeración (inciso 1.6.1), al menos en cuanto a:

- Disminución de la estabilidad de la emulsión de la materia grasa

A medida que se disminuye la temperatura de la leche, se produce una cristalización escalonada de los glicéridos constituyentes de los glóbulos grasos. Los glicéridos membranarios más saturados son los primeros en cristalizar y en re-tractarse. De ahí se sigue la aparición de fisuras en la membrana de los glóbulos grasos a través de las cuales pueden pasar los glicéridos menos saturados aún líquidos, que se encuentran en el interior de los glóbulos. Esta materia grasa "libre" o "líquida" tiende a repartirse en la superficie de los glóbulos haciéndolos perder su afinidad por el agua y confiriéndoles una cierta lipofilia que es el origen de la formación de un aglomerado de glóbulos que se separan fácilmente por gravedad de la fase acuosa. Este fenómeno explica la rápida constitución de una capa espesa de crema en la leche refrigerada a 5-10°C. (89)

- Desarrollo de la lipólisis

Muy frecuentemente, las modificaciones de la fase grasa se acompañan de una lipólisis que provoca la aparición del gusto a rancio. Esta alteración es provocada por la lipasa ligada a la membrana de los glóbulos grasos. La materia grasa "libre" que recubre la superficie exterior de los glóbulos se pone en contacto con esta lipasa y favorece su acción. (89)

(...) una refrigeración muy rápida provoca una lipólisis mínima en la medida en que se reduce la salida de la materia grasa libre de los glóbulos suscitando una aglomeración brutal de todos los glicéridos. Por otro lado, es importante limitar la agitación de la leche en el momento de la refrigeración a fin de evitar la deterioración de los glóbulos. En efecto, la materia grasa líquida que se escapa de estos, se reemulsiona en la fase acuosa, fijando en la superficie de nuevos glóbulos, miscelas de caseína que forman nuevas envolturas. (89)

Numerosas bacterias tienen una actividad lipolítica elevada. Entre ellas, las bacterias psicrotomas (inciso 1.6.4) cuyas lipasas pueden ser o no termorresistentes.

La rancidez en la leche debida a las bacterias se produce a temperaturas bastante bajas (de 5 a 10°C) y corrientemente va precedida de un olor etéreo. (1)

Los ácidos grasos liberados por estas lipasas son tóxicos para las bacterias e inhiben rápidamente su desarrollo; sin embargo, ciertos microorganismos parecen asimilar estos ácidos, por lo que su acumulación se retrasa. (1)

La producción máxima de lipasa por Pseudomona fragi tiene lugar a 15°C o menor temperatura, el óptimo exacto depende de la cepa. A partir de 30°C o temperaturas mayores, la producción de lipasa es escasa o nula. La actividad máxima de esta lipasa se observa a 40°C y a pH 7.0-7.2. (89)

La lipasa de Achromobacter butyri se produce en las mejores condiciones a 21°C. La actividad máxima se observa a 37°C y a pH 7.0. (89)

Algunas bacterias lácticas (la mayoría de los estreptococos y lactobacilos), micrococos, muchos hongos y levaduras poseen enzimas lipasas.

2.3.4 Contenido Graso y Pago de la Leche

El pago de la leche a partir de la sola cantidad entregada es un sistema profundamente injusto porque no considera en absoluto el valor real del producto, que es función de su composición y de su limpieza bacteriológica. (89) El pago por cantidad es como suponer que la composición de la leche es siempre constante y su calidad bacteriológica invariable.

Lo más indicado en quesería es el pago de la leche atendiendo a su valor quesero, es decir por su contenido en proteínas que pasen a formar parte de la cuajada por coagulación por el cuajo (aproximadamente 75% de las proteínas totales de la leche), completado por otras pruebas (grasas, etc.).

En México es la grasa la que constituye uno de los principales pilares de pago para la compraventa de la leche, pues a mayor porcentaje mayor precio recibe el productor (a partir del precio oficial fijado para cada litro y con determinado porcentaje de grasa, se establece un precio por cada gramo extra o inferior al señalado).

La materia grasa se determina regularmente en la industria por un método rápido, simple y cómodo (método de Gerber), permitiendo que las ventajas de esta forma de pago continúen vigentes: promueve la selección bovina y la alimentación racional de los animales, disminuye el riesgo de fraude, en particular por descremado u ordeña incompleta.

Por otro lado, la fábrica tiene siempre interés en trabajar leches ricas porque éstas le permiten fabricar más productos. (89)

2.3.5 Determinación de la Materia Grasa. Método de Gerber

La valoración de la grasa por el método de Gerber es la técnica oficial en México. (Diario Oficial, 24 de septiembre de 1976 y 3 de abril de 1978)

Para poder separar la materia grasa de la leche, es necesario destruir el estado globular o extraer aquella por medio de un disolvente. Como se sabe, la emulsión es frágil y pueden destruirla reactivos muy diversos; los ácidos concentrados y calientes son los más empleados (...). De esta manera se logra, además de la destrucción de la membrana globular, la disolución total de la caseína y una buena separación de las dos fases. Este tratamiento enérgico puede provocar una degradación parcial de los glúcidos presentes, con formación de substancias solubles en las grasas y sus disolventes. (1)

2.3.5.1 Fundamento

El método de Gerber es un método volumétrico, en el que se disuelven los constituyentes de la leche, excepto la grasa, por el ácido sulfúrico. El alcohol isoamílico se emplea para disminuir la tensión entre la grasa y la mezcla en reacción (ácido sulfúrico-leche) y para facilitar el ascenso de los glóbulos de grasa (separación); este reactivo no aparece posteriormente en la columna de grasa que da la lectura del porcentaje en los tubos graduados.

Una vez que los constituyentes de la leche se han disuelto, se emplea una fuerza centrífuga moderada para separar los distintos componentes en el interior de los tubos. La grasa ocupará la parte superior por poseer la menor densidad (0.930).

2.3.5.2 Aparatos y equipo

- Botella estándar o butirómetro de Gerber (de 7 u 8% de grasa), con las características especificadas por la Organización Panamericana de la Salud o la APHA. (2)
- Soportes para las botellas (gradilla).
- Tapón de seguro y llave para la botella. Tapón con seguro de caucho o alguna sustancia sintética elástica, material resistente o reactivos de dimensiones estandarizadas. (...41)
- Centrífuga para butirómetros, de acuerdo con las indicaciones de la APHA.
- Dispositivo para baño maría

2.3.5.3 Materiales y reactivos

- Pipeta volumétrica de 11 ml
- Pipeta volumétrica de seguridad de 10 ml
- Pipeta de 1 ml
- Alcohol isoamílico de densidad de 0.88 a 15°C. (44) (Isobutil carbinol primario químicamente puro, limpio, claro, incoloro o casi incoloro, libre de agua, ácidos, grasa y furfural; 41)
- Acido sulfúrico (H_2SO_4) comercial, cuya densidad se ha ajustado a 1.815 - 1.820 a 15°C. Generalmente el ácido sulfúrico comercial tiene una densidad de 1.825 a 1.840. Para ajustarlo a la densidad requerida es necesario diluirlo con agua, lo cual debe hacerse con mucha precaución para evitar que el ácido se proyecte hacia afuera del recipiente, por la fuerte reacción exotérmica involucrada*. (44)

*Dilución del ácido sulfúrico:

Para rebajar la densidad del ácido sulfúrico comercial, $D = 1.840$ a $D = 1.815$ por ejemplo, la cantidad de agua a adicionar puede calcularse de la misma forma en que se procede para la estandarización grasa de la leche (ver: 3.1.2.5). Por medio del cuadrado de Pearson, por ejemplo, obtenemos las proporciones en que deben mezclarse ácido y agua:

(Continúa en la página siguiente)

2.3.5.4 Procedimiento

La muestra obtenida en leches de apariencia normal, conviene llevarlas a la temperatura de 15-20°C, antes de tomar el volumen de muestra necesario para el análisis. Las leches que por su riqueza en grasa presentan gránulos de mantequilla flotantes deben ser calentadas a 42-44°C para que los grumos se fundan, agitar y posteriormente tomar la cantidad necesaria para el análisis.

Mídanse 10 ml de H₂SO₄ a 16-21°C dentro de las botellas de prueba. Con una pipeta de 11 ml, mídase la muestra para análisis de leche debidamente preparada a no más de 24°C y elimínese cualquier gota que quede en la punta. Al

*(Continuación de la página anterior)

Acido	1.840	0.815
		1.815
Agua	1.000	<u>0.025</u>
		0.840

Si 0.840 es el 100%, 0.815 representa el 97% y 0.025 el 3%, por lo que para preparar un litro de ácido sulfúrico de la densidad deseada, a partir de un ácido con densidad 1.840, deberán agregarse 970 ml de ácido y 30 ml de agua.

Otra forma abreviada de proceder, es la siguiente:

$$\frac{1.840 - 1.815}{1.815 - 1.100} = \frac{0.025}{0.815} = 0.030 \text{ lt de agua}$$

Comprobación:

	Litros	Densidad	
Acido	1.000	x 1.840	= 1.840
Agua	<u>0.030</u>	x 1.000	= <u>0.030</u>
	1.030		1.870
		$\frac{1.870}{1.030}$	= 1.815

Técnica:

En un recipiente de aluminio o plástico se pone agua helada. Se sumerge en el agua un matraz de Erlenmeyer que contiene los mililitros de agua calculados. Se deja enfriar y luego se vacía el ácido evitando que se eleve la temperatura.

principio se debe dejar escurrir la leche en la botella lentamente para evitar cualquier reacción con el ácido; luego se deja vaciar la pipeta, se espera tres segundos completos hasta que ya no gotee, y se sopla para que no quede residuo. Se agrega entonces un mililitro de alcohol isoamílico y se coloca el tapón de seguridad hasta que quede firme. Con el lado tapado hacia arriba, tómesese la botella de prueba en la columna graduada y agítese hasta que el coágulo se disuelva completamente. Sosteniendo la botella por el cuello y la tapa, inviértase por lo menos cuatro veces para mezclar el resto del ácido en el bulbo con el contenido. (41)

Se colocará posteriormente el butirómetro en la centrífuga, balanceando el lado opuesto con otro butirómetro. Se centrifugará por 3 a 5 minutos a 1,000-1,200 revoluciones por minuto.

Se sacará el butirómetro de la centrífuga y se colocará durante no menos de 5 minutos en un baño maría a 60°C para obtener un valor exacto puesto que la escala del butirómetro está calibrada bajo la base del peso específico de la grasa a esa temperatura.

Se hará la lectura de la columna transparente de grasa, aumentando o disminuyendo la presión del tapón por medio del ajustador para realizarla lo más correctamente posible.

2.4 DENSIDAD O PESO ESPECIFICO

La densidad es una propiedad física de la materia y se define como la relación, a una temperatura dada, de la masa de una substancia a su volumen; es decir, la cantidad de masa contenida en una unidad de volumen. Tradicionalmente, sus unidades son gramos y centímetro cúbico:

$$D = \frac{\text{masa}}{\text{volumen}} \quad \frac{\text{gramos}}{\text{cm}^3}$$

La densidad que se mide en la leche es una densidad relativa, es decir, el cociente que resulta de dividir la masa de un volumen de leche, entre la masa de un volumen igual de agua, a una temperatura dada. (44) El peso específico es la razón de la masa de cualquier objeto con respecto a un volumen idéntico de agua a la misma temperatura. (26)

Hay muchos factores que pueden hacer variar la densidad, los más importantes son: la temperatura a la que se hace la lectura y la composición propia de la leche. (44) En general la densidad se mide a 15°C. A temperaturas diferentes, es necesario realizar una corrección. Existen aparatos especiales (termolactodensímetros) para esta medición, así como tablas de corrección para la temperatura. (1) Las condiciones físicas constituyen un factor importante que afecta a la lectura de la densidad tomada con el lactodensímetro. Cuando la temperatura varía en las proximidades del punto de fusión de la materia grasa, la densidad varía y no se estabiliza hasta varias horas después del cambio de temperatura, debido a la lenta modificación del estado físico de la materia grasa. Pero desde luego existe otra causa, ya que se comprueba el mismo fenómeno en la leche descremada; ésta se encuentra en las variaciones de la cantidad de agua ligada a las proteínas. Este fenómeno ha sido designado bajo el nombre de "efecto Recknagel". (1)

El volumen de la leche se modifica aproximadamente 1 en 1,000 por cada cambio de 6 a 8°C de temperatura. (91)

Una leche naturalmente baja en grasa, tendrá una densidad menor que una rica en grasa, que la tendrá más elevada, puesto que en la leche normal al aumentar la grasa, también se incrementan proporcionalmente los sólidos no grasos, y las densidades combinadas de los diferentes componentes de la leche compensan de sobra el efecto deprimente de la grasa (44) (esta última tiene una densidad de 0.930, menor a la de cualquier otro componente de la leche; por ello una leche descremada sí tiene una densidad mayor -es más pesada que la leche entera-, porque se le sustrajo la grasa, pero quedaron los sólidos no grasos).

Por medio de esta prueba se puede sospechar, aunque no afirmar categóricamente el aguado y descremado de la leche. (44)

La densidad de las leches desnatadas se eleva por encima de 1.035. (1)

La adición de agua a la leche (aguado), disminuye evidentemente su densidad. Una leche a la vez desnatada y aguada puede tener una densidad normal; por esta razón, la medida de la densidad no puede revelar el fraude por sí sola. (1)

La densidad de la leche recién ordeñada es inestable y se eleva un poco después. El aumento es del orden de 0.001 (o sea un grado de lactodensímetro). (1)

2.4.1 Aparatos y Equipo

- Termolactodensímetro de Quevenne.

2.4.2 Material

- Probeta de vidrio de 500 mililitros.

2.4.3 Procedimiento

Se llenará la probeta de 500 ml con la leche problema. Se introducirá en ella el termolactodensímetro y se le dejará flotar hasta que quede a nivel constante, evitando que se pegue a las paredes cuando se efectúe la lectura.

2.4.4 Cálculos y Resultados

Se hará la lectura tomando como base la parte superior del menisco y se anotará la temperatura que indique el termómetro del interior del pesaleche. Debido a las variaciones del clima se hará la corrección de temperatura, adicionando o restando 0.0002 por cada grado encima o por debajo de 15°C, respectivamente. Los resultados pueden expresarse en grados Quevenne, es decir, omitiendo las dos primeras cifras del valor de la densidad relativa: 1.0 por ser constantes.

2.5 SOLIDOS TOTALES

Se da este nombre a todos los componentes de la leche, excepto el agua. (44) De acuerdo con la composición promedio que consideramos en el inciso 2.2.4, corresponden a los 125-130 g de extracto seco total por litro de leche. Sus variaciones están sujetas a todos los factores enumerados en dicho inciso y en especial los factores que se mencionaron para la materia grasa: 2.3.

La determinación de sólidos totales puede hacerse de varias formas más o menos precisas:

- a) Método I, AOAC para sólidos totales. (40, 44) (Ver: 3.1.2.8)
- b) Método II (aproximado) AOAC para leche: (44)

Determine el peso específico con lactómetro de Quevenne (leyendo la parte superior del menisco); anote la temperatura y corrija la lectura a 15.5°. Calcule el porcentaje de sólidos totales aplicando la fórmula:

$$0.25 L + 1.2 G = ST$$

en donde L es la lectura corregida del lactómetro y G el porcentaje de grasa en la leche.

- c) Conocido el valor de la densidad y el porcentaje de grasa, pueden emplearse, además de la anterior, las siguientes fórmulas:

- Fórmula de Fleischmann y Roeder (citada por 78)

$$ES = 1.311 G + 2.738 \frac{100 (D - 1)}{D}$$

en donde: G = % grasa en leche; ES en %
D = densidad a 20°C en g/ml

- Fórmula citada en (48):

$$ST = \frac{\text{Lectura corregida del lactómetro}^*}{4} + (1.2 \times \% \text{grasa})$$

*A 15.5°C

- British Standard Institution (citada por 91):

$$ST = 0.25 D + 1.22 G + 0.72$$

D = 1.000 x densidad - 1 (densidad en g/ml a 20°C)
G = % grasa

- Fórmula de Richmond (91):

$$ST = 0.25 \text{ p. esp.} + 1.2 G + 0.14$$

- Fórmula de Richmond (1):

$$\% \text{ ES} = 1.2 \text{ G} + \left(\frac{1000 (D-1)}{4} + 0.14 \right) \times 10$$

- Fórmula de Fleischmann (1):

$$\% \text{ ES} = 1.2 \text{ G} + 2665 \frac{D-1}{D}$$

En las dos últimas: D = densidad a 15°
G = materia grasa/kg de leche

- Fórmula de Halenke y Moslinger (citada por 78)

$$\text{ES} = 0.25 (5 \text{ Cg} + d)$$

ES = extracto seco en %
Cg = contenido graso de la leche en %
d = grados de lactodensímetro a 20°

- Fórmula de Jacobsen (citada por 44); según este autor, la relación de grasa a sólidos no grasos (SNG) en la leche mezclada de un establo es:

$$\text{SNG} = 0.4 \text{ G} + 7.07$$

G = % grasa

de donde se sigue: $\text{SNG} = \text{SG} + \text{ST}$

- Etc.
- d) Los sólidos totales pueden obtenerse a partir de los valores de la densidad y el porcentaje graso, en tablas. En el libro de Ramos Córdoba pueden encontrarse las de Shaw y Eckles.
- e) Discos giratorios, que también se manejan con la densidad y el porcentaje graso de la leche (disco de Ackermann)
- f) Otro método, pero que requiere una balanza de humedad de rayos infrarrojos, es el Método Ramos Córdoba para sólidos totales, descrito en el libro del mismo autor o en la revista Ciencia (Mex) XII, (7-8); 197-198, 1952.

2.6 PRUEBA DE NEUTRALIZANTES (Ácido rosólido o coralina)

La práctica de adicionar conservadores químicos a la leche está rigurosamente prohibida en la mayoría de los países; primero, porque las sustancias agregadas pueden, a la larga, perturbar al organismo, después, porque esta práctica significa una solución perezosa al problema de la producción de leche limpia y sana. Debe buscarse, ante todo, la conservación de la leche por métodos higiénicos de producción y no por la adición de sustancias que no hacen, a menudo, sino enmascarar provisionalmente las alteraciones. (44)

Los conservadores químicos actúan de dos maneras: neutralizan el ácido láctico formado por acción bacteriana (conservadores alcalinos) o detienen el crecimiento microbiano (antisépticos: agua oxigenada, hipocloritos alcalinos, formal, ácido bórico y boratos, ácido salicílico y salicilatos, fluoruros, etc.).

La neutralización de la leche con alcalinos (carbonato, bicarbonato o hidróxido de sodio, carbonato y bicarbonato de amonio, etc.), es probablemente la adulteración más antigua y la más frecuentemente empleada, para encubrir la alteración del producto, por el agriado. (44, 48)

Esta práctica fraudulenta, tan extendida por todo el orbe, tiene gran importancia tanto económica como sanitaria; económica porque permite que gentes sin escrúpulos, introduzcan al mercado haciéndolas pasar como buenas, leches producidas en pésimas condiciones higiénicas y transportadas en malas condiciones de refrigeración; sanitaria, porque tratándose de leches sucias y con elevadísimos contenidos bacterianos, al neutralizarlas se enmascara esta falta; pero lo que es más grave y punible, es que se propicia el crecimiento excesivo de gérmenes nocivos, principalmente proteolíticos, los cuales al amparo de una acidez baja, proliferan enormemente, venciendo la barrera natural que representaba, la acidez producida por las bacterias ácido-lácticas normales de la leche. (44)
(Ver: 2.1.3)

La neutralización excesiva altera notablemente la composición química de la leche tratada, saponificando su grasa, hidrolizando sus proteínas o alterando sus propiedades, pues inclusive retarda la coagulación de la caseína. (44, 48) Las propiedades físicas de la leche tales como el índice crioscópico y la conductibilidad del suero, también son alteradas por la neutralización, por lo cual algunos métodos para encon

trar la adulteración, están basados en descubrir alteraciones en estas constantes. (44)

Son múltiples los métodos que existen para investigar la adición de alcalinos a la leche y entre los que mayor aceptación tienen por lo rápidos y sencillos son las pruebas coloridas que usan indicadores de pH, tales como el ácido rosólíco, rojo de fenol, etc., aunque estas pruebas no son lo suficientemente eficaces, como para poder diferenciar si el vire del color del indicador es debido a que la leche ha sido neutralizada, o si se trata simplemente de una leche patológica. (44)

2.6.1 Materiales y Reactivos

- Vaso de precipitado de 50 o 100 ml
- Alcohol etílico 65% (preparado según 2.9.3)
- Reactivo: solución alcohólica al 1% de ácido rosólíco

2.6.2 Procedimiento

A 5 ml de leche se le agrega igual cantidad de alcohol etílico de 65% y unas gotas de reactivo, se agita y se observa: coloración rosada indica la presencia de sustancias alcalinas; coloración amarilla indica leche normal.

2.7 PUNTO DE CONGELACION (Punto Crioscópico)

La leche se congela por debajo de 0°C, ya que las sustancias disueltas rebajan el punto de congelación de los disolventes puros (crioscopia).

El punto de congelación es la menos variable de las propiedades de la leche y la determinación física más exacta para poder determinar si la leche está adulterada con agua. (44, 1)

Los solutos o materiales disueltos en un líquido solvente, generalmente hacen descender el punto de congelación

del solvente. Dicho abatimiento, usualmente es proporcional a la concentración de solutos en el solvente. Referido a la leche, cuando se adiciona agua la concentración de sales disueltas en el suero se diluye. Como resultado de la dilución de la leche obtenemos progresivamente un punto de congelación cada vez más cercano al agua, (2) es decir, se produce un aumento del punto de congelación.

Las concentraciones de lactosa y cloruros en la leche, son responsables de aproximadamente el 75% de las depresiones del punto de congelación (...). La mayor variabilidad del punto de congelación se atribuye a cambios en la concentración de la fracción no-cloruro de las cenizas de la leche. (1, 44)

El fundamento de esta prueba radica en la aplicación del principio de la presión osmótica. La leche se produce a partir de la sangre y puede establecerse que si la presión osmótica de la leche no es igual que la de la sangre ha de existir al menos una interrelación definida entre ellas. Como quiera que la presión osmótica de la sangre no varía entre amplios límites, se piensa que debe ser constante en la leche. Como la presión osmótica de la leche se reduce mediante la adición de agua, la determinación de esta característica constituye un medio de indicar la presencia de agua añadida. La presión osmótica de una substancia es difícil de determinar, pero por suerte existe una relación definida entre presión osmótica de una substancia y su punto de congelación. La lactosa y sales minerales de la leche se hallan en solución verdadera y son estas substancias las que producen la presión osmótica que a su vez disminuye el punto de congelación. Si se añade agua a la leche disminuye la lactosa y las sales minerales, resultando que el punto de congelación se aproxima al del agua. (24)

Los valores del punto de congelación varían por muchos factores, internos y externos al animal, pero ninguno de ellos lo afecta tan ostensiblemente como la adición de agua a la leche. Intervienen la estación del año, la alimentación, la temperatura ambiente, raza del animal, ordeño matutino y vespertino, tiempo de ordeño, accesibilidad al agua, el agua misma y posiblemente otros factores; muchos de estos están aparentemente interrelacionados.

El punto de congelación puede también ser afectado por el tratamiento de la leche al vacío, la esterilización de la leche y por el congelamiento y manejo de muestras antes de determinar el punto de congelación. La adición de sólidos de leche disminuye marcadamente el punto de congelación. (2)

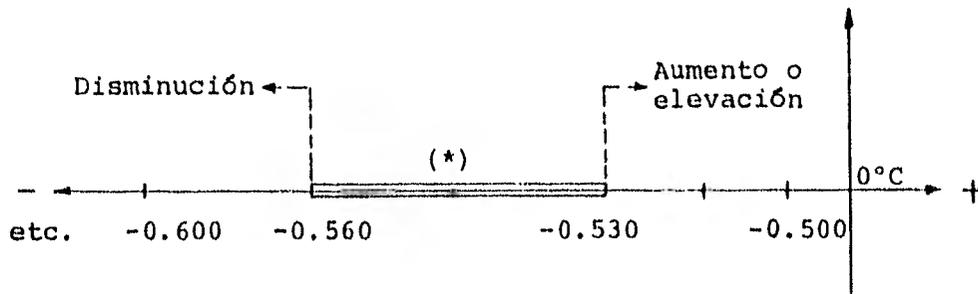
Todos los factores que alteren las proporciones de

lactosa, cloruros y demás solutos del suero, tendrán influencia sobre el punto de congelación; por las mismas causas éste tiene una correlación muy estrecha con la presión osmótica de la leche. (44)

Entre las principales causas que motivan una disminución en el punto de congelación (valores negativos que se alejan más de 0°C), tenemos adulteración con azúcares o sal, concentración de la leche, mastitis estreptocócica, fiebre carbónica, hora de la ordeña, leche con contenido alto de calostro y la acidificación de la leche (una leche suficientemente ácida para cuajar en el curso del calentamiento hasta ebullición, se congela a 0.580 ; 1)

Algunas de las principales causas que originan aumento en el punto de congelación (valores negativos que se acercan a 0°C), tenemos el aguado, dilución, disminución del contenido de lactosa (ciertos casos de tuberculosis; 44), pasteurización rápida y homogeneización, pasteurización y esterilización al vacío.

La siguiente representación gráfica nos permitirá comprender mejor:



Actualmente, la determinación del punto de congelación se realiza con crioscopos modernos provistos de termómetros de termistores que proporcionan mediciones muy sensibles y muy cercanas al punto de congelación verdadero de la leche. Estos aparatos no se encuentran todavía muy difundidos en los

*La leche debe presentar el punto de congelación entre -0.530 y -0.560 con la corrección Horvet (Reglamento para el Control Sanitario de la Leche; 82) Osmosis. Difusión de agua en relación a un gradiente de concentración; presión osmótica. Grado de presión necesaria para interrumpir completamente la ósmosis.

laboratorios lactológicos; la técnica y reactivos que describimos a continuación corresponden a un crióscopo muy antiguo (de Gerber) que dista mucho de la precisión de los actuales, sin embargo, satisface en buena medida la posibilidad de determinar un aumento o disminución grotescos del punto de congelación de la leche.

El laboratorio que cuente con un crióscopo de termistores podrá calcular con aceptable aproximación la cantidad de agua adicionada a la leche. La técnica de empleo y las fórmulas para determinar la adulteración se encuentran descritas en el libro Standard Methods for the Examination of Dairy Products de la American Public Health Association APHA. (2)

2.7.1 Aparatos y Equipo

- Crióscopo de Gerber
- Termómetro de -1.2°C a más 0.4°C

2.7.2 Reactivos

- Hielo
- Cloruro de sodio

2.7.3 Procedimiento

Se pone hielo en el crióscopo hasta la mitad de su capacidad adicionando sal suficiente para hacer bajar la columna de mercurio del termómetro.

Se agrega leche hasta la medida indicada en el tubo del crióscopo; se agita (manual o automáticamente) el hielo y la leche a la vez, hasta que baje la columna de mercurio a -0.600 , entonces se deja de agitar. Se espera el tiempo suficiente (3 a 4 minutos) hasta que vuelva a subir la columna de mercurio; donde la columna se detenga será el "punto de congelación".

2.8 ACIDEZ

Hay dos tipos de acidez en la leche: la acidez que se mide por el cuanteo de la concentración de iones hidrógeno o pH y que se determina por medio de un potenciómetro, y la acidez titulable de la que nos ocuparemos en este apartado.

La determinación del pH de la leche nunca se ha popularizado como buena prueba de andén (es decir, para juzgar en este lugar, si se recibe o no la leche porque pueda estar alterada) y la causa principal es que el valor promedio dentro del que oscilan las leches mezcladas provenientes de varias vacas es de 6.4 a 6.9. (44)

Cuando la leche se empieza a acidificar por proliferación bacteriana, puede modificar sólo su pH en 0.2 unidades y encontrarse todavía dentro de los límites de éste, pero no dentro de los aceptables de acidez titulable, (...44) por ello la acidez de titulación es más reveladora de las condiciones en que fue obtenida y manipulada la leche (ver: 1.4), y nos permite suponer indirectamente su contenido microbiano y la estabilidad de la leche frente al tratamiento térmico; una leche ácida no debe pasteurizarse porque el calor del tratamiento precipita la caseína y ocasiona trastornos en los pasteurizadores.

Una acidez valorable hasta de 0.14% o 0.16% puede ser tolerada en el abastecimiento de leche cruda. Pero los riesgos de que la leche se pueda echar a perder o se demerite su valor comercial se incrementan grandemente conforme la acidez supera a estos valores. (91) Una planta de pasteurización no debe recibir la leche a partir de que ésta alcanza 18°D de acidez.

La acidez es una de las pruebas de rutina que más aplicación práctica tiene en la industria, ya que casi todas las operaciones que se realizan con el manejo de la leche y sus derivados dependen de la cantidad de ácido presente. (44)

2.8.1 Lactosa

La acidez titulable implica forzosamente a la lactosa (glúcido o azúcar de la leche) presente en cantidades de 47 a 52 gramos por litro.

Aparte de la lactosa, la proporción de glúcidos es siempre pequeña en la leche; la leche contiene glúcidos libres dializables y glúcidos combinados con las glicoproteínas, no dializables. Desde el punto de vista químico se distinguen los glúcidos ácidos, glúcidos nitrogenados y glúcidos neutros. A estos últimos pertenece la lactosa y otros poliósidos que contienen lactosa y fucosa (sacárido no nitrogenado que contiene glucosa, galactosa y una metilpentosa); pudiéndose encontrar libres o combinados. Es posible que la lactosa y glicoproteínas sean constituyentes normales y constantes de la leche, y que los otros glúcidos representen estados intermedios del proceso de síntesis. (1)

La lactosa es el único glúcido libre que existe en cantidad importante en todas las leches; es también el componente más abundante, el más simple y el más constante en proporción. (1)

Con excepción de la leche, la lactosa es un azúcar muy raro en la naturaleza (se encuentra en algunas formas vegetales; 51)

En la leche de vaca, el contenido de lactosa varía poco. El factor más importante de variación es la infección de la mama, que reduce su secreción (ver: 2.1.4).

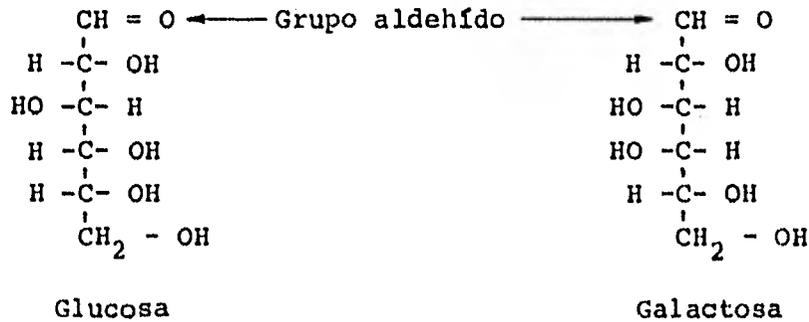
2.8.1.1 Estructura química

Brevemente, podemos decir que los glúcidos o carbohidratos son derivados aldehídicos o cetónicos producto de la primera oxidación de alcoholes polivalentes (polivalente porque la función alcohol: -OH, se repite más de dos veces en una cadena carbonada).

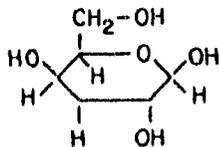
Cuando en esta cadena carbonada la oxidación (con desprendimiento de agua) se verifica en un agrupamiento alcohólico terminal (primario), se forma un grupo aldehído; si la oxidación se verifica en un agrupamiento alcohólico intermedio (secundario) se obtiene un grupo cetónico. Estos compuestos (ahora "azúcares") reciben el nombre de osas o monosacáridos por componerse de una sola molécula.

Entre los polialcoholes, aquellos que tienen tantos grupos -OH como átomos de carbono constituyen la molécula, nos interesan los hexanohexol, es decir, cadenas carbonadas de seis átomos de carbono con seis hidroxilos o grupos -OH, cuya oxidación de uno de los hidroxilos nos dará una hexosa; entre éstas, nos interesan las aldohexosas en que la oxidación se verifica en el agrupamiento alcohólico primario.

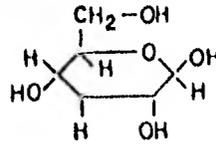
Entre estos monosacáridos (las aldohexosas), nos interesan solamente dos, en cierta disposición estructural: la glucosa y la galactosa



presentes en forma cíclica (piranosa) e investidas de ciertas características:



Glucopiranososa

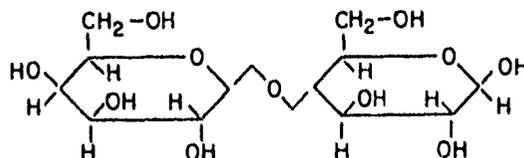


Galactopiranososa

En la sangre de la vaca se encuentra el monosacárido glucosa, las células de la glándula mamaria la toman de la circulación y mediante varias reacciones químicas (ver: 51) que tienen lugar en el citoplasma celular transforman parte de ella en galactosa.

También se forma galactosa a partir de otros fosfatos de hexosa originados de las diversas reacciones bioquímicas que tienen lugar en la síntesis de los demás compuestos de la leche o de las reacciones productoras de energía (ruta de los fosfatos de pentosa).

Una vez que los dos monosacáridos se encuentran en la célula mamaria, son unidos mediante un puente de oxígeno para formar el disacárido lactosa:



Fórmula desarrollada de la lactosa

D alfa o beta 4 (D beta-galactopiranosil)- glucopiranososa

Otras fuentes importantes del carbono de la lactosa constituyen el acetato y el lactato. (51)

La mama puede realizar también la síntesis de lactosa a partir de los ácidos grasos volátiles; este proceso se ha demostrado en los rumiantes, aunque el porcentaje de lactosa producido de esta manera es escaso, alrededor de un 10%. El origen principal de la lactosa está en la glucosa de la sangre (51) procedente directamente del plasma sanguíneo, que sin sufrir ninguna modificación, actúa como aceptor de unidades galactosilo (51) integrándose así el disacárido lactosa, en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi (55) de las células alveolares de la glándula mamaria.

La lactosa existe en dos formas: alfa y beta (que a su vez pueden ser anhidras o hidratas) guardando un equilibrio en la leche.

La lactosa es 10 veces menos soluble (1) y seis veces menos dulce (5) que el azúcar ordinario; y adiciona al valor nutritivo de la leche y productos lácteos unas 4 Kcal de energía térmica por gramo. (91)

2.8.2 Fermentación Microbiana

La fermentación precede, en la evolución biológica, a los procesos respiratorios (el término respiración se refiere a una clara oxidación de los substratos a expensas del oxígeno molecular). (10)

La respiración, cuando es completa, da sólo productos sencillos carentes de interés (CO_2 y H_2O), en tanto que las fermentaciones conducen a la formación de distintos compuestos orgánicos en grandes cantidades. Estos compuestos difieren de un organismo a otro, y en su identificación, que se inició ya antes de la era pasteuriana, fue el primer paso que se dio en el estudio del metabolismo microbiano. (10)

(El término fermentación se usa con mucha ligereza en el argot industrial para describir todo proceso catalizado por los microbios, incluso en los casos en que en dicho proceso se emplea una gran aereación...; 10)

La fermentación se define actualmente considerándola como un "proceso metabólico en el cual la energía procede de compuestos orgánicos que actúan tanto de dadores como de receptores de electrones". (10)

Toda fermentación debe mostrar un equilibrio, es decir, puesto que no existe una oxidación pura, el número de moles C, H y O debe ser el mismo en los productos resultantes que en los substratos (incluyendo el agua y una pequeña corrección debida a la asimilación como constituyentes celulares). (10)

Los procesos energéticos de la fermentación pueden estudiarse desde varios puntos de vista: termodinámico, energía de las uniones químicas y desde el punto de vista del metabolismo intermediario; nosotros nos concretaremos a mencionar aquello que respalde y explique los aspectos de índole práctica.

El aspecto tecnológico que ahora nos ocupa es la acidificación de la leche; proceso que se lleva a cabo por las bacterias presentes en la leche que utilizan la lactosa y producen ácido láctico (inciso 2.1.3); para ello, dichas bacterias deben asimilar, transportar el azúcar a su interior para fermentarlo.

2.8.2.1 Sistemas de transporte

Las bacterias contienen sistemas de transporte a través de sus membranas, para azúcares, aminoácidos, etc., determinados genéticamente.

En ciertos casos la capacidad de sintetizar un sistema específico de transporte de la membrana está latente o re-

primida, y tiene que desreprimirse por exposición de las células a un medio rico en substrato. (33) De ahí que muchas veces la aptitud de las bacterias para fermentar los diferentes azúcares, depende de la composición del medio.

Se ha comprobado que los estreptococos pueden perder la capacidad de fermentar la lactosa tras varias series de re siembra en los medios artificiales. Las enzimas necesarias para la fermentación de la lactosa por estas bacterias (beta-galactosidopermeasa y beta-galactosidasa) no forman parte probablemente del "stock" de enzimas constituyentes. (1)

La lactosa es un beta-galactósido en razón de las características de la unión de la glucosa y la galactosa (diholósido en que la beta-galactosa es el radical que se une a la glucosa (ver inciso anterior).

Las células bacterianas poseen sistemas de transporte activo de azúcares a su interior, entre ellos el sistema "permeasa del beta-galactósido". (33) La beta-galactósido-permeasa es una proteína (enzima) que provoca el paso de beta-galactósidos al interior de la célula contra un gradiente de concentración; un componente de este sistema es la llamada proteína M que existe en la membrana de las células bacterianas y que liga los grupos galactósidos por medio de un grupo -SH.

A veces la biosíntesis de los sistemas membranosos de transporte está genéticamente relacionada con la síntesis de enzimas capaces de degradar la substancia objeto del transporte o sus precursores. (33)

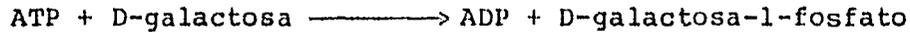
El sistema de transporte de beta-galactósidos está genéticamente relacionado con las enzimas beta-galactósido-transacetilasa y beta-galactosidasa. El último hidroliza los beta-galactósidos, incluyendo la lactosa, y libera galactosa. (33)

Otro sistema transportador de azúcar, funciona por fosforilación del azúcar al atravesar la membrana. El azúcar realmente se acumula en forma de su éster fosfórico; en esta forma, cargada eléctricamente, no puede escapar de la célula (...). El transporte activo del azúcar por este sistema es llevado a cabo por una proteína reconocedora del azúcar denominada enzima II, presente en la membrana, y por otras proteínas del citoplasma que participan en la fosforilación del azúcar y que son la enzima I y una proteína denominada HPr (...). La enzima II posee especificidad de azúcar; de hecho existe alguna evidencia en favor de que hay una enzima II distinta para cada uno de los azúcares transportados por este sistema.

Se han identificado como aceptores de fosfato en dicho sistema múltiples azúcares distintos, incluyendo la D-glucosa y varios galactósidos, la D-fructosa, pentosas, pentitales y hexitales. (33)

Una vez descompuesta la lactosa de la leche en glucosa y galactosa en el interior de la célula bacteriana, la D-galactosa es convertida en D-glucosa:

Primero sufre una fosforilación por el ATP en reacción catalizada por la enzima galactoquinasa:

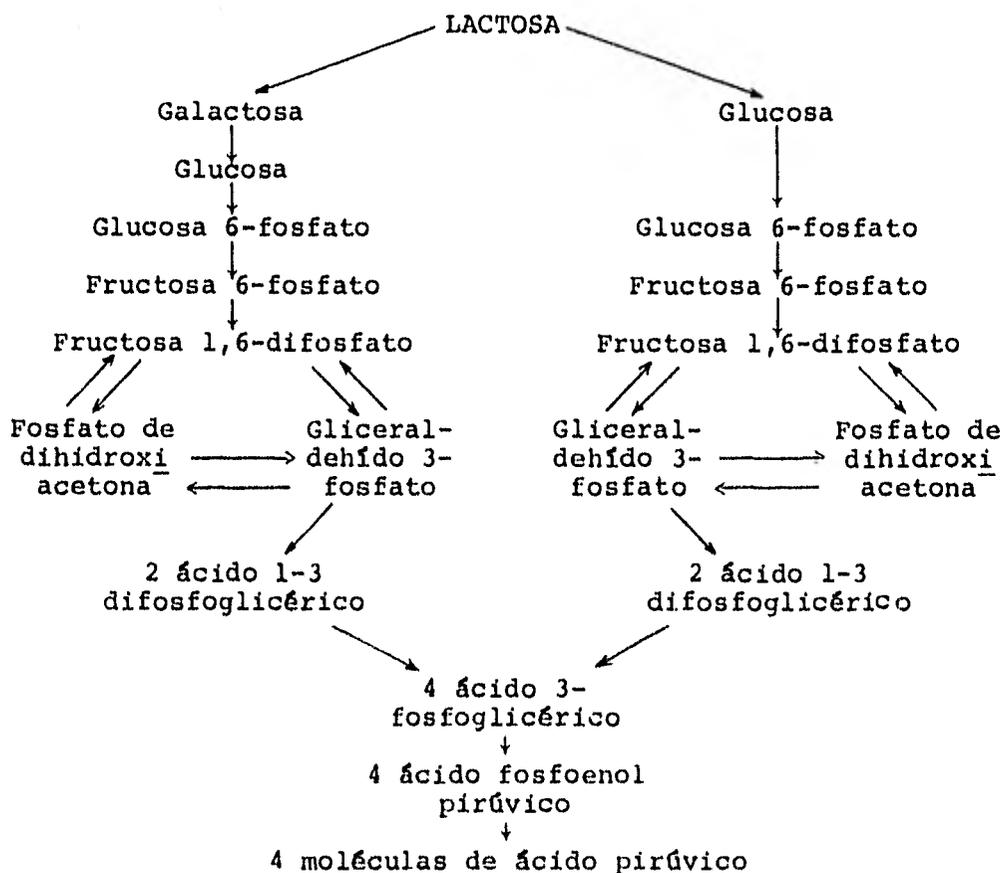


A continuación, el D-galactosa-1-fosfato se convierte en su epímero en el átomo de carbono 4, es decir, en el D-glucosa-1-fosfato, a través de una secuencia de reacciones que requieren el trifosfato de uridina (UTP) como coenzima (33) y la presencia de UDP-glucosa.

Finalmente, la glucosa debe poseer el radical fosfato (fosforilación) en el carbono seis para seguir la vía glicolítica y siguientes fermentaciones.

2.8.2.2 Vía Embden-Meyerhof (Glucólisis)

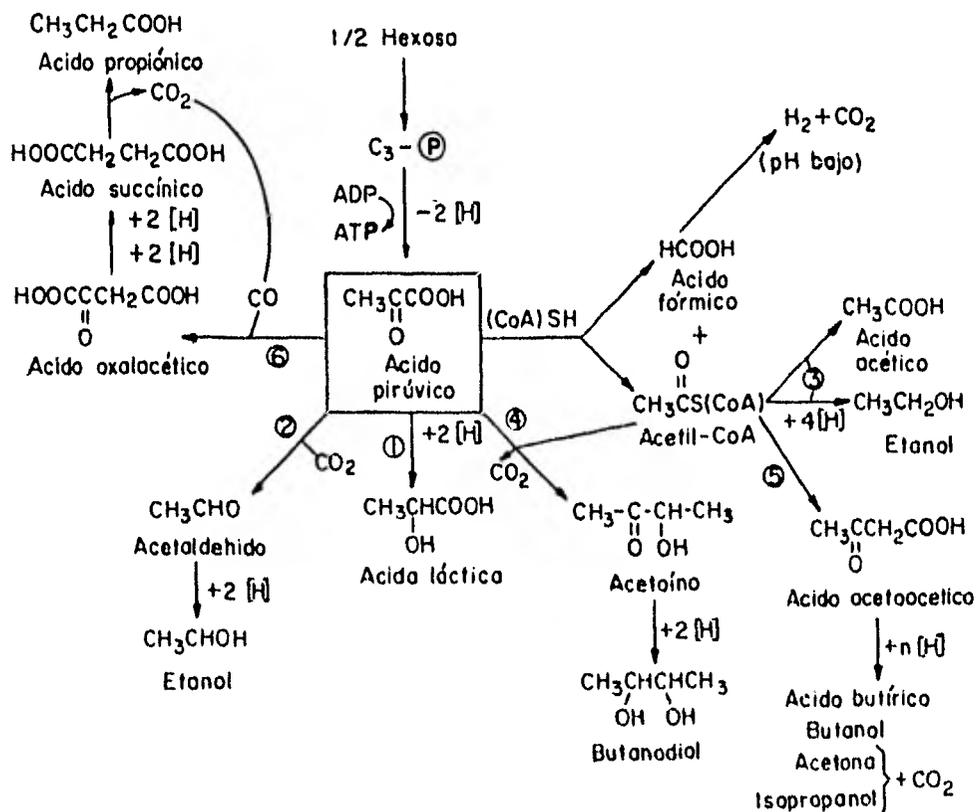
La vía de Embden-Meyerhof transcurre en ausencia de oxígeno; las diferentes etapas de que consta se llevan a cabo por numerosas enzimas y coenzimas presentes en la célula bacteriana. Por cada molécula de glucosa que sigue esta ruta se producen dos moléculas de ácido pirúvico (ver esquema) y la célula obtiene en determinadas etapas de la ruta, energía para sus procesos vitales. (Para todo lo referente al balance energético; enzimas y coenzimas participantes; fórmulas desarrolladas de los distintos metabolitos y productos terminales de esta vía como la de otros procesos de referencia, se remite al lector a la consulta de libros y manuales de bioquímica y metabolismo microbiano).



2.8.2.3 Principales fermentaciones

Una gran variedad de fermentaciones que originan diversos productos se basan en la vía metabólica de Embden-Meyerhof o formación glucolítica del piruvato.

Posteriormente, en las principales fermentaciones, el piruvato (forma ionizada del ácido pirúvico) ocupa el papel central según podemos apreciar en el esquema de la página siguiente.



Papel del piruvato en los principales tipos de fermentación: 1. Láctica (*Streptococcus*, *Lactobacillus*); 2. Alcohólica (la mayoría de las levaduras pero tan sólo algunas bacterias); 3. Ácida mixta (la mayoría de las enterobacteriáceas); 4. Butanodiol (*Aerobacter*); 5. Butírica (*Clostridium*), y 6. Propiónica (*Propionibacterium*). (Ref. 10)

Dependiendo del tipo de microorganismo será la vía fermentativa que siga; la diversidad de microorganismos que pueden crecer simultáneamente en la leche puede producir diferentes productos, incluyendo cantidades variables de los metabolitos intermedios.

Las hexosas se transforman en ácido láctico, en una proporción igual o superior al 90% por la acción de las bacterias lácticas llamadas "homofermentativas" y al 50% por las denominadas "heterofermentativas"; estas últimas forman, además, gas carbónico (alrededor del 25% del azúcar) o productos

neutros (alcohol y glicerol) y ácidos (ácido acético); (1) respectivamente se trata de la fermentación homoláctica y la heteroláctica; en esta última se siguen vías diferentes y substitutivas de la ruta glicolítica (fermentaciones fosfogluconicas), y sólo la mitad de cada molécula de glucosa se convierte en lactato.

Las vías principales, comunes a todos los grupos de microorganismos, por los cuales se forman los intermediarios claves para la biosíntesis son la vía Embden-Meyerhof, la vía oxidativa directa y el ciclo de los ácidos tricarbóxílicos. En ciertos microorganismos éstas han sido suplantadas por varias vías sui géneris, incluyendo las siguientes: vía de Entner-Doudoroff (Pseudomonas), ciclo del glioxilato, etc. (30)

Las fermentaciones se consideran en tres grupos: A. Fermentaciones basadas en el ciclo de Embden-Meyerhof. B. Fermentaciones basadas en la derivación hexosa monofosfato. C. Vías heterogéneas especiales (bifidobacterium, clostridia, fermentación metano). (30)

El papel principal de la vía glucolítica en muchas de las distintas fermentaciones ilustra la unidad biológica a un nivel molecular y refleja el principio evolucionista de la selección para el mecanismo más eficaz. (10)

2.8.3 Bacterias Lácticas

La producción elevada de ácido en los productos de la fermentación anaerobia de los azúcares, es un carácter bioquímico importante que justifica la integración, dentro de un mismo grupo, de bacterias que presentan grandes diferencias en su morfología. (1)

Las bacterias lácticas tienen numerosos "hábitats". Aparte de los productos lácteos se les encuentra en abundancia en los productos vegetales; ensilados, "choucroute" (sauerkraut o col agria), granos, jugos y mostos en fermentación, etc. Se encuentran presentes en el aparato digestivo del hombre y de los animales y en las cavidades naturales (boca, vagina). (1)

Las bacterias saprófitas que se encuentran comunmente en la leche, pertenecen al grupo de bacterias lácticas. (89)

Dos familias revisten particular interés: la familia Streptococcaceae, dentro de los cocos grampositivos, y la fa-

milia Lactobacillaceae, entre las bacterias de forma bacilar, grampositivas, no esporógenas (partes 14 y 16 respectivamente en la clasificación Berguey's 8th. Ed. 1973. (6)

Los géneros de cada familia son los siguientes:

I. Familia Streptococcaceae

Género I Streptococcus

Género II Leuconostoc

Género III Pediococcus

Género IV Aerococcus

Género V Gemella

II. Familia Lactobacillaceae, únicamente:

Género I Lactobacillus

2.8.3.1 Familia Streptococcaceae

Características generales: (6)

- Células esféricas u ovoides, en pares o cadenas de longitud variable o en tétradas (a)
- Sin motilidad o raramente móviles
- No forman endosporas (b)
- Grampositivos (c)
- Quimiorganótrofos (d)
- Metabolismo fermentativo (e); a partir de los carbohidratos forman ácido láctico, acético y fórmico y CO₂ y etanol
- Sus requerimientos nutricionales son complejos y variables
- La prueba de catalasa es variable (f)
- Bencidina negativa (g)
- Anaerobios facultativos (h)
- El contenido de DNA, G + C oscila de 33 a 44 moles % (i)

Notas Aclaratorias

- (a) Las bacterias se distinguen por su modo de multiplicación; según el caso, hay división o esporulación. Las esporas constituyen una forma muy resistente a los factores físicos y químicos, capaces, por otro lado, de alterar las formas vegetativas (calor, antisépticos, etc.; 89).

Cuando hay división simple de las células, las células hijas pueden separarse o permanecer unidas y formar agrupamientos celulares característicos: estreptococos (cadenas), estafilococos (racimo de uvas), diplococos (unión de dos cocos), tétradas (cuatro cocos formando un cuadrado), etc.

- (b) Endosporas: esporas internas; ver (a)
- (c) Por el método de coloración de Gram (violeta de genciana, lugol y alcohol etílico), las bacterias de un frotis se tiñen color violeta (Gram+) o rojo (Gram-).
- (d) Quimiorganótrofos: organismos que necesitan moléculas orgánicas complejas como dadores de electrones (por ejemplo, la glucosa). (33)
- (e) Metabolismo: es la totalidad de las reacciones químicas llevadas a cabo por las células vivientes. Por medio de estas reacciones se obtiene la energía del medio y se consume en la biosíntesis y el crecimiento, así como en actividades secundarias como la motilidad, la luminiscencia y la producción de calor. (30) Fermentación (ver: 2.8.2)
- (f) Catalasa (+ o -). Enzima bacteriana capaz de desprender el oxígeno del agua oxigenada.
- (g) Reacción de la bencidina. Pone de manifiesto la presencia de la (enzima) citocromo-oxidasa (1) y con ello la capacidad de utilizar el oxígeno molecular (células aerobias).
- (h) Anaerobios facultativos, que pueden crecer en presencia o ausencia de aire. (10)
- (i) G + C (Guanina + Citocina); bases nitrogenadas que forman parte del material genético de las bacterias (DNA) y se utiliza para medir el parentesco de distintos organismos.

Clave para identificar los géneros de la familia Streptococcaceae: (6)

- I. La glucosa es fermentada por la vía de los difosfatos de hexosa (j) produciendo principalmente ácido láctico dextrorrotatorio (k) (homofermentativos). La división celular en un plano produce pares o cadenas. Catalasa negativa.

Los dos primeros géneros de esta familia revisten especial importancia para nosotros:

Género I. Streptococcus

- II. La glucosa es fermentada por la vía hexosa monofosfato (j), produciendo ácido láctico levorrotatorio, CO₂, etanol y/o ácido acético (heterofermentativo). La división celular en un plano conduce a pares o cadenas. Catalasa negativa.

Género II. Leuconostoc

- III. La glucosa es fermentada produciendo ácido láctico inactivo (homofermentativo). La división celular en dos planos resulta en pares o tétradas. Catalasa variable.

(j) Vía metabólica de degradación de hexosa.

(k) El ácido láctico muestra actividad óptica, es decir, puede hacer girar el plano de la luz polarizada cuando se examina con un polarímetro (debido al carbono central asimétrico). La dirección de la rotación se indica por los signos (+) dextrorrotatorio; desviación a la derecha, o (-) levorrotatorio; desviación a la izquierda; a las formas ópticamente inactivas se les llama racémicas o inactivas (no cambian el plano de vibración). Generalmente se constituyen por una mezcla equimolecular de las dos anteriores.

Las letras D y L también se refieren a la estereoisomería (es decir, el diferente arreglo de los grupos de átomos en el espacio), pero en relación a la posición "gráfica derecha o izquierda" del -OH del último carbono asimétrico (que tiene diferentes radicales en todas sus valencias). Cada una (D o L), puede ser a su vez dextro- o levorrotatoria, pero en los compuestos de tres carbonos se trata del mismo carbono de la polimetría, por lo

que la mezcla equimolecular de los isómeros D y L produce también la forma ópticamente inactiva que se simboliza mediante el prefijo DL.

2.8.3.1.1 Género I. Streptococcus

Dentro de este género se encuentran 21 especies en ceparios catalogados y siete especies permanecen actualmente en incertae sedis (no catalogadas). Dos especies nos interesan especialmente:

- . Streptococcus lactis
- . Streptococcus cremoris

Ambas crecen a 10°C; no crecen a 45°C ni en caldo con 6.5% de NaCl o a pH de 9.6. Pertenecen al grupo N de la clasificación de Lancefield (reacción serológica). La primera produce amonio a partir de la arginina y la segunda no; las pruebas de tolerancia utilizadas para diferenciarlas de las demás especies y entre sí, son las siguientes:

	S. lactis	S. cremoris
Crecimiento a 10°C	Positivo	Positivo
Crecimiento a 45°C	Negativo	Negativo
Crecimiento en medios que contienen:		
Azul de metileno (0.1% en leche)	Positivo	Algunas cepas positivas; otras negativas
Cloruro de sodio (6.5%)	Negativo	Negativo
Bilis	Positivo	Positivo
Iniciación de crecimiento a pH 9.6	Negativo	Negativo
Tolerancia al calor (60°C por 30 min)	Algunas cepas positivas; otras negativas	Algunas cepas positivas; otras negativas

Aunque los estreptococos son grampositivos, los cultivos que sobrepasan la fase logarítmica de crecimiento (ver: 3.1.7.1.2) y en frotis de materiales naturales (su hábitat na

tural), pueden mostrar células gramnegativas, así como aberraciones celulares y de tinción. Los cultivos jóvenes en caldo ofrecen el mejor material para la tinción de Gram.

Streptococcus lactis

- . Células ovoides alargadas en la dirección de la cadena; diámetro de 0.5-1.0 milimicrón. La mayoría se presenta en pares o en cadenas cortas. Algunos cultivos producen cadenas largas.
- . Se conocen muchos tipos serológicos.
- . Produce ácido a partir de la glucosa, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, sucrosa, treolosa y manitol. El salicin puede o no ser fermentado. No produce ácido a partir de la rafinosa, inulina, glicerol o sorbitol.
- . No descarboxila la tirosina.
- . Algunas cepas producen el antibiótico Nisina que inhibe a muchos organismos grampositivos (ver: 3.1.7.3.3)
- . Crecen en medios que contienen 4.0 pero no 6.5% de cloruro de sodio. Puede iniciarse el crecimiento a pH 9.2, pero no a pH 9.6. Pueden ocurrir variaciones en estas últimas dos características.
- . Algunas cepas pueden metabolizar la leucina produciendo el 3-metilbutanol que produce el defecto de sabor a malta en los productos lácteos (ver: inciso 2.2.3.1, B. d)
- . La nutrición de estas especies es compleja. Generalmente, requieren para su crecimiento en medio sintético, de 4 o 5 vitaminas del grupo B, de 10 a 13 aminoácidos y acetato, oleato y ácido lipoico (lipoato).
- . Temperatura óptima, aproximadamente 30°C, algunas cepas no pueden crecer a 41°C; no hay crecimiento a 45°C.
- . Etc.

Streptococcus lactis subespecie diacetilactis

- . Esta variedad posee las mismas características que el Streptococcus lactis, excepto que es capaz de

fermentar el citrato (en conjunción con un carbohidrato fermentable) con producción de CO₂, acetoina y diacetilo.

Streptococcus cremoris

- . Células esféricas u ovoides alargadas en la dirección de la cadena; diámetro de 0.6-1.0 milimicrones (a menudo más largo que el S. lactis); forma cadenas largas, especialmente en la leche, pero en algunos cultivos predomina como pares.
- . Pertenece al grupo N de Lancefield.
- . Se conoce la existencia de muchos tipos serológicos.
- . Produce ácido a partir de la glucosa y la lactosa.
- . Puede o no fermentar la trealosa y el salicin. Raramente fermenta la maltosa, sucrosa, rafinosa o manitol. La arabinosa, xilosa, inulina, glicerol y sorbitol no son fermentadas. En presencia de un azúcar fermentable, algunas cepas degradan el citrato produciendo CO₂, ácido acético y diacetilo.
- . Algunas cepas producen también sustancias parecidas a antibióticos.
- . Las características nutricionales son estrechamente paralelas a las del S. lactis.
- . Su temperatura óptima es alrededor de 30°C. No hay crecimiento a 40°C.
- . Se diferencia de S. lactis en que éste produce amino de la arginina.
- . Generalmente crece en caldos que contienen 4% de cloruro de sodio, inicia usualmente su crecimiento en caldos ajustados a pH de 9.2.
- . Etc.

Otras especies que pueden encontrarse en la leche:

Streptococcus agalactiae

- . Productor de ácido a partir de la glucosa, maltosa, sucrosa y trealosa. La lactosa es usualmente fermentada por cepas de origen bovino (leche y tejidos de la glándula mamaria de animales que padecen mastitis)

Streptococcus acidominimus

- . Productor de ácido a partir de la glucosa, lactosa, sucrosa y generalmente de la maltosa y trealosa.

Streptococcus thermophilus

- . Células esféricas u ovoides, diámetro 0.7-0.9 micromicrones, en pares o cadenas largas.
- . Presenta preferencia por la fermentación de los disacáridos lactosa y sucrosa, lo que puede resultar en un valor de pH más bajo en comparación con la fermentación de la glucosa.
- . Productor de ácido a partir de la glucosa, fructosa, lactosa y sucrosa; no así de la trealosa, maltosa, inulina, glicerol, manitol, sorbitol o salicin y raramente de la rafinosa, xilosa o arabinosa.
- . Se requieren seis vitaminas del grupo B para su transferencia seriada en medios sintéticos.
- . Sus requerimientos no han sido completamente identificados.
- . Temperatura óptima entre 40 y 45°C. El crecimiento ocurre a los 50°C, pero no a 53°C. No crece en temperaturas inferiores a 20°C. Resistencia marcada al calor, sobrevive 65°C por 30 minutos.
- . Se reconoce fácilmente esta especie por su alta temperatura límite de crecimiento, tolerancia térmica, incapacidad para fermentar la maltosa y para crecer en medios con 2.0% de cloruro de sodio.
- . Se emplea a menudo para la fabricación de los cultivos iniciadores de yogurt y queso suizo.
- . Etc.

Streptococcus dysgalactiae

Streptococcus faecalis subespecie faecalis subespecie nov

Streptococcus faecalis subespecie liquifaciens

Streptococcus faecium

Streptococcus uberis

- . Presente en la leche cruda y tejido glandular de vacas que padecen mastitis.

2.8.3.1.2 Género II Leuconostoc

Comprende seis especies, de las cuales cinco se encuentran en la leche y productos lácteos:

Leuconostoc mesenteroides

- . Células esféricas o lenticulares, 0.5-0.7 por 0.7-1.2 milimicrones; en pares o cadenas, usualmente cortas.
- . Una nata característica de dextran se forma a partir de la sucrosa, favorecido por temperaturas de 20 a 25°C. Diferentes tipos de colonias se forman en el agar sucrosa dependiendo de las características del dextran formado. Algunas cepas, particularmente aquellas de origen lácteo, producen poco dextran.
- . La glucosa es utilizada anaeróbicamente por la ruta de las pentosas produciéndose 1 mol de ácido láctico D (-), etanol y CO₂.
- . El acetato, lactato y tartrato no se utilizan como exclusiva fuente de carbono.
- . El número de aminoácidos esenciales para el crecimiento es pequeño; únicamente la valina y el ácido glutámico se requieren para todas las cepas.
- . El rango de temperatura es de 10 a 37°C; óptimo de 20 a 30°C.
- . Etc.

Leuconostoc dextranicum

- . Células esféricas o lenticulares, 0.5-0.7 por 0.7-1.2 milimicrones; en pares o cadenas cortas.
- . El dextran formado es a partir de la sucrosa, pero no tan activamente como en la mayoría de las cepas de L. mesenteroides.

- . La ruta empleada en la utilización de los carbohidratos no se ha estudiado.
- . Los requerimientos de aminoácidos son más variados que para la especie anterior, pero solamente pocos aminoácidos afectan el crecimiento de cualquiera de ellos.
- . En rango de temperatura: 10-37°C, óptimo 20-30°C.
- . Etc.

Leuconostoc paramesenteroides

- . Células esféricas o lenticulares de 0.5-0.7 por 0.7-1.0 milicrones, en pares o cadenas.
- . No forman dextran de la sucrosa.
- . La ruta de utilización de los carbohidratos no ha sido estudiada.
- . Los requerimientos de aminoácidos son complejos y variables. Más aminoácidos influyen el crecimiento de la mayoría de estas cepas que las del L. mesenteroides.
- . Facultativos anaerobios, aunque algunas cepas prefieren condiciones reducidas de crecimiento.
- . Toleran concentraciones de cloruro de sodio más altas que otras especies.
- . Rango de temperatura: 10-37°C, óptimo 20-30°C.
- . Etc.

Leuconostoc lactis

- . Células esféricas o lenticulares, 0.5-0.7 por 0.7-1.2 milimicrones.
- . Requerimientos de aminoácidos complejos y similares a los de L. paramesenteroides.
- . Más resistentes al calor que otras especies y normalmente sobreviven a temperaturas de 10-40°C; óptimo 25-30°C.
- . Etc.

Leuconostoc cremoris (antes L. citrovorum)

- . Células esféricas o lenticulares 0.8-1.2 milimicrones; generalmente en largas cadenas en las que las células parecen estar en pares.
- . La sucrosa no es fermentada normalmente, pero "colonias mutantes", formadas en agar blando pueden formar ácido de la sucrosa.
- . El citrato es utilizado cuando un carbohidrato fermentado está presente. Se forma acetato, piruvato y CO₂; el piruvato es convertido en acetoina y diacetilo.
- . Requerimientos de aminoácidos complejos, la omisión de uno entre un gran número de ellos impide el crecimiento.
- . Anaerobios facultativos pero tiene preferencia por condiciones reducidas.
- . Rango de temperatura: 10-30°C; óptimo de 18-25°C.
- . Son las especies menos activas, caracterizadas por una limitada habilidad de fermentación y requerimiento de factores complejos para el crecimiento.
- . Etc.

2.8.3.2 Familia Lactobacillaceae

Características generales: (6)

- . Bacilos rectos o curvados, usualmente se encuentran individuales o en cadenas.
- . Inmóviles, raras cepas presentan motilidad.
- . Grampositivas.
- . Anaerobios o facultativos.
- . Requerimientos orgánicos nutricionales complejos.
- . Altamente sacaroelásticos (desdoblan la sacarosa).
- . Al menos la mitad de los productos carbonados finales del metabolismo de los carbohidratos es el lactato. El lactato no es atacado aneróticamente.
- . Catalasa negativa.
- . Reacción bencidina negativa.

- . La patogenicidad no es usual.
- . Se encuentran en productos de fermentación animal o vegetal donde hay disponibilidad de carbohidratos; también se encuentran en la boca, vagina, tracto intestinal de varios animales de sangre caliente, incluyendo al hombre.

2.8.3.2.1 Género I - Lactobacillus

Género de bacilos no esporulados, grampositivos que llegan a ser gramnegativos con el incremento de acidez y edad del cultivo; y cuyos requerimientos nutricionales son generalmente característicos para cada especie.

Comprende 27 especies de ceparios catalogados y 15 Species incertae sedis (no catalogadas). Mencionaremos y ubicaremos dentro de la familia solamente a nueve especies de interés por encontrarse en la leche y/o productos lácteos.

Clave para identificar las especies del género Lactobacillus (6) (únicamente las de interés)

- I. Homofermentativos. El ácido láctico es el producto más abundante proveniente de la glucosa (generalmente 85% o más).
 - A. Especies que no producen gas de la glucosa o el gluconato; no fermentan la ribosa, no requieren tiamina, tienen actividad aldolasa (enzima de la ruta glicolítica); el ácido láctico producido es D(-), L(-) o DL; crecen generalmente a 45°C o temperaturas mayores, casi no hay crecimiento a 20°C y no lo hay a 15°C, etc.
 1. Especies productoras de ácido láctico D(-)
 - . L. lactis
 - . L. bulgaricus
 2. Especies productoras de ácido láctico DL
 - . L. helveticus
 - B. Especies que no producen gas a partir de la glucosa. Cuando fermentan la ribosa, la producción de ácido láctico no se acompaña de gas. No requieren tiamina; tienen actividad aldolasa. Crecimiento variable a 45°C, crecimiento a 15°C, etc.

1. Especies principalmente productoras de ácido láctico L(+). Fermentan la ribosa.

- . L. casei subespecies casei,
rhamnosus y alactosus

2. Especies productoras de ácido láctico DL. Fermentan la ribosa.

- . L. plantarum
- . L. curvatus

II. Heterofermentativos. Alrededor del 50% de los productos terminales provienen de la glucosa, tales como el ácido láctico, considerables cantidades de CO₂, ácido acético y etanol. Producen manitol de la fructosa.

A. Especies productoras de gas a partir de la glucosa y gluconato. La ribosa es fermentada produciendo ácido láctico y acético, pero sin producción de gas. Requieren tiamina. Producen ácido láctico DL. La actividad aldolasa no es demostrable, etc.

1. Crecimiento a 45°C; no hay crecimiento a 15°C.

- . L. fermentum

2. Crecen a 15°C; no hay crecimiento a 45°C.

- . L. brevis
- . L. buchneri

Lactobacillus lactis

- . Bacilos, menores de 2 milimicrones de ancho; aparecen a menudo como formas alargadas, con tendencia a crecer en filamentos frecuentemente enroscados; en cultivos jóvenes y vigorosos se presentan individualmente o en pares.
- . Inmóviles.
- . Colonias normalmente rugosas, de 1-3 mm de diámetro, no pigmentadas, siendo blancas o gris pálido.
- . Por homofermentación producen ácido láctico D (-).
- . Coagulan la leche con una acidez final de aproximadamente 1.6% de ácido láctico.

- . No hay crecimiento a 15°C; crecen a 45°C e inclusive a 50-52°C; crecimiento óptimo a 40-43°C.
- . Aislados de la leche, queso y cultivos iniciadores empleados en la manufactura de quesos.

Lactobacillus bulgaricus

- . Esta especie está estrechamente relacionada con el Lactobacillus lactis, siendo morfológicamente indistinguible; produce la misma cantidad de ácido láctico D (+) en la leche, etc.
- . La única diferencia significativa es que el L. bulgaricus fermenta menos azúcares que el L. lactis. Este último podría ser una mutante o variable del primero.
- . Esta especie y algunas veces L. lactis y otros lactobacilos se encuentran a menudo juntos en leches agrias y yogurt.

Lactobacillus helveticus

- . Bacilos de 0.6-1.0 por 2.0-6.0 milimicrones, presentes individualmente o en cadenas.
- . En placas de agar, forma colonias de 2-3 mm de diámetro o menos, normalmente opacas, entre blanco y gris pálido.
- . Por homofermentación se produce ácido láctico DL. La acidez proveniente de la fructosa y manosa puede ser débil, producirse lentamente o no haberla. La trealosa es fermentada ocasionalmente.
- . Requiere un medio complejo. En la leche crece bien produciendo una alta acidez del 2% o más en ácido láctico.
- . Requiere calcio, ácido pantoténico, niacina, riboflavina, piridoxal o piridoxamina y magnesio en medios nutricionalmente definidos.
- . El Lactobacillus jugurti o Thermobacterium jugurti de Orla-Jensen, es un biotipo de esta especie que difiere únicamente en no fermentar la maltosa.
- . Etc.

Lactobacillus casei

- . Bacilos cortos o largos, generalmente menores de 1.5 milimicrones de ancho, a menudo con extremos rectangulares y tendencia a formar cadenas. Flagelos ausentes, no móviles.
- . Cuando se siembran las bacterias en agar lo suficientemente caliente para mantener su estado líquido y luego se vacía a cajas de petri, las colonias en la profundidad son lisas, en forma de lente o diamante, de color blanco o amarillo muy pálido. Y el crecimiento en caldo es de turbidez densa.
- . El sorbitol y la sorbosa son normalmente fermentados. Fermentan lentamente la maltosa y la sucrosa, aunque pueden seleccionarse algunas variantes que no lo hagan. No actúan sobre el glicógeno y el almidón.
- . Se produce ácido láctico L(+) en excedente de ácido láctico D(-), como resultado, la rotación óptica es dextrorrotatoria.
- . La ribosa se fermenta con producción de ácidos láctico y acético y sin producción de CO₂; la inducción del crecimiento con 4% gluconato es rápida y abundante; no hay producción de CO₂.
- . Requiere riboflavina, ácido fólico, pantotenato de calcio y niacina. Piridoxal o pirodoxamina se requieren o son estimulantes. No requiere tiamina, vitamina B₁₂ ni timidina.
- . Han sido aisladas de la leche, queso y productos lácteos, tres subespecies; que se diferencian entre otras cosas, por lo siguiente:

	Casei	Alactosus	Rhamnosus
Crecimiento a 45°C	Negativo	Positivo	Negativo
Fermentación de la lactosa	Negativo	Negativo	Negativo
Fermentación de la ramanosa	Positivo	Positivo	Positivo

- . Los tres crecen a 15°C y a menudo a temperaturas ba

jas como 6°C.

- . Por lo menos el 90% de las cepas de estas tres sustancias crecen a expensas de la fermentación del piruvato; lo que no hace ninguno de los demás lactobacilos.

Lactobacillus plantarum

- . Bacilos rectos con extremos redondeados, generalmente 0.9-1.2 milimicrones de ancho por 3-8 de largo, ocurren en pares, individualmente o en cadenas cortas.
- . Móviles, aunque comunmente sin flagelos; cepas con flagelos peritricos han sido descritas.
- . Anaerobios.
- . Las colonias superficiales tienen aproximadamente 3 mm de ancho, sobresalientes, redondas, lisas, compactas, blancas, ocasionalmente amarillo pálido u obscuro.
- . Su crecimiento en caldo produce abundante turbidez.
- . Algunas cepas fermentan la arabinosa y algunas la arabinosa y la xilosa; se conocen respectivamente como L. arabinosus y L. pentosus.
- . Producen ácido láctico DL.
- . Crecen en gluconato con producción de CO₂. La ribosa se fermenta en 1 mol de ácido láctico y otra mol de ácido acético. La fermentación de otras pentosas conlleva a los mismos productos.
- . Acidifica la leche con posible coagulación; 0.3-1.2% de acidez titulable producida.
- . Crece a 15°C, generalmente no hay crecimiento a 45°C; óptimo usualmente a 30-35°C.
- . Requiere pantotenato de calcio y niacina. No requiere tiamina, piridoxal o piridoximina, ácido fólico, vitamina B₁₂, tiamina o desoxirribósidos; generalmente no requiere riboflavina.

Lactobacillus curvatus

- . Bacilos curvos en forma de frijol, con extremos redondeados; 0.7-0.9 por 1.0-1.2 milimicrones; se pre

senta en cadenas cortas o anillos cerrados o generalmente cuatro células forman el aspecto de herradura.

- . No esporulados.
- . Algunas cepas son móviles al principio; la motilidad se pierde en subcultivo. No se ha descrito flagelación.
- . Generalmente sus colonias son algo más pequeñas que las de L. plantarum, aunque usualmente de la misma apariencia.
- . Homofermentativo. Se produce ácido sin gas de la glucosa; el ácido láctico DL es el principal producto.
- . Lactosa variable (41% positivo); la acidez en la leche es variable (59% negativo).
- . Crecimiento a 15°C; no crece a 45°C; rango óptimo: 30-37°C.
- . Etc.

Lactobacillus fermentum

- . Bacilos de tamaño variable, usualmente cortos, 0.5-1.0 por 3.0 o más milimicrones. Algunas veces en pares o cadenas.
- . Inmóviles.
- . Colonias generalmente planas, circulares o irregulares hasta llegar a ser rugosas, a menudo translúcidas. No pigmentadas, aunque algunas cepas producen pigmentación rojo-ocre.
- . Heterofermentativos. Producen ácido y gas a partir de la glucosa; crecen a expensas de 4% de gluconato con copiosa producción de CO₂. Fermentan la D-ribosa en ácidos láctico y acético sin producción de gas. Usualmente son fermentadas la galactosa, la lactosa, melibiosa y rafinosa (96, 92 y 98% respectivamente).
- . Generalmente acidifican lentamente la leche o producen poca acidez.
- . Del 50% de carbono total de la glucosa se produce ácido láctico DL.
- . Requieren pantotenato de calcio, niacina y tiamina.

No requieren riboflavina ni piridoxal ni ácido fólico.

- . No hay crecimiento a 15°C; crecen a 45°C; cepas aisladas recientemente pueden tener una temperatura óptima de crecimiento a 41-42°C.

Lactobacillus brevis

- . Bacilos, generalmente cortos y rectos, 0.7-1.0 por 2.0-4.0 milimicrones, con extremos redondeados, ocurren individualmente o en cadenas cortas.
- . Colonias generalmente rugosas o intermedias, planas (en cuanto a superficie) pueden ser casi translúcidas. Generalmente no pigmentadas; algunas cepas pigmentan entre anaranjado y rojo.
- . Heterofermentativos. No producen gas de la glucosa.
- . Crecen a expensas de 4% de gluconato con copiosa producción de CO₂. Fermentan la D-ribosa en ácido láctico y acético sin producción de gas.
- . Aeróbicamente se produce acetato y CO₂ a partir del lactato; no hay formación de acetoina.
- . Produce poca o nula acidificación de la leche.
- . Del 50% del carbono total de la glucosa, produce ácido láctico DL; otros productos principales son el acetato, etanol y CO₂.
- . Nutrición compleja; requiere pantotenato de calcio, niacina, tiamina y ácido fólico; no requiere riboflavina, piridoxal ni vitamina B₁₂.
- . Hay crecimiento a 15°C, no crece a 45°C; óptimo alrededor de 30°C.

Lactobacillus buchneri

- . Idéntico al L. brevis, excepto que L. buchneri fermenta la melicitosa y no requiere ácido fólico.

2.8.4 Acidez Titulable

Inmediatamente después de ordeñada, la leche tiene una reacción un poco ácida. (44) Lo que habitualmente se co-

noce como acidez de la leche, es el resultado de una valoración (...) La acidez de valoración es la suma de cuatro reacciones: Las tres primeras representan la acidez "natural" de la leche (...1):

1. Acidez debida a la caseína; alrededor de 2/5 de la acidez natural.
2. Acidez debida a sustancias minerales y a indicios de ácidos orgánicos, igualmente 2/5 de la acidez natural.
3. Reacciones secundarias debidas a los fosfatos; sobre 1/5 de la acidez natural. Estas reacciones se han designado con el término "over-run".
4. Acidez "desarrollada", debida al ácido láctico y a otros ácidos procedentes de la degradación microbiana de la lactosa en las leches en vías de alteración.

La acidez natural de la leche equivale a 16 cc de solución normal (N/1) de hidróxido de sodio por litro de leche, (1) es decir, a 0.16 g%. Los límites pueden oscilar entre 0.13 a 0.17 g% o aún mayores, dependiendo de la raza de ganado u otros factores de variación. (Ver: 2.8.6)

Inmediatamente después de ordeñada la leche, nunca contiene más de 0.002% de ácido láctico. Cualquier aumento es debido al desdoblamiento de lactosa en ácido láctico. (44) (Acidez desarrollada)

2.8.4.1 Medición de la acidez

Solamente existe un método, cuyo principio exponemos a continuación y numerosos medios o sistemas de expresión (gramos%, °D, °SH, °T, etc.).

2.8.4.1.1 Análisis volumétrico

(...) en el análisis volumétrico se aprovechan reacciones cuantitativas que se verifican entre la sustancia por determinar y un reactivo cuya concentración se conoce exactamente; del volumen empleado de este último para la realización de la reacción precisamente hasta su punto final, se calcula la cantidad de la sustancia que se pretende valorar. Las reacciones que se aplican al análisis volumétrico deben ser conocidas con exactitud, para así poder relacionar el pe-

so de las sustancias reaccionantes con el peso de los productos de la reacción; pues aun cuando en este tipo de análisis lo inmediato es la medición de volúmenes, directamente están relacionados estos con el peso de las sustancias a que son equivalentes. Este sistema analítico, debido a que los cálculos se basan en los volúmenes de soluciones requeridos en cada valoración, recibe el nombre de Análisis Volumétrico o Volumetría. (42)

En los métodos volumétricos debe conocerse con exactitud el final de las reacciones; para ello se emplea en la mayor parte de los casos sustancias especiales llamadas "indicadores", cuya misión es "advertir" cuando la reacción ha llegado a ser completa (...42).

2.8.4.1.1.1 Soluciones valoradas

Las soluciones empleadas en volumetría y cuya concentración debe ser conocida con tanta mayor exactitud cuanto mejores resultados analíticos se desee obtener, reciben el nombre de Soluciones Valoradas o Soluciones Tituladas (...42); son de tres tipos: empíricas, molares o moleculares y normales. Brevemente diremos que las empíricas son las que pueden tener mayor o menor cantidad de soluto con relación al disolvente (por ejemplo, solución de NaOH al 5%, 25%, etc.), lo que quiere decir que en 100 ml de solución (no del solvente) hay 5, 25, etc. gramos de soluto y el resto, para completar 100 ml, son disolventes (generalmente agua destinada).

Las soluciones moleculares, son aquellas que en 1,000 ml de solución (no del disolvente) contienen una cantidad de soluto en gramos igual al peso molecular de la sustancia disuelta. Se les designa con la letra M con el denominador que señale la parte alícuota que se ha tomado. Por ejemplo, una solución molecular de NaOH contiene 40 gramos de NaOH en 1,000 ml de solución; y una solución molar de H₂SO₄, contiene 98.0 gramos de soluto por litro.

NaOH:		H ₂ SO ₄ :	
Na... peso atómico =	23	H... peso atómico =	1 x 2 = 2
O.... peso atómico =	16	S... peso atómico =	32
H.... peso atómico =	<u>1</u>	O... peso atómico =	16 x 4 = <u>64</u>
	40		98

Un mililitro de la solución M/1 de NaOH contendrá 40/

1000 = 0.040 g de NaOH; por otro lado, una solución que en un litro contiene 20 g de NaOH (la mitad del peso molecular), es una solución M/2; si contiene 80 g (el doble) es una solución 2 M, etc. Lo mismo puede decirse de las proporciones para las soluciones del ácido sulfúrico, o cualquier otra.

Las soluciones normales, son aquellas que en 1,000 ml de solución (no del disolvente), contienen el "peso equivalente gramo" de cualquier compuesto o elemento activo.

"Peso equivalente", "gramo equivalente" o simplemente "equivalente", es la cantidad en gramos de la substancia, que corresponde a un átomo gramo de hidrógeno. (42) Con ayuda de los siguientes ejemplos se comprende mejor:

- La solución normal de NaOH corresponde a la solución molar del ejemplo anterior, puesto que el compuesto activo posee únicamente un equivalente (un átomo de H).
- La solución normal de H₂SO₄ contendrá su peso equivalente gramo en 49 gramos:

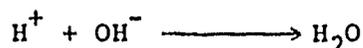
$$\text{Equivalente} = \frac{\text{Peso fórmula gramo}}{\text{Número de H}^+ \text{ ionizables x unidad de fórmula}} = \frac{\text{Peso molecular}}{2} = \frac{98}{2}$$

dividimos entre dos, porque el mol de ácido sulfúrico tiene dos hidrógenos y únicamente nos interesa la cantidad en gramos que corresponde o equivale a un átomo de hidrógeno.

La solución normal de ácido sulfúrico será aquella que en 1,000 ml de solución contenga 49 g de ácido sulfúrico; 1 ml de esta solución, llamada miliequivalente, contendrá proporcionalmente la milésima parte del compuesto, (0.049) una solución 2N contendrá 98 g; una solución N/2, 24.5 g; etc. (los miliequivalentes de estas soluciones serán proporcionales).

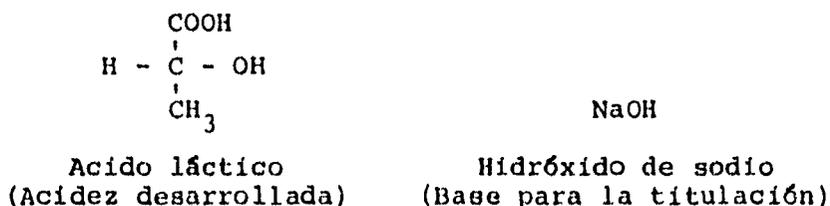
- En el caso del carbonato de sodio (Na₂CO₃), los dos átomos de sodio "equivalen" a átomos de hidrógeno; es decir, sabemos que en lugar de ellos pueden estar dos átomos de hidrógeno para formar el ácido carbónico (H₂CO₃), por ello, el peso molecular de las fórmulas Na₂CO₃ = 106, H₂CO₃ = 62, se divide entre dos para obtener los gramos del compuesto necesarios para preparar la solución normal.

Las definiciones de "peso equivalente" y de "normalidad", son esencialmente las mismas para todos los casos del análisis volumétrico; sin embargo, es más fácil comprender sus aplicaciones tratándose de reacciones en las que los elementos no cambian de valencia, como son las reacciones de neutralización (...). En una reacción volumétrica de neutralización, la reacción fundamental expresada teóricamente es: (42)



Ella indica que el peso equivalente del hidrógeno (1.008 g) reacciona cuantitativamente neutralizando el peso equivalente de un hidroxilo (17.008 g), para dar lugar a la formación de una molécula de agua. En esta reacción el ion hidrógeno representa a un ácido monobásico y el ion hidroxilo a una base monovalente. (...42)

Esto es justamente lo que hacemos para medir la acidez de la leche: una titulación, para medir la capacidad total de neutralización de la leche (acidez natural + acidez desarrollada: ácido láctico) frente a una base, el NaOH, en presencia de fenolftaleína como indicador.



El peso molecular del ácido láctico (C₃H₆O₃) es 90 y es también su peso equivalente porque sólo el H del carboxilo (-COOH) es ionizable; el peso molecular del hidróxido de sodio es 40 según vimos con anterioridad y corresponde también a su peso equivalente. El peso equivalente del ácido láctico: 90, reacciona exactamente con el peso equivalente de la sosa: 40. Si se tiene una solución de ácido láctico que contenga, por litro, 90 gramos de ácido, esa solución de acuerdo con la definición, es una solución normal; por otra parte, una solución de hidróxido de sodio con 40 gramos por litro, es también una solución normal; ambas son equivalentes entre sí, puesto que las cantidades de ácido y de hidróxido son capaces de reaccionar cuantitativamente, es decir, de neutralizarse; al mezclarse entre sí se obtendrán 2 litros de solución neutra.

Lo que se dice de un litro de cada solución puede decirse de cualquier otro volumen y, en general, puede quedar asentado que volúmenes iguales de dos o más soluciones de la misma normalidad, son equivalentes entre sí; o bien, que soluciones de la misma normalidad se equivalen volumen a volumen. (42)

El punto preciso en el que todos los iones de hidrógeno disponibles del ácido se han titulado, se conoce como punto de equivalencia de la titulación. Por lo general, cuando este punto es muy cercano, el analista agrega el reactivo muy lentamente, gota a gota (o por fracciones de gota) hasta que el indicador (fenolftaleína) sufre su cambio característico de color. Cuando esto sucede, decimos que se ha llegado al punto final debido a que ahí concluye la titulación. Sin embargo, sólo si el indicador produce este cambio de color en el pH del punto de equivalencia, corresponderá el punto final al de equivalencia. (26) En la leche estos puntos no se corresponden; lo que en realidad se mide al hacer una determinación rutinaria de acidez, es la cantidad de álcali (NaOH) necesaria para alcanzar el pH 8.3, que es el punto donde vira la fenolftaleína, de incolora a rosa (mientras más "acidez" haya en la leche, mayor cantidad de NaOH se requerirá para neutralizar y luego alcalinizar el medio hasta pH 8.3 donde termina la titulación); esto es, la determinación o medida de la capacidad buffer o tampón de la leche, mas no el ácido láctico en sí. Recuérdese que la acidez de valoración de la leche es la suma de varias reacciones, sin embargo, después de titular, la acidez de la leche se expresa como ácido láctico.

2.8.4.2 Sistemas de expresión

2.8.4.2.1 Gramos de ácido láctico

En México, la titulación se realiza con sosa al 0.1 N; es decir que si con 40 g de NaOH se prepara un litro de solución normal, con 4 g/litro se obtiene una solución 0.1 N; esta solución se deposita en un aparato llamado acidímetro o en una bureta automática y se miden los mililitros empleados en la titulación; si en un litro de solución hay 4 g, en un mililitro habrá 0.004 g (es el miliequivalente: meq); cada ml de esta solución de sosa neutraliza volumen a volumen una solución de ácido de la misma normalidad (0.1 N): 90 g de ácido láctico en un litro de solución corresponden a la solución normal; 9 g se requieren para preparar la solución 0.1 N y un ml contendrá el meq de la solución (0.009) de ácido láctico.

Razonando, podemos decir que 1 ml de sosa 0.1 N (0.004 g) neutraliza 0.009 g de ácido contenidos en 1 ml de una solución de ácido láctico 0.1 N; al multiplicar el número de ml de NaOH empleados en una titulación (hasta el vire del indicador) por 0.009 se obtienen los gramos de ácido neutralizados.

Por ejemplo, si se emplean 1.4 ml de la solución de sosa de una bureta, quiere decir que se neutralizaron en la leche $1.4 \times 0.009 = 0.0126$ g de ácido láctico.

En México, la acidez de la leche se expresa en gramos % de ácido láctico; se emplea NaOH 0.1 N y se titulan 9 ml de leche. El indicador es la fenolftaleína.

Conociendo la normalidad y el volumen de la solución empleada en la titulación, puede determinarse el porcentaje de una substancia, conociendo el peso de la muestra analizada y el meq de una solución normal de dicha substancia:

Tomando el ejemplo anterior:

- Utilización de 1.4 ml de una solución de NaOH 0.1 N
- Muestra = 9 ml (9 g)
- Meq de una solución normal de ácido láctico = 0.09

Primero debe multiplicarse el volumen de la base (1.4 ml de NaOH) por su normalidad (0.1) para obtener militros normales (de otro modo los 1.4 ml no especifican la normalidad, podría ser 0.5, 1, 2, etc.)

$$1.4 \times 0.1 = 0.14$$

De este modo, el 0.14 corresponde volumen a volumen con otra cantidad igual de ácido láctico 1 N, de ahí que si conocemos el meq de la solución normal del ácido, podemos obtener el número de gramos presentes en los 9 ml de la muestra de leche:

$$0.14 \times \text{meq} (0.09) = 0.0126 \text{ gramos}$$

Ahora, establecemos una regla de tres, para obtener el porcentaje: si en 9 ml hay 0.0126 g
en 100 ml habrá x

$$\frac{0.0126 \times 100}{9} = 0.14 \text{ g\%}$$

Como esta operación es prácticamente la inversa de la multiplicación anterior, queda demostrado que al emplear 9 g (ml) de muestra se facilitan enormemente los cálculos. Por ello el número de décimas de mililitro de NaOH empleadas en la titulación, se consideran directamente los g% de acidez expresada como ácido láctico.

Según la escala del aparato en que se haga la lectura, puede ser 1.4 ml o directamente 0.14 g%.

Cuando el número de mililitros (no de décimas) se da directamente como gramos de ácido láctico, corresponde a gramos/litro. Así, una lectura de 1.4 ml de NaOH 0.1 N puede expresarse o reportarse como acidez en ácido láctico: 1.4 g/litro ó 0.14 g%.

La determinación del porcentaje puede resumirse mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{meq} \times \text{ml} \times \text{N} \times 100}{\text{P}} = \%$$

en la que:

meq = miliequivalente de una solución normal de la substancia que se determina
 ml = volumen empleado en la titulación
 N = normalidad de la solución usada
 P = peso de la muestra en gramos

Substituyendo se tiene:

$$\frac{0.09 \times 1.4 \times 0.1 \times 100}{9} = 0.14 \text{ g\%}$$

Por otro lado, los 9 ml pueden obtenerse mediante el siguiente razonamiento: ¿Cuál deberá ser el peso (número de ml) de la muestra de leche para que al titular con NaOH 0.1 N, cada décima de mililitro corresponda al 1% de acidez de la muestra expresada como ácido láctico?

De la fórmula general para determinar el porcentaje:

$$\frac{\text{meq} \times \text{ml} \times \text{N} \times 100}{\text{P}} = \%$$

Se despeja el peso P y se substituyen los valores

$$\text{meq} = 0.09$$

$$\text{ml} = 0.1$$

$$N = 0.1$$

$$\% = 0.01$$

$$P = \frac{\text{meq} \times \text{ml} \times N \times 100}{\%}$$

$$P = \frac{0.09 \times 0.1 \times 0.1 \times 100}{0.01}$$

$$P = 9.0 \text{ ml (gramos)}$$

Por ello, en el caso de que el volumen de muestra utilizado en una titulación no fuera de 9 ml puede emplearse la fórmula:

$$g\% = \frac{\text{ml de NaOH} \times 0.1 N \times 0.09}{g \text{ de muestra}} 100$$

Hay casos en que es más cómodo elegir el peso de la muestra, generalmente un número sencillo, y calcular la concentración que deberá tener la solución, a fin de que cada mililitro de ella guarde una relación sencilla con el porcentaje del componente que se cuantea. (42)

Esto es precisamente lo que ocurre con los otros sistemas de expresión: °D grados Dornic, °SH grados Shoxlet-Henkell, u otros.

2.8.4.4.2.2 Grados Dornic (°D)

En este caso se eligieron 10 ml de muestra; entonces, ¿Qué concentración deberá darse a la solución de NaOH, para que al titular, cada décima de dicha solución empleada, corresponda a un grado Dornic?

En la fórmula general:

$$\% = \frac{\text{meq} \times \text{ml} \times N \times 100}{P}$$

Despejamos N y sustituimos meq = 0.09, ml = 0.1, % = 0.01, P = 10

$$N = \frac{\% \times P}{\text{meq} \times \text{ml} \times 100}$$

$$N = \frac{0.01 \times 10}{0.09 \times 0.1 \times 100}$$

$$N = \frac{0.1}{0.9} = 0.11$$

Por ello, la definición de un grado Dornic expresa:

Grado Dornic ($^{\circ}$ D): número de décimas de ml de sosa N/9 necesarios para neutralizar 10 ml de leche.

$$N/9 = \text{normalidad } 1/9 = 0.11$$

Por lo que la solución de NaOH en este caso contendrá 40 (1/9) = 4.4 g en un litro (que neutralizan, volumen a volumen, una solución de ácido láctico N/9, es decir, a 10 g de ácido láctico (90/9) por litro de solución).

2.8.4.2.3 Grados Soxhlet-Henkel ($^{\circ}$ SH)

Número de mililitros de sosa N/4 necesarios para neutralizar 100 ml de leche.

Al escoger 100 ml de leche, la cantidad de sosa a utilizar es mucho mayor, por ello se habla de mililitros en lugar de décimas de ml; además, la concentración de sosa es también más alta (ver inciso siguiente). (En la práctica, la valoración se hace habitualmente sobre 50 cc)

Otros. Grados Thorner: número de décimas de ml de sosa N/10 necesarios para neutralizar 10 ml de leche.

2.8.4.2.4 Equivalencia de los sistemas de expresión

Los sistemas de expresión en gramos y en $^{\circ}$ D son equivalentes entre sí; al variar la cantidad de muestra, varía también la normalidad de la sosa:

<u>Sistema</u> <u>Expresión</u>	<u>Normalidad</u> <u>Sosa</u>	<u>ml</u> <u>empleados</u>	<u>Cantidad</u> <u>muestra</u>
1 $^{\circ}$ D	0.11	0.1	10 ml
1 g%	0.1	0.1	9 ml

Si sustituimos estos datos en la fórmula general y despejamos la incógnita (ml empleados en cada caso para obtener la unidad de expresión: 1°D ó 1 g%), estableceremos la equivalencia:

$$\% = \frac{\text{meq} \times \text{ml} \times N \times 100}{P}$$

$$\text{ml} = \frac{P \times \%}{\text{meq} \times N \times 100}$$

Substituyendo:

Grados Dornic

$$\begin{aligned} \text{meq} &= 0.09 \\ \% &= 0.01 \\ N &= 0.11 \\ P &= 10 \end{aligned}$$

Gramos por ciento

$$\begin{aligned} \text{meq} &= 0.09 \\ \% &= 0.01 \\ N &= 0.1 \\ P &= 9 \end{aligned}$$

$$\frac{10 \times 0.01}{0.09 \times 0.11 \times 100} = \frac{9 \times 0.01}{0.09 \times 0.1 \times 100}$$

$$\frac{0.1}{0.99} = \frac{0.09}{0.90}$$

$$0.10 = 0.10$$

(Se emplea una décima de ml por °D o gramo %, aunque varíen normalidad de la sosa y ml de muestra).

La diferencia reside en el sistema de expresión; para convertir °D a gramos de ácido láctico se procede a dividir. Ejemplo; una lectura de 1.4 ml en la bureta o en el acidímetro, equivalen a 14 décimas y por lo tanto a 14°D.

$$\frac{^{\circ}\text{D}}{10} = \text{g/litro} \qquad \frac{14}{10} = 1.4 \text{ g/litro}$$

$$\frac{^{\circ}\text{D}}{100} = \text{g/100 (g \%)} \qquad \frac{14}{100} = 0.14 \text{ g\%}$$

(La operación inversa conduce a los °D: $0.14 \times 100 = 14^{\circ}\text{D}$).

La equivalencia de cada grado Dornic en gramos de ácido láctico y ml de leche es la siguiente:

$$\frac{^{\circ}\text{D}}{10} = \text{g/litro}; \text{ para la unidad } \frac{1^{\circ}\text{D}}{10} = 0.1 \text{ g/litro}$$

es decir, que cada grado Dornic equivale a 0.1 gramos de ácido láctico por litro de leche; o bien:

$$\begin{array}{rcl} 1^{\circ}\text{D} & = & 0.1 \text{ g en } 1000 \text{ ml} \\ & & 0.01 \text{ g en } 100 \text{ ml} \\ & & 0.001 \text{ g en } 10 \text{ ml} \\ & & 0.0001 \text{ g en } 1 \text{ ml de leche} \end{array}$$

Los grados Soxhlet-Henkel ($^{\circ}\text{SH}$), utilizados en Alemania y en Suiza no son equivalente a los sistemas anteriores, debido a que no toman el ácido láctico como referencia.

Este concepto es más lógico que el precedente; de una parte, porque la leche fresca no contiene ácido láctico, de otra porque aun cuando en la leche exista una acidez desarrollada, la valoración no mide la cantidad de ácido láctico formada. (1)

Si suponemos que los grados SH toman como referencia al ácido láctico y consideramos la normalidad de la sosa, al multiplicar el meq del ácido láctico 0.09×0.25 (normalidad de la sosa empleada) y finalmente por 100 ml de muestra, obtenemos que cada $^{\circ}\text{SH}$ equivale a 2.25°D .

$$0.09 \times 0.25 \times 100 = 2.25$$

Para cualquier conversión:

$$\frac{(\text{No. de } ^{\circ}\text{SH}) \times 2.25}{100} = ^{\circ}\text{D} = \text{g\% de ácido láctico}$$

2.8.5 Técnica de Titulación

Cuando se determina la acidez titulable de la leche, no sólo se determinan los hidrogeniones inicialmente presentes como tales, sino también los potenciales que se disocian durante la titulación con hidróxido de sodio. (13)

2.8.5.1 Aparatos y equipo

- . Acidímetro de Kimble o bureta graduada en 0.1 ml y Soporte Universal.

2.8.5.2 Materiales y reactivos

- . Pipeta volumétrica de 9 ml
- . Cápsula de porcelana blanca o vaso de precipitado de aproximadamente 50 ml
- . Hidróxido de sodio 0.1 N preparado según se indica en el anexo al final de este capítulo.
- . Indicador de fenolftaleína (disolver 5 g de fenolftaleína en 375 ml de alcohol etílico de 95% y diluir con agua destilada hasta 500 ml. Neutralizar con NaOH 0.1 N hasta color rosado incipiente; 44).

2.8.5.3 Procedimiento

Con la pipeta volumétrica se miden 9 ml de leche y se depositan en el vaso de precipitado, al que se añaden de 4 a 5 gotas del indicador de fenolftaleína. Se titula con hidróxido de sodio 0.1 N hasta que aparezca un color rosado, el cual deberá persistir durante 10-15 segundos en presencia de agitación.

2.8.5.4 Cálculos y resultados

El número de décimas de ml de NaOH 0.1 N gastadas (la lectura debe hacerse en la parte inferior del menisco; 48) se señalan directamente como °D o se dividen entre 100 para expresar la acidez en g% (ver 2.8.4.2.4).

Cuando el volumen de leche titulado no corresponde a los 9 ml de la técnica, aplicar la fórmula citada en 2.8.4.2.1.

2.8.5.5 Causas de error

La medición de la acidez parece ser muy fácil, pero también puede ser de gran imprecisión, en razón de varias causas de error debidas a la opacidad de la leche: (1)

- a) La cantidad de indicador influye mucho; se puede comprobar una diferencia de 3°D (0.3 ml de NaOH N/9) empleando una gota solamente (19°D) o 10 gotas (16°D) de solución de indicador. Es preciso utilizar siempre la misma cantidad, por ejemplo,

0.1 cc de solución de fenolftaleína al 1% en alcohol de 95° (y no contar las gotas).

- b) El punto final de valoración no es un momento preciso porque depende de la agudeza visual del operador.

2.8.6 Variaciones de la Acidez

La acidez de la leche puede variar por múltiples causas, siendo las más importantes: (44)

La proliferación bacteriana (fermentación de la lactosa) por deficiente refrigeración; el estado de lactancia del animal (el calostro tiene acidez muy elevada); salud del animal (la mamitis, por ejemplo, baja la acidez) (ver: 2.1.4); las adulteraciones (aguado y neutralización); raza de ganado (en general, la leche que proviene de razas altamente productoras de grasa, tendrá acidez mayor, por su elevado contenido de sólidos no grasos y, en particular, caseína y fosfatos).

Aunque la acidez representa una suma, en la que ninguno de los componentes se conocen con exactitud (acidez natural, reacciones secundarias y acidez desarrollada), es el valor de la acidez desarrollada lo que en la práctica nos interesa, y para ello suele ser suficiente la valoración acidimétrica, a pesar de las reservas que se le puedan hacer.

2.9 PRUEBA DEL ALCOHOL O DE ESTABILIDAD FÍSICOQUÍMICA

Esta prueba, de muy alto valor práctico y fácil ejecución, es eficiente para obtener una rápida orientación de algunas alteraciones de la leche y para prever la coagulabilidad de la misma por efecto del calor, es decir, su estabilidad frente a los tratamientos térmicos.

(...:) teóricamente, el mejor método para probar la leche sería sujetarla a la máxima temperatura a que se someterá en la esterilización, pero el procedimiento es muy largo y poco práctico, por lo cual, no se podría usar en forma rutinaria. (44)

En la práctica resulta más rápida y simple la prueba

del alcohol, cuyo fundamento consiste, según Pien (citado por 44) en que cuando un volumen dado de alcohol etílico se mezcla con la leche, provoca una deshidratación parcial de ciertos coloides hidrófilos, desnaturalizándolos, y al causar un estado de desequilibrio entre sus dos fases discontinuas (emulsión grasa y suspensión coloidal), floculan. Este cambio sólo se produce cuando la mezcla final alcanza un cierto contenido de alcohol, abajo del cual, la leche térmicamente estable no floculará. En esta prueba, el alcohol activa el poder precipitante del ácido láctico.

Esta prueba contribuye también a descubrir las leches anormales, por ejemplo, el calostro, la leche del final de lactación o la leche cuyo contenido mineral se ha alterado (contenido elevado de calcio iónico; 1), desuerte que resulta más coagulable que la leche normal.

Las leches normales son en general estables al alcohol, por tanto, no habrá floculación, pero las leches anormales, entre las que incluimos también las leches acidificadas, con balance salino incorrecto, con exceso de albúmina ya sea por causas patológicas (mastitis) o fisiológicas (calostro), serán inestables al alcohol y flocularán. (44, 91, 48)

El desarrollo de un 0.06 a 0.08% de acidez o un total de unos 0.20% de acidez valorable en la leche hace que la caseína se vuelva inestable. (91)

Normalmente existe una correlación entre la acidez de la leche y la prueba del alcohol, pero algunas veces ésta es interferida por el contenido de sales de la leche en prueba. (48)

2.9.1 Materiales y Reactivos

- . Dos pipetas de 5 ml
- . Tubo de ensayo
- . Gradilla para tubos de ensayo
- . Alcohol etílico de 68% (peso específico de 0.895 a 15.5°C; 24), preparado como sigue: diluir hasta 100 cc con agua destilada 72 cc de alcohol etílico neutralizado de 95°. (48) (Ver: 2.9.3 Preparación de Alcoholes)

2.9.2 Procedimiento

Se mezclan simultáneamente en el tubo de ensayo, iguales volúmenes de leche cruda y alcohol etílico de 68% (2 ml por ejemplo). Esto se facilita mucho si se emplean tubos marcados; se agita sin calentar. Tanto la leche como el alcohol deben tener una temperatura de unos 16 a 25°C. Se observa si hay floculación, de preferencia virtiendo el contenido del tubo sobre una superficie oscura. En caso de observar floculación la leche no permanecerá estable al calentamiento y su grado de inestabilidad estará directamente relacionado al tamaño y número de las partículas coaguladas. (44) Los coágulos grandes suelen revelar que la leche tiene una acidez que rebasa del 0.20% y otras circunstancias anormales.

2.9.3 Preparación de Alcoholes

Los contenidos alcohólicos se entienden como referidos en la escala Guy Lussac, o sea, alcohol por ciento en volumen a 15°C, siendo la abreviación GL.

Normas para dilución (47):

Cuando se quiere obtener un alcohol de un porcentaje determinado, partiendo de otro de porcentaje superior, se aplican las reglas siguientes:

En volumen. Se designa el porcentaje en volumen del alcohol más fuerte por \underline{V} y el más débil por \underline{v} .

Regla. Se mezclan \underline{v} volúmenes del alcohol más fuerte con agua destilada hasta hacer \underline{V} volúmenes del producto. Se deja en reposo la mezcla hasta que se haya producido la contracción* y hasta que se haya enfriado; después se repone la deficiencia hasta \underline{V} volúmenes añadiendo más agua destilada.

*Al mezclar volúmenes iguales de alcohol y agua, se produce una elevación de la temperatura y una contracción del 3% en volumen. Cuando se opera en pequeñas cantidades la contracción carece de importancia, pero no así en cantidades grandes.

Ejemplos: a partir de un alcohol de 96° (comercial), preparar un alcohol de 68° (para la prueba del alcohol, inciso 2.9), y otro de 65° (prueba de neutralizantes, inciso 2.6)

$$\underline{V} = 96 \quad ; \quad \underline{v} = 68 \quad ; \quad \underline{v} = 65$$

Se toman:

$$\begin{array}{r} 68 \text{ ml de alcohol de } 96 \\ 28 \text{ ml de agua destilada} \\ \hline = 96 \text{ ml de alcohol de } 68 \end{array}$$

y

$$\begin{array}{r} 65 \text{ ml del mismo alcohol} \\ 31 \text{ ml de agua destilada} \\ \hline = 96 \text{ ml de alcohol de } 65 \end{array}$$

Por regla de tres:

Grados	ml alcohol
--------	------------

96	100
----	-----

68	X
----	---

$$X = \frac{6800}{96} = 70.8$$

70.8 ml de alcohol de 96
<u>29.2 ml de agua destilada</u>

100.0 ml de alcohol de 68

Grados	ml alcohol
--------	------------

96	100
----	-----

65	X
----	---

$$X = \frac{6500}{96} = 67.7$$

67.7 ml de alcohol de 96
<u>32.3 ml de agua destilada</u>

100.0 ml de alcohol de 65

ANEXO

Preparación y Titulación de la Solución de NaOH 0.1 N

4 g/l de NaOH corresponden a una solución 0.1 N (2.8.4.1.1.1); sin embargo, la sosa es muy higroscópica y por ello conviene considerar la humedad que absorberá del ambiente del laboratorio al momento de pesarla.

Es preferible pesar 4.25 g/l y disolverlos en agua a 20°C.

Para comprobar si la solución está al 0.1 N deseado, debe titularse con un ácido (clorhídrico, sulfúrico, etc.) de la misma normalidad y con ayuda de un indicador (fenolftaleína) para conocer el momento en que, al producirse el vire de color, la titulación llega a su punto final.

La titulación se realiza 24 horas después de preparada la solución.

En una bureta automática fija a un soporte universal, se hace pasar agua destilada tres veces en el interior con el objeto de lavarla perfectamente; después se hace pasar tres veces solución de sosa (el volumen utilizado en el lavado debe restarse a los 1,000 ml o más de solución preparada y tenerlo presente en el momento de los cálculos).

En un vaso de precipitado se depositan, extraídos de una bureta automática, 10 ml de ácido 0.1 N para efectuar la titulación.

Puede utilizarse ácido clorhídrico 0.1 N preparado comercialmente, o bien, preparar una solución 0.1 N de ácido sulfúrico o clorhídrico en el laboratorio. Por ejemplo, preparemos una solución 0.1 N de ácido sulfúrico a partir de una solución comercial:

. Sabemos que el peso molecular del ácido sulfúrico es 98. Una solución molecular requiere 98 g/l; pero dada la valencia activa (H_2), una solución normal se prepara con 49 g/l ($98/2$); una solución 0.1 N requiere entonces 4.9 g/l.

. Debe determinarse en qué volumen de la solución comercial están contenidos los 4.9 g requeridos; si la solución tiene por ejemplo, una densidad de 1.840 y una pureza de 95-98%, se procede de la siguiente forma:

$$D = 1.840$$

$$m = 4.9 \text{ g}$$

$$v = X$$

$$D = \frac{m}{v} \quad v = \frac{m}{D} \quad v = \frac{4.9}{1.84} = 2.663 \text{ ml}$$

Si de una solución con 95-98% de pureza se requieren 2.663 ml, ¿cuántos ml se requerirán de una solución 100% pura?

$$\begin{array}{r} 2.663 \text{ ml} \dots 95 \\ X \text{ ml} \dots 100 \end{array} \quad X = 2.8 \text{ ml}$$

Si la solución es 98% pura, $X = 2.71 \text{ ml}$

. A esta cantidad se le adiciona agua hasta completar un litro, con lo que se obtiene la solución 0.1 N. Se llena una bureta automática (tres lavados con agua y tres con la solución de ácido) y se extraen los 10 ml en el vaso de precipitado, se agregan 3 a 4 gotas del indicador de fenolftaleína (preparado según 2.8.5.2) y se procede a titular.

Pueden ocurrir tres posibilidades al titular:

a) Solución titulada. Cuando hay correspondencia volumen a volumen; 10 ml exactamente de sosa hacen virar el indicador a rosa salmón fijo durante unos segundos en presencia de agitación, al reaccionar con los 10 ml exactamente de la solución 0.1 N de ácido.

b) La solución de sosa está muy concentrada. Por ejemplo, 9.8 ml hacen virar el indicador con los 10 ml de ácido. La solución debe diluirse: la cantidad de agua a adicionar se calcula conociendo el exceso de concentración por ml.

Sabemos que en 1 ml de solución de ácido, sulfúrico, por ejemplo, tenemos el miliequivalente de una solución 0.1 N, es decir, 0.0049 g/ml; en 10 ml hay 0.049 g, los cuales deberían neutralizarse, volumen a volumen, con 0.040 g de sosa contenidos en 10 ml de la solución 0.1 N. Sin embargo, esta cantidad de sosa (0.040) se encuentra en 9.8 ml en lugar de 10 ml (por ello se produce el vire de color al llegar a 9.8 ml de sosa utilizada en la titulación); lo que quiere decir que cada mililitro de solución contiene 0.00408 g (0.040/9.8) en lugar de 0.00400 g (0.040/10) de sosa.

La diferencia en ml, para que las soluciones se co-

respondan volumen a volumen es de 0.2 (10-9.8 ml), lo que quiere decir que repartidos entre los 9.8 ml, a cada ml de la solución de sosa le faltan 0.02 ml de agua (0.2/9.8).

Esta cantidad debe multiplicarse por el volumen de solución preparada. Ejemplo: se prepararon 1,000 ml, menos 200 ml empleados para lavar la bureta, quedan 800 ml de solución de sosa; entonces la cantidad de agua a adicionar será $800 \times 0.02 \text{ ml} = 16$. El nuevo volumen de 816 ml vuelve a agitarse perfectamente y a titularse hasta que se obtenga la correspondencia de volumen entre las soluciones.

c) La solución de sosa está muy diluida. Falta sosa para aumentar la concentración.

Ejemplo. Para hacer virar el indicador en el vaso que contiene 10 ml exactos de la solución de ácido 0.1 N, se requirieron 10.2 ml de solución de sosa 0.1 N; lo que quiere decir que en cada ml de solución de ácido la cantidad es correcta (0.0049 g), pero en la solución de sosa, cada ml tiene menor cantidad de la que le corresponde, es decir, 0.00392 (0.040/10.2) en lugar de 0.0040 g (0.040/10).

La diferencia, 0.00008 g es la cantidad de sosa que le falta a cada ml de la solución preparada.

Esta cantidad se multiplica por los ml de sosa preparados, ejemplo: 800 ml, y se obtienen los gramos que corresponde agregar ($800 \times 0.00008 = 0.064 \text{ g}$ ó 64 miligramos) de sosa. Sin embargo, debe considerarse nuevamente la higroscopía de la sosa y adicionar, conforme a la experiencia, 6-7% más de sosa.

Después de agregar la sosa, se agita y titula nuevamente hasta obtener la correspondencia exacta de volumen entre las soluciones.

III. PROCEDIMIENTOS DE ELABORACION

Contenido

- 3.1 Procedimiento industrial
 - 3.1.1 Depuración de la leche
 - 3.1.2 Estandarización de la leche
 - 3.1.2.1 Descreadoras o desnatadoras
 - 3.1.2.2 Estandarizadora
 - 3.1.2.3 Factores que afectan el porcentaje de grasa en la crema
 - 3.1.2.4 Grasa en el queso
 - 3.1.2.5 Cuadrado de Pearson
 - 3.1.2.6 Método de substitución
 - 3.1.2.7 Sistema de Ecuaciones Simultáneas
 - 3.1.2.8 Anexo. Determinación de sólidos totales. Determinación de humedad. Determinación de grasa en leche descremada, agua, suero y crema
 - 3.1.3 Reducción del contenido microbiano de la leche. Pasteurización
 - 3.1.3.1 Fundamentos teóricos del calentamiento de la leche
 - 3.1.3.1.1 Temperatura y duración del calentamiento
 - 3.1.3.1.2 Tipo y número inicial de gérmenes
 - 3.1.3.1.3 Acidez de la leche
 - 3.1.3.1.4 Movimiento de la leche y velocidad de la transmisión de calor en los aparatos
 - 3.1.3.2 Pasteurización en quesería
 - 3.1.3.3 Control de la pasteurización
 - 3.1.4 Leche de quesería
 - 3.1.5 Adición de cloruro de calcio
 - 3.1.6 Adición de colorante
 - 3.1.7 Adición de fermentos lácticos
 - 3.1.7.1 Crecimiento bacteriano
 - 3.1.7.1.1 Factores de crecimiento
 - 3.1.7.1.2 Curva de crecimiento
 - 3.1.7.2 Preparación de los fermentos
 - 3.1.7.2.1 Consideraciones previas

- 3.1.7.2.2 Bacterias productoras de ácido láctico
- 3.1.7.2.3 Selección y adquisición del cultivo conveniente
- 3.1.7.2.4 Lugar de trabajo
- 3.1.7.2.5 Fermento madre
 - 3.1.7.2.5.1 Selección de la leche
 - 3.1.7.2.5.2 Tratamiento térmico de la leche
 - 3.1.7.2.5.3 Inoculación e incubación de la leche
- 3.1.7.2.6 Fermento industrial
- 3.1.7.3 Inhibición de los cultivos lácticos
 - 3.1.7.3.1 Técnica defectuosa
 - 3.1.7.3.2 Cuasas intrínsecas
 - 3.1.7.3.3 Cepas de bacterias lácticas que producen sustancias inhibidoras
 - 3.1.7.3.4 Presencia de antibióticos y antisépticos
 - 3.1.7.3.5 Bacteriófagos
- 3.1.7.4 Procedimientos de control y evaluación
- 3.1.7.5 Adición de fermentos lácticos a la leche de quesería
- 3.1.8 Proteínas y coagulación de la leche
 - 3.1.8.1 Proteínas
 - 3.1.8.2 Dispersión coloidal y micelas
 - 3.1.8.3 Materias nitrogenadas de la leche. Caseína
 - 3.1.8.3.1 Composición y estructura de las caseínas
 - 3.1.8.3.2 Síntesis de proteínas. Resumen
 - 3.1.8.4 Estructura de las micelas de la leche
 - 3.1.8.5 Coagulación
 - 3.1.8.5.1 Consideraciones previas. Propiedades de las caseínas
 - 3.1.8.5.2 Aspectos tecnológicos
 - 3.1.8.5.2.1 Coagulación láctica
 - 3.1.8.5.2.1.1 Factores de coagulación láctica
 - 3.1.8.5.2.1.2 Características del gel láctico
 - 3.1.8.5.2.2 Coagulación por acción del cuajo

- 3.1.8.5.2.2.1 Cuajo
- 3.1.8.5.2.2.2 Factores que influyen en la coagulación de la leche por el cuajo
- 3.1.8.5.2.2.3 Características de las cuajadas enzimáticas

- 3.1.8.5.2.3 Coagulación mixta
- 3.1.8.5.2.4 Coagulación de la leche de quesería
- 3.1.8.5.2.5 Funciones y ventajas de la producción de ácido láctico

3.1.9 Tratamiento y manipulación de la cuajada

3.1.9.1 Desuerado

- 3.1.9.1.1 Factores que intervienen en el desuerado y en los procesos microbiológicos que se desarrollan en la cuajada

- 3.1.9.1.1.1 Corte de cuajada
- 3.1.9.1.1.2 Agitación
- 3.1.9.1.1.3 Intervención de la temperatura
- 3.1.9.1.1.4 Intervención de la acidificación

- 3.1.9.1.2 Comportamiento y función de los constituyentes mayores de la materia seca del coágulo en el curso del desuerado

- 3.1.9.1.3 Características y composición del suero

- 3.1.9.1.3.1 Proteínas del suero

- 3.1.9.2 Malaxado
- 3.1.9.3 Enfriado
- 3.1.9.4 Pesado
- 3.1.9.5 Salado
- 3.1.9.6 Trenzado
- 3.1.9.7 Envasado
- 3.1.9.8 Refrigeración
- 3.1.9.9 Anexo (pH)

3.2 Procedimiento rústico

- 3.2.1 Introducción
- 3.2.2 Aparatos y equipo
- 3.2.3 Materiales y reactivos para la determinación de acidez

- 3.2.4 Aditivos
- 3.2.5 Otros
- 3.2.6 Procedimiento
 - 3.2.6.1 Depuración de la leche
 - 3.2.6.2 Estandarización de la leche
 - 3.2.6.3 Maduración de la leche
 - 3.2.6.4 Coagulación de la leche
 - 3.2.6.5 Tratamiento y manipulación de la cuajada

La actividad humana ligada a la elaboración de queso se pierde en la historia. Numerosas variedades, aparecidas en casi todas partes del mundo, se conservan por sus mejores cualidades como tradición cultural y deleite insuperable.

Los progresos científicos han evolucionado las técnicas rústicas de elaboración, pero siempre respetuosos de las características esenciales del queso, para no dar lugar a una nueva variedad, producto de la tecnología. Por ello, el procedimiento industrial (científico) y el rústico (empírico) se confunden en su esencia para llegar al mismo producto: Queso Oaxaca.

La descripción del procedimiento industrial (por breve que ésta sea), es siempre más extensa que la del rústico; precisamente su carácter técnico exige mayor profundidad y exactitud en algunos puntos, lo que aprovecharemos para comprender mejor el procedimiento rústico y no ser repetitivos en su descripción.

3.1 PROCEDIMIENTO INDUSTRIAL

3.1.1 Depuración de la Leche

Antes de aplicar cualquier tratamiento, hay que eliminar todas las impurezas que pudieran encontrarse en la leche; varios procedimientos físicos se emplean para depurarla, siendo la filtración uno de los más comunes.

La filtración debe realizarse en la fábrica como primera operación de los procedimientos de industrialización.

Sin embargo, no es común que la leche se industrialice inmediatamente después de ordeñada; durante el tiempo que media para ello, la leche se almacena, refrigera, transporta, etc. pudiendo aumentarse, en muchos casos, la carga microbiana inicial; por ello, cuando la ordeña se realiza en condiciones de limpieza insuficientes y se sabe que el tiempo y manipulaciones siguientes comprometen la calidad de la leche, muchos autores aconsejan filtrarla inmediatamente después de la ordeña.

La filtración de la leche puede limitar "los daños", pero en ningún caso corrige los defectos de un ordeño mal realizado. Tiene como finalidad eliminar las impurezas visibles; pelos, partículas de excrementos, partículas vegetales y polvo, que caen en los recipientes durante el ordeño o que ya se encuentran en ellos. (1)

La filtración, por muy cuidadosa que sea, no elimina en lo más mínimo los microbios diseminados en la leche. Al contrario, el paso del líquido a través de la superficie del tamiz, recubierta rápidamente de una capa de impurezas, conduce a menudo al aumento del número de gérmenes (...). Por otro lado, se comprueba, sobre todo cuando la filtración se repite muchas veces, que los aglomerados microbianos, los fragmentos de excrementos, se disgregan y contribuyen de este modo a aumentar aun más la carga microbiana de la leche. Finalmente, el filtro constituye frecuentemente una fuente de contaminación en razón de las dificultades de desinfección. (89)

La leche puede someterse a filtración, según los distintos criterios: a) antes de llegar a la planta: en algunas máquinas ordeñadoras o después de la ordeña, y b) en la planta procesadora: como depuración de la leche; durante el descremado y/o estandarización; o por filtros que forman parte de los pasteurizadores. Esto se debe a que la filtración es más rápida en calor que en frío; la operación se realiza después de un precalentamiento a 40-45°C en un calentador o en el intercambiador de calor del pasteurizador (los márgenes de temperatura más convenientes para la filtración son de 32 a 60°C; 54)

En la planta, la depuración de la leche puede realizarse:

- Empleando filtros de diferentes tejidos y de grosor variable (celulosa, nylon, etc.) perfectamente esterilizados y colocados generalmente sobre los recipientes de las básculas en la recepción.
- Empleando tamices metálicos de malla tupida, filtros de algodón comprimido, de tejidos de nylon, etc. de preferencia desechables o que se emplean por pares para no interrumpir el trabajo mientras uno de ellos se higieniza.
- Empleo de fuerza centrífuga. Clarificación.

La depuración centrífuga permite, contrariamente a la filtración, un trabajo regular y continuo. La eliminación de las impurezas es más completa; (89) separa partículas de hasta 4-5 micras de diámetro. (78)

La clarificadora, clarificador o higienizadora, es la máquina empleada para aplicar fuerza centrífuga a la leche y por medio de aquella, eliminar de ésta las partículas extrañas que llevara, (43) tales como leucocitos, eritrocitos, pe-los, etc. que tienen mayor peso específico que la leche y se desplazan hacia la periferia en el momento de la centrifugación y se separan de la leche.

Las clarificadoras son semejantes, en construcción y principio a las desnatadoras (ver inciso siguiente). La clarificación puede aplicarse indistintamente a la leche caliente o a la fría, pero se considera generalmente que se obtienen los mejores resultados entre los 32-48" C. (54)

En las clarificadoras la leche se hace girar en el interior de la máquina (con platillos o sin ellos) entre 3,000 y 4,000 rpm o más y las impurezas forman un lodo grisáceo que se acumula en las paredes del tambor giratorio.

Como las descremadoras, las depuradoras centrífugas comprenden tres tipos: abiertas, semicerradas y herméticas. Las dos últimas evitan la producción de espuma en la leche de purada. Los aparatos herméticos, al trabajar enteramente al abrigo del aire, no empobrecen la leche en gas carbónico y le permiten conservar su estabilidad fisicoquímica. (89) (La pérdida de gas carbónico altera el equilibrio de las sales minerales)

El mantenimiento e higienización de estas máquinas debe ser muy cuidadoso; algunos diseños recientes de los clarificadores permiten la eliminación continua de la suciedad durante la operación. Esto elimina la necesidad de parar la máquina a fin de abrir la cuba para eliminar este material. (91) El barro o lodo debe destruirse debido a su enorme riqueza microbiana. La destrucción puede consistir en su combustión o el empleo de lejía de sosa concentrada y vapor.

La depuración centrífuga presenta algunos inconvenientes:

La clarificación, sostiene los que no son partidarios de ella, destruye la línea de crema.

En realidad, la línea de crema sí se afecta, aunque ligeramente, y el grado de destrucción de esta propiedad, depende de la temperatura a que se someta la leche al clarificarla (entre 34-36° al descenso del volumen de crema es casi imperceptible); sin embargo, la filtración tiene un efecto similar. (43)

Como la intensa acción mecánica desmembra las grandes colonias microbianas y las pequeñas o los gérmenes aislados resultantes no muestran una gran capacidad de desarrollo, la leche purificada de esta forma debe esterilizarse inmediatamente. (78)

Respecto a que la leche clarificada da, en algunos casos, cuentas bacterianas más altas, sí es posible; no quiere decirse que el proceso en sí aumente el número total de gérmenes, pero lo que sí puede ocurrir, es que al desintegrar se una partícula grande en otras más pequeñas, al hacerse una siembra en placa, cada subpartícula dará origen a una colonia; entonces sí puede dar una cuenta de colonias mayor, aunque el número actual de gérmenes en la leche sea mucho menor. (43)

Además, cuando se aplica a leches un poco ácidas puede provocarse una disminución del extracto seco. La caseína coagulada puede ser retenida, en el recipiente, junto con los lodos. (89)

3.1.2 Estandarización de la Leche

La elaboración de queso tipo Oaxaca, requiere leche con alto contenido de materia grasa; esto se debe a las características del proceso de fabricación. Parte de la grasa contenida en la cuajada se separa durante el malaxado, por ello es necesario partir de leche entera.

En 1976, la leche con un contenido mínimo de 32 g/lit de grasa propia de la leche (Método Gerber; 82), se consideraba entera. Posteriormente, en abril de 1978 un decreto (82) reforma la fracción II del artículo 14 del Reglamento para el Control Sanitario de la Leche, (82) considerando, en tercer lugar, "que una reducción de 32 a 30 gramos por mil de la grasa propia de la leche, no es relevante ni incide en la nutrición, pero sí permitirá el autoabastecimiento de la misma, así como una importante reducción de los gastos de importación de dicha grasa(...)".

La elaboración de queso tipo Oaxaca requiere una leche con un porcentaje graso ligeramente inferior a los 30 g/lit de la leche considerada entera, pero definitivamente mucho menor que el contenido graso promedio de leches de composición normal, considerado entre 34 y 45 g/lit (inciso 2.2.4),

por ello es necesario normalizar la leche extrayéndole la grasa adicional.

La estandarización consiste, como su nombre lo indica, en uniformizar el producto, en este caso uno de sus componentes: la grasa. (43) Esto puede lograrse mediante el empleo de máquinas descremadoras o estandarizadoras.

3.1.2.1 Descremadoras o desnatadoras

También llamadas separadoras, son máquinas que basadas en el principio de la fuerza centrífuga, permiten obtener la nata o crema por un lado y la leche descremada, desnatada o magra por otro. La estandarización se consigue mezclando nuevamente los dos componentes en proporción adecuada.

Desnatado de la leche. Fundamentos teóricos

La emulsión de grasa en agua es la parte más inestable del sistema polidisperso constituido por la leche, porque se trata de una suspensión y porque la densidad de la grasa difiere notablemente de la correspondiente al resto del líquido (densidad de la grasa: 0.930 g/ml; densidad plasma lácteo: 1.035 g/ml). La inestabilidad de la emulsión se aprovecha para separar la grasa del plasma. Para ello son posibles teóricamente dos procedimientos, el desnatado natural y el mecánico. (78)

a) Desnatado natural

Interviene principalmente la fuerza de gravedad; la grasa asciende lentamente hacia la superficie durante el reposo. Esta forma de descremado ya no es usual por presentar muchos inconvenientes. (Ver 3.2.6.2)

b) Desnatado mecánico

Para aumentar aún más la velocidad de desplazamiento de los glóbulos grasos se recurre a la fuerza centrífuga en lugar de utilizar la gravedad. En oposición al desnatado natural, en el que las fuerzas actúan verticalmente, en el mecánico se produce un desplazamiento en sentido horizontal. (78)

Cuando se somete la leche a muchas revoluciones por

minuto (6000-7000 o más), sus componentes se comportan de manera distinta; diremos simplemente que como resultado de los fenómenos físicos que tienen lugar en el interior del aparato, la grasa láctea se dirige al centro de rotación y de ahí se le conduce a una salida individual; y el resto de los componentes de la leche se dirigen a las paredes del tambor giratorio, donde también se recolectan y conducen a otra salida: la de la leche descremada.

Las desnatadoras centrífugas desnatan y purifican al mismo tiempo. Se diferencian en lo esencial por la forma en que circula la leche (semiherméticas, herméticas) y en las que se separan las impurezas (autodepuradoras y no autodepuradoras) (78) y las distintas ventajas y/o desventajas que puede presentar cada modalidad (producción de espuma, homogeneización de la leche, etc.).

3.1.2.2 Estandarizadoras

Las estandarizadoras se basan en el mismo principio y son básicamente separadoras a las que se ha añadido una válvula que mezcla proporcionalmente la grasa con la leche descremada (43) (se obtiene crema por un lado y leche clarificada y estandarizada por otro).

3.1.2.3 Factores que afectan el porcentaje de grasa en la crema

Además del tornillo regulador hay por lo menos seis factores más que afectan el contenido de grasa en la crema, entre ellos están: (48)

a) Velocidad de la descremadora

Se asume que los otros factores permanecen constantes. A mayor velocidad, la crema será más rica o sea que tendrá un mayor porcentaje de grasa. (48) Sin embargo, tampoco debe exceder cierto límite.

b) Temperatura

El calentamiento mejora la eficacia de la descremadora al fluidificar la leche y de este modo facilitar la separación de los glóbulos grasos. (89) La leche puede llevarse a 30-40° con ayuda

de calentadores o desviándola después de que ha pasado por la sección de intercambio de calor del pasteurizador.

El descremado a bajas temperaturas (7-8°C), favorece la formación de gruesos racimos de glóbulos, que se rompen con la velocidad de giro, provocando una homogeneización parcial. (1)

El desnatado de la leche a temperaturas más bajas da una crema más viscosa, pero se queda mucha materia grasa en la leche desnatada. (1)

c) Riqueza en grasa de la leche

Afecta directamente el porcentaje de grasa de la crema obtenida; a mayor porcentaje de grasa en la leche mayor grasa en la crema.

(...) en todas las leches existe una proporción más o menos importante de glóbulos (grasos) muy finos (diámetro de 1 a 2 micras) prácticamente imposible de separar a las velocidades de rotación habituales de los tambores de las descremadoras. Este fenómeno explica por qué la leche descremada nunca se ve completamente libre de grasa, conteniendo siempre una pequeña cantidad de grasa residual (0.03-0.04%) aun cuando el descremado se realice correctamente. (89)

Numerosos trabajos han demostrado que los resultados del descremado varían con la raza de los animales productores de leche. Es una consecuencia del tamaño diferente de los glóbulos grasos, los más grandes se separan más fácilmente. (89)

d) Cantidad o razón en que la leche entra a la descremadora.

Debe ser el estipulado para la máquina en cuestión; cantidades mayores o menores traen consigo un descremado deficiente.

e) Cantidad de agua o leche descremada que se usa para enjuagar la máquina al final del descremado.

f) Cantidad de sedimento acumulado en el tambor.

El exceso hace que parte de la leche descremada vaya a salir con la crema. (48)

Una leche ácida y sucia deja en el tambor un depósito

importante de todos que interfieren la circulación de la leche descremada al grado de obligarle, después de cierto tiempo de funcionamiento del aparato, a escapar por los orificios de salida de la crema. (89)

La utilización óptima de estas máquinas, al igual que las clarificadoras, se logra cuando se siguen correctamente las instrucciones del fabricante (alimentación y velocidad correctas, desmonte y lavado cuidadosos después de cada descremado para eliminar los residuos, etc.).

3.1.2.4 Grasa en el queso

La cantidad de grasa que pasa al queso depende de muchos factores. Los glóbulos grasos que pasan en mayor proporción al queso son los de dimensiones medias, seguidos de los de diámetro reducido los de menor rendimiento quesero son los de mayor diámetro. Este hecho se debe a que al coagular la leche, y especialmente si la coagulación es lenta, los glóbulos grasos de mayor diámetro ascienden a la superficie para formar la nata, no se incorporan a la cuajada y pasan al suero, y a que los de menor diámetro no son siempre retenidos por la cuajada durante su tratamiento y son arrastrados en cierta extensión por el suero. Si la leche se homogeneiza los glóbulos grandes se reducen de tamaño y descienden las pérdidas de grasa con el suero, aumentando así el rendimiento quesero de la grasa, por lo que se recomienda homogeneizar la leche que vaya a destinarse a la fabricación de queso. (13)

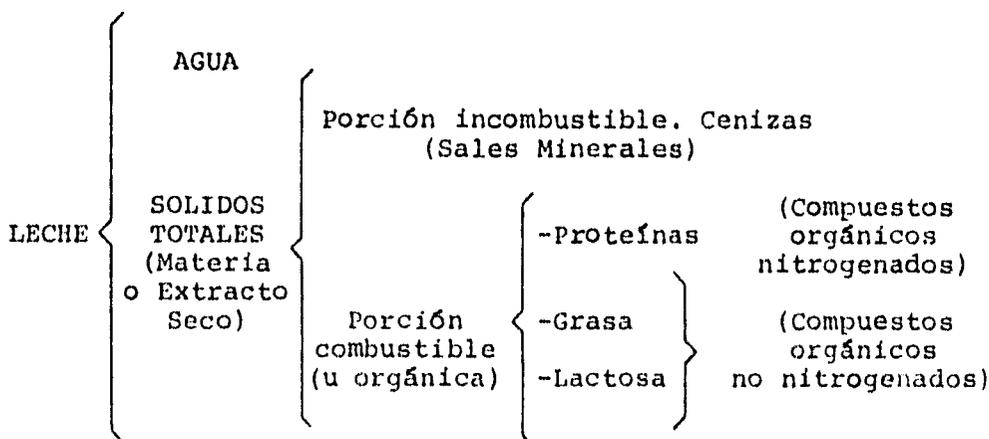
El rendimiento en grasa está relacionado con las particularidades tecnológicas que concurren en la fabricación de cada tipo de queso. (13)

Contribuyen a ello la homogeneización y pasteurización de la leche (si se pasteuriza la leche, las partículas de grasa con el suero disminuyen; 13), el tiempo de coagulación (mientras más lenta más grasa pasa al suero), tamaño del grano al cortar la cuajada (los granos mayores incrementan el rendimiento), tratamiento que se dé a la cuajada (calentamiento, reposo, forma de batido, etc.), relación que guarden en la leche el contenido en grasa y caseína, etc.; por eso la cantidad de grasa que debe tener la leche para la elaboración de queso, se determina con un estudio de seguimiento en que se cuantifican las pérdidas que ocurren durante el proceso de elaboración.

Mediante un ejemplo de índole práctica, seguiremos el

curso de la grasa láctea en la elaboración de queso tipo Oaxaca, para cuantificar los dos principales momentos en que se reduce el contenido graso; y poder establecer con cierta aproximación el porcentaje graso requerido en la leche:

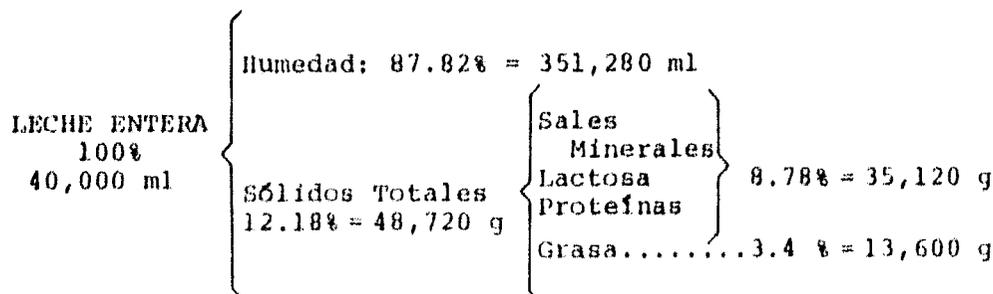
Disponemos de 400 litros de leche para elaborar queso Oaxaca. Por motivos de análisis, distribuimos los componentes de la leche de la siguiente manera:



Siguiendo la división anterior, la leche fluida empleada en nuestro ejemplo tiene la siguiente composición en humedad y sólidos totales (datos obtenidos en el laboratorio según la metodología descrita en 3.1.2.8):

Humedad:	351.2 litros =	87.82%	=	351,280 ml
Sólidos Totales:	48.7	=	12.18%	= 48,720 ml
LECHE: 400.0 litros = 100.00% = 400,000 ml				

La leche posee un 3.4% de materia grasa, determinada por el Método de Gerber (2.3.5) como parte de las pruebas de evaluación. Si 100 ml de leche poseen 3.4% de grasa, en 400,000 ml habrá 13,600 gramos (regla de tres); el resto de los sólidos totales (12.18 - 3.4 = 8.78%) corresponde a sales minerales, lactosa y proteínas, lo que hace un total de 32,120 g.



En la planta, la leche se descrema parcialmente y se obtiene crema y leche para elaborar queso, cuyo contenido graso se repartirá, durante el procedimiento, de la manera siguiente:

$$\text{GRASA} = 13,600 \text{ g} \left\{ \begin{array}{l} \text{- Grasa de la crema} \\ \text{- Grasa de la leche de elaboración} \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \text{-Grasa del queso} \\ \text{-Grasa del suero} \\ \text{-Grasa del agua del malaxado} \end{array} \right.$$

Los porcentajes de grasa respectivos se determinan a partir de una muestra representativa del suero extraído (280 lt aproximadamente) y del agua utilizada y separada de la pasta durante el malaxado (40 lt aproximadamente) por el Método de Gerber (ver 3.1.2.8):

Suero = 1.5% de grasa

Agua = 3.9% de grasa

Si en 100 ml de suero hay 1.5 g de grasa, en 280 lt hay 4,200 g de grasa; si en 100 ml de agua hay 3.9 g de grasa, en 40 lt hay 1,560 g de grasa.

Significa que durante el proceso de elaboración de queso Oaxaca a partir de 400 lt de leche, se separan de la cuajada 5,760 g de grasa láctea.

Posteriormente, se analiza el porcentaje graso de la crema obtenida en el desnatado: 57.5% (Método de Gerber: 3.1.2.8) en un total de 4.5 lt de crema; lo que quiere decir que si en 100 ml de crema hay 57.5 g de grasa láctea, en 4,500 ml habrá 2,587.5 g, completándose así las cantidades de grasa que no pasan al queso.

Al final de la producción se obtienen 22.83 Kg de queso; el análisis de la grasa en el queso por el Método Rossse Gotlieb (ver 4.1.5) demuestra contener 23% de grasa en base húmeda, que sabemos es el mínimo porcentaje graso que debe poseer el queso tipo Oaxaca.

Si en 100 g de queso hay 23 g de grasa, en los 22,830 g hay 5,251 g.

Conociendo el curso que sigue la grasa en la elabora-

ción del queso Oaxaca y las cantidades que finalmente quedan repartidas en el queso, grasa del suero y grasa del agua del malaxado, obtenemos un total de 11,011 g de grasa en la leche semidescremada (queso: 5,251, suero: 4,200, agua: 1,560); cantidad que coincide ampliamente con la obtenida por diferencia entre la grasa total (leche entera: 13,600 g) y la grasa que pasó a la crema (2,587 g), que es 11,012.5 gramos.

Nos resta determinar el porcentaje que representan los 11,012.5 g de los 395.5 lt de leche descremada parcialmente para la elaboración de queso:

Si el 100% lo constituyen los 395,500 ml, 11,012.5 corresponden a 2.78%, por lo que podemos concluir, con cierta aproximación, que la leche para elaborar queso tipo Oaxaca debe poseer un mínimo de 2.78% de grasa propia de la leche.

Este porcentaje puede ajustarse en la leche automáticamente cuando se emplea una máquina estandarizadora; no ocurre lo mismo cuando se emplea una máquina descremadora sencilla que proporciona leche descremada por un lado y crema por otro. Debemos reincorporar parte de la crema a la leche para ajustar (estandarizar o normalizar) el porcentaje requerido, con la posible desventaja de no lograr una distribución uniforme de la grasa. El cálculo de las proporciones de mezcla puede realizarse siguiendo cualquiera de los procedimientos siguientes:

3.1.2.5 Cuadrado de Pearson

El cuadrado de Pearson se trabaja con datos en Base Húmeda, es decir, determinaciones sencillas de grasa que se obtienen en la práctica, rápidamente por el Método de Gerber; sin embargo, hay que tener presente, según hemos visto, el volumen de litros que se trabajan diariamente.* De acuerdo con esta cantidad de leche y si se sigue siempre la misma técnica de elaboración de queso Oaxaca, serán más o menos constantes:

- La cantidad de suero que se libera de la cuajada y su contenido porcentual de grasa.

*Si desean efectuarse los cálculos en Kg, deberá conocerse la densidad de la leche y multiplicarla por el número de litros (Ejemplo: 400 lt; densidad = 1.031; la multiplicación proporciona 412.4 Kg).

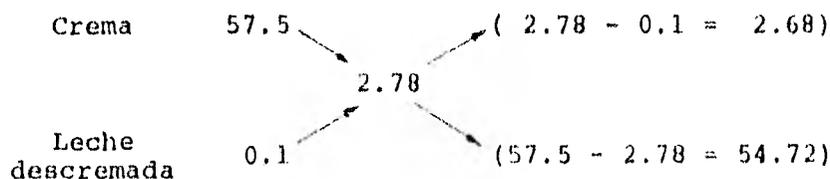
- El volumen de pasta a malaxar y la cantidad de agua caliente que se utiliza rutinariamente.
- El porcentaje de grasa que se desprende con el agua del malaxado.
- El porcentaje graso final del queso.

No obstante, periódicamente deben hacerse mediciones para confirmar la cantidad de grasa que se separa en cada uno de estos pasos, así como la determinación del porcentaje de grasa que queda en el producto final. Así podrá tenerse la seguridad de que el porcentaje graso de la leche de elaboración es el adecuado.

Retomando el ejemplo anterior, tenemos 400 lt con 3.4% de grasa (Método de Gerber) y queremos reducir dicho porcentaje a 2.78%.

Si descremamos los 400 lt de leche obtenemos, por un lado 377 lt de leche con un porcentaje graso mínimo de 0.1% (Método de Gerber: 2.3.5) y por otro 22.95 lt (23 lt) de crema con 57.5% (Método de Gerber: 3.1.2.8). El Cuadrado de Pearson nos da las proporciones en que deben mezclarse los dos elementos; siempre debe haber uno que tenga un porcentaje mayor que el que se desea obtener, en este caso, la crema con 57.5% de grasa, y otro que posea un porcentaje menor (0.1% de la leche descremada). Una mezcla adecuada de ambos deberá darnos una leche que posea 2.78% para la elaboración de queso Oaxaca.

En un extremo del cuadrado se colocan los ingredientes disponibles y su porcentaje graso; en el centro se coloca la cifra deseada y se resta diagonalmente siempre el menor del mayor:



Las cantidades obtenidas: 2.68 y 54.72 nos indican las proporciones en que deben mezclarse los dos ingredientes. Si consideramos entonces que por cada 2.68 partes de crema de bemos adicionar 54.72 partes de leche descremada, tendremos un total de $2.68 + 54.72 = 57.40$, que es 100%. Ahora debemos saber qué porcentaje representa cada una de las cifras obtenidas.

Si 57.40 es el 100%, ¿qué porcentaje corresponde a 2.68? Por regla de tres obtenemos: 4.66% para 2.68 y 95.38% para 54.72; lo que quiere decir que de cada 100 partes, 95.33 deben ser de leche descremada y 4.66 deben ser de crema.

Si los 377 lt de leche descremada representan el 95.33%, el 4.66% restante se completa agregando 18.42 lt de crema (regla de tres), lo que hace un total de 395.42 lt (377 sumados a 18.42) de leche para elaborar queso Oaxaca; con un total de 10,968.5 g de grasa:

Si 100 ml de leche descremada poseen 0.1 g, 377,000 ml contienen 377 g; si 100 ml de crema poseen 57.5 g de grasa 18,420 contienen 10,591.5; la suma de las dos cantidades nos da 10,968.5 g de grasa que representan el 2.77% del total de leche (395,420 ml) para elaborar queso Oaxaca.

La grasa extraída ($23.0 - 18.42 = 4.58$) constituye la línea de recuperación de la fábrica por ser la materia prima para la elaboración de mantequilla, cremas u otros productos a base de crema.

3.1.2.6 Método de substitución

Este método, muy diferente del Cuadrado de Pearson, sirve para calcular la cantidad de crema que debe substituirse, no adicionarse, a la leche descremada; al igual que en el método anterior, la leche puede ser total o parcialmente descremada.

Para balancear nuestros ingredientes, establecemos la cantidad de grasa requerida (2.78%) y se compara con la cantidad que proporciona la leche descremada (0.1% en el caso de la descremadora empleada de nuestro ejemplo). La crema con su alto porcentaje graso será el ingrediente de substitución.

El descremado "total" de los 400 lt de leche, como se anotó para el ejemplo anterior, proporciona 377 lt de leche descremada (0.1%) y 23 lt de crema con 57.5% de grasa.

Si los 377 lt de leche descremada constituyeran el 100% de la cantidad de leche a transformar, tendríamos un déficit en el porcentaje de grasa de 2.68 ($2.78 - 0.1 = 2.68\%$).

Al substituir un litro de leche descremada por un litro de crema, quitamos 1 g de grasa pero adicionamos 575 g lo que resulta en una ganancia neta de 574 g con cada litro de

substitución ($0.575 - 0.001 = 0.574$ Kg de grasa).

Para calcular el número de litros de leche descremada que deben ser substituidos por crema, se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Déficit en Kg de grasa}}{\text{Diferencial de substitución}}$$

El déficit de grasa = 2.68

El diferencial de substitución = la cantidad adicional que se obtiene después de substituir 1 litro de leche descremada por 1 litro de crema, es decir, 0.574 Kg.

Substituyendo:

$$\frac{2.68}{0.574} = 4.66$$

Así, de cada 100 litros de leche descremada, debemos substituir 4.66 litros por crema, quedando únicamente 95.34 litros de leche descremada, para obtener el porcentaje de grasa deseado:

Leche descremada:	$95.34 \times 0.001 = 0.095$
Crema:	$4.66 \times 0.575 = 2.67$
	<hr/>
	100.00 2.765

Si de cada 100 lt deben substituirse 4.66, en 377 deberán substituirse 17.56 (regla de tres).

Comprobación:

Leche descremada	:	359.44 lt	$\times 0.001 =$	0.359
Crema	:	17.56 lt	$\times 0.575 =$	10.101
				<hr/>
Leche de elaboración:		377.00 lt		10.460 Kg

Los 10,460 g divididos entre 377,000 ml y multiplicados por 100, nos dan el porcentaje que representa la grasa: 2.77%.

La estandarización de la leche por este método, disminuye el volumen de leche de elaboración; además de crema (23 - 17.56 = 5.44 lt), proporciona una cantidad de leche descremada igual a los litros de crema de substitución (17.56 lt). Parte de esta leche puede emplearse en la elaboración

de fermentos lácticos. (Ver 3.1.7)

3.1.2.7 Sistema de Ecuaciones Simultáneas

Para facilitar y dar elasticidad a los cálculos, es conveniente establecer las proporciones de mezcla en base a 100 lt y luego ajustar a la cantidad deseada.

Leche descremada = X

Crema = Y

1a. Ecuación: $x + y = 100$

Con los datos obtenidos en el laboratorio del porcentaje graso de la leche descremada y la crema se establece la segunda ecuación:

Leche descremada = 0.1% = 0.001

Crema = 57.5% = 0.575

2a. Ecuación: $0.001 x + 0.575 y = 2.78$

Sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} x + y &= 100.0 \\ 0.001 x + 0.575 y &= 2.78 \end{aligned}$$

La resolución de un Sistema de Ecuaciones de dos incógnitas puede obtenerse por varios métodos: reducción o suma y resta; sustitución; igualación; método gráfico; determinantes o regla de Kramer, Gauss Jordan, etc., para lo cual remitimos al lector a los textos de álgebra.

Resolución por determinantes:

Valor de X

$$x = \frac{\begin{vmatrix} 100 & 1 \\ 2.78 & 0.575 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} 1 & 1 \\ 0.001 & 0.575 \end{vmatrix}} = \frac{57.5 - 2.78}{0.575 - 0.001} = \frac{54.72}{0.574} = 95.33$$

El valor de Y (crema) puede obtenerse por diferencia de 100 (siendo $x + y = 100$), substituyendo el valor de x en cualquiera de las dos ecuaciones del sistema, o estableciendo su resolución por determinantes:

$$y = \frac{\begin{vmatrix} 1 & 100 \\ 0.001 & 2.78 \\ 1 & 1 \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} 0.001 & 0.575 \end{vmatrix}} = \frac{2.78 - 0.1}{0.575 - 0.001} = \frac{2.68}{0.574} = 4.66$$

(Este último planteamiento, no es otra cosa que el método de sustitución descrito anteriormente).

Substitución de los valores obtenidos y comprobación del sistema de ecuaciones:

$$x = 95.33$$

$$y = 4.66$$

$$\left. \begin{array}{l} 95.33 \quad + \quad 4.66 \quad = \quad 99.99 \\ 95.33 (0.001) + 4.66 (0.575) = 2.77 \end{array} \right\}$$

	Litros	%	Total
Leche descremada:	95.33	0.001	0.0953
Crema:	4.66	0.575	2.679
Leche de elaboración:	100.00		2.7743

Conociendo las cantidades a substituir en 100 lt, por regla de tres se obtienen las cantidades proporcionales para 377 lt, como se procedió en el método de substitución.

3.1.2.8 Anexo

Determinación de Sólidos Totales. Determinación de Humedad. Determinaciones de Grasa en Leche Descremada, Agua, Suero y Crema.

A) Determinación de Sólidos Totales o Extracto Seco (ver 2.5)

Fundamento

Esta prueba se basa en la pérdida de humedad de un alimento (pérdida que sufre al calentarlo como máximo a la temperatura de ebullición del agua) y la pérdida de materia volátil expulsada a la temperatura utilizada en el ensayo.

La materia restante corresponde al extracto seco o sólidos totales.

Aparatos y equipo:

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Horno o estufa eléctrica con control de temperatura
- Cápsulas de porcelana o cristalizadores de vidrio con tapa, de 5, 8 o 10 cm de diámetro
- Pinzas para crisol
- Desecador de vidrio y desecante (puede emplearse sílica gel con colorante; cuando disminuye la intensidad del colorante, quiere decir que está muy húmeda; puede reemplazarse o secarse en la estufa)
- Dispositivo para baño maría

Materiales:

- Pipeta bacteriológica de 10 ml
- Tubo de ensaye con capacidad mayor a 10 ml

Procedimiento:

La prueba debe hacerse por duplicado.

Pesar 2.5 a 3 g (ml) de la muestra de leche obtenida según 2.2.2, en una cápsula de porcelana o cristalizador de vidrio previamente tarado.

Calentar en baño de agua hirviendo durante 10 a 15 minutos. Pasar a la estufa durante 3 horas a 98-100°C. Pasar la cápsula o cristalizador al desecador con las pinzas para crisol y dejar enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente (15-30 minutos); pesar rápidamente y anotar.

Cálculos y resultados:

$$\% ST = \frac{(P - P_1)}{P_2} \cdot 100$$

donde:

- P = peso del recipiente con la muestra seca
- P₁ = peso de la cápsula
- P₂ = peso de la muestra

La máxima diferencia permisible entre dos determinaciones no debe ser mayor de 0.1%, en caso contrario deberá repetirse la prueba.

B) Determinación de Humedad

1. Puede obtenerse simplemente restando de 100 el porcentaje de sólidos totales obtenidos.

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \% \text{ ST}$$

2. Puede determinarse siguiendo el mismo procedimiento indicado para los sólidos totales, pero corrigiendo la fórmula para cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_m - P_s}{M} 100$$

donde:

P_m = peso de la cápsula y de la muestra húmeda en gramos

P_s = peso de la cápsula y la muestra seca en gramos

M = peso de la muestra en gramos

C) Técnica para la Determinación de Grasa en la Leche Descremada y Suero. Método de Gerber

Debe seguirse el procedimiento descrito en 2.3.5, pero utilizando un butirómetro para leche descremada.

D) Determinación de Grasa en Crema. Método de Gerber

La técnica de determinación es prácticamente la misma que se describe para la leche entera en 2.3.5:

- a) Es necesario utilizar un butirómetro para crema;
- b) Pesar directamente dentro del butirómetro previamente tarado, $5 \text{ g} \pm 0.005 \text{ g}$ de crema. Colocar el tapón dentro del tubo y agregar agua a $15-20^\circ\text{C}$ hasta aproximadamente $4/5$ partes del tubo (si se agrega menos cantidad de agua,

la lectura no puede hacerse porque el nivel de grasa queda abajo de la escala del butirómetro);

c) Continuar igual que si fuera leche entera.

3.1.3 Reducción del Contenido Microbiano de la leche. Pasteurización

Todos los tratamientos destinados a reducir el contenido microbiano de la leche deben cumplir los requisitos siguientes: (78)

- El efecto germicida (porcentaje de gérmenes destruidos o eliminados) ha de ser superior al 99% y si se trata de gérmenes patógenos, el 100%.
- La leche debe ser tratada con moderación para que conserve en la mayor medida posible sus principios nutritivos, así como sus propiedades organolépticas (carácter de la leche cruda).
- La rentabilidad del sistema debe ser adecuada.

Estos requisitos pueden lograrse, en principio, por dos procedimientos: eliminación de los gérmenes de la leche o destrucción de los mismos, quedando muertos en la leche. El segundo procedimiento es en la actualidad el más satisfactorio; y el calentamiento entre varias posibilidades (irradiación UV o con rayos ionizantes, adición de agentes químicos -conservadores-, corriente eléctrica, ultrasonido, etc.) constituye el método que mejor cumple los requisitos exigidos. Los demás recursos fracasan por su escaso efecto germicida o porque producen intensas alteraciones organolépticas en la leche. (78)

El tratamiento de la leche por el calor no es solamente un método de conservación; es igualmente y sobre todo un procedimiento de saneamiento, que puede ser más o menos pronunciado. Cuando se quiere destruir todos los microorganismos para obtener una conservación prolongada, hay que calentar por arriba de 100°C (esterilización). Si se trata de asegurar al producto una sobrevivencia corta, basta destruir la mayor parte de los gérmenes aplicando una temperatura inferior a 100°C (pasteurización). (89)

El proceso controlado de tratamiento térmico denominado "pasteurización" se designa en honor de Louis Pasteur, el ilustre científico francés, quien, en 1864-65, desarrolló un método práctico para impedir las fermentaciones anormales del vino, sometiéndolo a una temperatura entre 50 y 60°C. Este tratamiento térmico destruía los tipos indeseables de gérmenes responsables. La aplicación de un método semejante al tratamiento térmico de la leche parece que fue propuesto por primera vez por Soxhlet en 1891, aunque se sostiene que la leche se pasteurizó comercialmente por primera vez en Alemania en 1880 y algo más tarde en Dinamarca. (54)

La descripción detallada y extensa de un proceso tan empleado y bien conocido como es la pasteurización no tiene lugar entre estas páginas; superaríamos muy poco la descripción que se encuentra en la mayoría de los libros y manuales de pasteurización. Únicamente remarcaremos algunos aspectos generales y de aplicación en quesería.

3.1.3.1 Fundamentos teóricos del calentamiento de la leche

El efecto germicida, así como los cambios físico-químicos y organolépticos de la leche, como resultado del calentamiento dependen en lo esencial de los factores siguientes: (78)

- Temperatura y duración del calentamiento
- Tipo y número inicial de gérmenes
- pH de la leche
- Movimiento de la leche y velocidad de la transmisión de calor en los aparatos

No todas las leches sirven para pasteurizar. Es necesario insistir sobre el hecho de que este procedimiento no transforma una leche cruda mala en una buena leche pasteurizada; no es por tanto, un método que pueda corregir la negligencia de los productores y recolectores. (1)

Debemos recordar, además, la posible existencia de sustancias tóxicas procedentes de la proliferación de muchos gérmenes en las leches muy contaminadas; sustancias que son generalmente termorresistentes. (Ver 2.1.2)

3.1.3.1.1 Temperatura y duración del calentamiento

Primero, debe determinarse el grado de calentamiento, es decir, fijar la temperatura y el tiempo durante el cual ésta es aplicada. Insistamos sobre el hecho de que la noción de temperatura, contemplada aisladamente, no significa nada. Necesariamente debe estar asociada a la idea de duración. (89)

Cuando en 1899 Theobald Smith demostró en Texas, que el bacilo causante de la tuberculosis (Mycobacterium tuberculosis) se moría al someterlo durante 20 minutos, a temperaturas de 60°, y cuando también se demostró, que Mycobacterium era la más resistente al calor, de todas las bacterias patógenas comunes que tienen acceso a la leche, entonces se establecieron las bases de la actual pasteurización. (43)

Los factores temperatura y tiempo pueden combinarse de muchas formas a partir de los resultados anteriores; en México, el Reglamento para el Control Sanitario de la Leche, (82) en su artículo 52, establece los siguientes métodos de pasteurización:

- I. Pasteurización a 62.7°C, durante 30 minutos, con sistema de enfriamiento por medio de placas. Método lento;
- II. Pasteurización a 72.7°C, durante 15 segundos, con sistema de enfriamiento por medio de placas. Método rápido (...)
- III. Pasteurización a 115°C, durante 6 segundos a 140°C, durante dos segundos; y
- IV. Aquellos otros que apruebe la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Los dos primeros revisten interés en quesería, pero particularmente el método rápido.

La Pasteurización Baja, es un método lento y discontinuo pero que presenta la ventaja de no modificar las propiedades de la leche. En particular, las proteínas solubles no son desnaturalizadas y no hay cambio en el estado físico de los glóbulos grasos; (89) el color y el sabor permanecen invariables y la separación de la crema no se retrasa. (1)

La Pasteurización Alta, es un método rápido y continuo pero que modifica ligeramente las propiedades de la leche. Los aparatos modernos reducen sensiblemente este inconvenien-

te. Las proteínas solubles son, sin embargo, siempre parcialmente desnaturalizadas; (89) esta pasteurización se realiza en ausencia de aire, con lo que se reducen las alteraciones de la leche por acción del calor (sabor a cocido por oxidación de grupos sulfhidrilos libres, precipitación de sales de calcio).

De las proteínas solubles, las inmunoglobulinas son las más sensibles al calentamiento; así, a 70° (30 minutos) se desnaturaliza el 89%; la alfa-lactalbúmina es la más resistente (a 70° se desnaturaliza el 6%); la beta-lactoglobulina tiene una sensibilidad intermedia (a 70° se desnaturaliza el 32%). (1)

Un pasteurizador debe asegurar la homogeneidad del calentamiento a la temperatura elegida para que el efecto bactericida buscado sea realmente obtenido y para que la leche no sea modificada en su composición por sobrecalentamientos drásticos. (89)

Actualmente las temperaturas de pasteurización más frecuentes están comprendidas entre 65 y 75°C, algunas veces 80°C para algunas fabricaciones (de queso), mantenidas durante un minuto aproximadamente, a menudo menos. (89)

La esterilización de la leche por el procedimiento UHT (Ultra High Temperature) no es una buena práctica quesera porque la coagulación de la leche por la renina no es uniforme. (32)

3.1.3.1.2 Tipo y número inicial de gérmenes

La destrucción de las bacterias puede considerarse como una suma de reacciones químicas, entre las que tienen un papel predominante la desnaturalización y la degradación de las proteínas simples o complejas, componentes de las enzimas esenciales. (1)

La mayoría de las formas vegetativas de los gérmenes presentes en la leche, incluidas principalmente las bacterias acidolácticas y asimismo las patógenas, mueren ya a temperaturas comprendidas entre 70 y 90°C en unos segundos o pocos minutos. (78)

Son una excepción las bacterias acidolácticas termófilas, que pueden resistir una temperatura ligeramente superior, y las esporas de los bacilos como formas de resistencia, cuya destrucción requiere temperaturas de más de 100°C, (78) por

ello, tras el calentamiento, la leche pasteurizada contiene aun bacterias termorresistentes y esporas. Se ha dicho que la flora láctica residual es más pura que la de la leche cruda y está constituida sobre todo por estreptococos (Thermophilus, bovis, durans) (1).

(...) no es el número, sino el tipo de bacterias de la leche cruda el que decide la calidad bacteriológica de la leche pasteurizada. (1)

(...) ciertos gérmenes de polución termófilos pueden desarrollarse a la temperatura de 63°C y por lo tanto pulular en la leche en el curso de la pasteurización. (89)

Alcaligenes tolerans, parece ser la única especie psicrótrofa termorresistente; bacteria gramnegativa que se encuentra presente en la leche después de un calentamiento a 63°C durante 30 minutos. Este germen crece rápidamente en la leche pasteurizada y enfriada a 10°C. Su crecimiento es más lento a 5°C y se detiene a 2°C. (89)

El comportamiento de las proteasas microbianas al calor es mal conocido. Algunas son termolábiles pero la mayoría parecen no inactivarse por la pasteurización. Se les encuentra pues, nuevamente en la leche pasteurizada.

Determinados microorganismos esporulados del género Bacillus merecen una mención especial; en primer lugar coagulan la leche sin notable acidificación y por acción de una proteasa; después degradan activamente la lactosa y producen una mezcla de ácidos (hasta 0.9%). (1)

El Bacillus acidophilus se encuentra en las leches pasteurizadas. Es un verdadero termófilo; no se desarrolla por debajo de los 40° y su temperatura óptima es de unos 60°.

Otros bacilos (esporulados aerobios) que se manifiestan en los productos calentados, leche pasteurizada y crema pasteurizada, cuando se hallan en presencia de aire y se mantienen a una temperatura suave (20-30°C) son variedades de los bacilos más comunes: B. cereus y B. subtilis. (1)

Las bacterias termorresistentes que quedan en la leche pasteurizada a 74°C no tienen más que una débil aptitud para degradar sus componentes y no se observa una correspondencia neta entre su número y la calidad organoléptica y de conservación de la leche. (1)

Numerosos estudios han demostrado que no existe ningun

na relación entre la microflora total de la leche suministrada por el productor y el número de bacterias termorresistentes que se encuentran en la leche después de la pasteurización y que son estas últimas las únicas que influyen sobre la calidad de conservación de la leche pasteurizada, si se evita toda otra contaminación. (1)

El número de gérmenes juega un papel decisivo, puesto que el tiempo necesario para destruirlos está en función de su cuantía. Por tanto, el descenso del contenido microbiano de la leche cruda representa un factor esencial para elevar el efecto germicida. (78)

La leche obtenida en malas condiciones higiénicas y deficiente transporte tendrá un contenido microbiano elevado que reducirá grandemente la eficiencia del efecto térmico.

(...) se tiende entonces a aumentar la temperatura o la duración del calentamiento o bien las dos a la vez a fin de aumentar la eficacia de la operación. Desde el punto de vista bacteriológico, esta acentuación de la acción térmica puede tener las consecuencias siguientes: (89)

- Si los gérmenes de polución no son esencialmente esporulados o simplemente termorresistentes, la flora de la leche pasteurizada se disminuye rápidamente (...)
- Si la flora contaminante de la leche cruda se compone de una proporción elevada de esporulados o termorresistentes, la leche pasteurizada permanece rica en gérmenes, aún cuando el calentamiento es más enérgico. En algunos casos, una temperatura de 90-92°C mantenida por unos 30 segundos, no consigue reducir suficientemente la carga microbiana de la leche tratada.

Estos microbios están dotados en general de enzimas proteolíticas que les permiten degradar la caseína y provocar de este modo la putrefacción de la leche. (89)

Por otro lado, mientras más se eleva la temperatura, la leche sufre mayores transformaciones físicas y químicas.

En la práctica, también puede interesar la determinación de la relación entre el número de gérmenes y el tiempo de calentamiento, lo que equivale a estudiar la velocidad de la acción bactericida. (1)

Para una temperatura dada, la velocidad de la acción

bactericida depende de la naturaleza de los gérmenes y de la composición del medio (...) Si ha de intervenir el tiempo, puede expresarse simplemente el resultado de la acción bactericida por un porcentaje, ya sea de los gérmenes supervivientes (porcentaje de supervivencia) o de los gérmenes destruidos (porcentaje de destrucción): (1)

El porcentaje de supervivencia es:

$$\frac{N}{N_0} 100$$

El porcentaje de destrucción es:

$$\frac{N_0 - N}{N_0} 100$$

donde:

N_0 = número inicial de gérmenes/cc
 N = número final en un tiempo (t)

3.1.3.1.3 Acidez de la leche (Ver: 1.4, 2.1.3, 2.8)

El efecto germicida aumenta a la misma temperatura y duración del calentamiento al bajar el pH, esto es, en el margen de la acidez. (78)

Normalmente, el pH de la leche antes del calentamiento oscila entre 6.5 y 6.4. Si se ha "agriado" por acción de las bacterias acidolácticas, siendo entonces el pH inferior a 6.5, las partículas protéicas se coagulan por el calentamiento. Los microorganismos quedan englobados en tal caso y el efecto germicida disminuye notablemente. Pero esto se debe también especialmente a que las proteínas coaguladas y otros componentes de la leche se queman y adhieren a las superficies de intercambio calorífico del pasteurizador dificultando este proceso. (78) No solamente resultaría en la aparición del gusto a cocido en los quesos sino también una disminución en el rendimiento. (89)

La acidez de la leche destinada a la pasteurización no debe tener más de 22°D. (89)

3.1.3.1.4 Movimiento de la leche y velocidad de la transmisión de calor en los aparatos

La transmisión de calor entre dos medios se realiza en la mayoría de los sistemas de calentamiento a través de un plano divisorio, por lo que así puede hablarse de un traspaso de calor. (98) (En el caso de la pasteurización baja, un único elemento permite efectuar sucesivamente el calentamiento y la refrigeración; 89).

La transmisión calorífica depende de diversos factores. Cuentan entre ellos la conductividad térmica específica de las materias, la diferencia de temperatura entre los medios, el espesor del tabique divisorio y el coeficiente de transmisión térmica, el cual expresa la mayor o menor facilidad con que un medio cede el calor al otro. (78)

En todos los tipos de aparatos el calentamiento o el enfriamiento se efectúa por intercambio de calor, a través de una pared metálica, entre la leche, por una parte y un fluido caliente o refrigerante, por otra parte.

Desempeñan un papel fundamental la modalidad de la corriente (laminar o turbulenta) y su velocidad. Estos factores permiten calcular el coeficiente de transmisión térmica. (78)

Las partículas de componentes lácteos, quemados y adheridos a las superficies de intercambio calorífico, así como los sedimentos, el aire mezclado y la velocidad escasa de la corriente de los medios, pueden reducir considerablemente el coeficiente de transmisión térmica, disminuyendo así el efecto germicida. (78)

Una instalación de pasteurización comprende siempre un aparato de calentamiento y un aparato de refrigeración. Este conjunto se completa o no por un intercambiador-recuperador de calor. (89)

Los aparatos de pasteurización baja están constituidos esencialmente por un tanque cerrado, acondicionado de doble pared. En su interior la leche es calentada y mantenida a la temperatura de pasteurización durante 30 minutos antes de ser enfriada. Un agitador mueve la leche en el curso de la operación, a fin de acelerar los intercambios térmicos. La producción de espuma en la superficie, debe evitarse para no sustraer a los gérmenes de la acción térmica. (89)

Los inconvenientes residen en lo estorboso de las instalaciones, la lentitud del trabajo, el desprendimiento de gas carbónico y la posible oxidación de vitaminas seguido de la agitación de la leche al aire libre. (89)

El calor lo proporciona agua caliente o vapor; el refrigerante es agua, agua fría o salmuera.

La pasteurización alta, llamada también High Temperature Short Time (HTST) es un método rápido y continuo.

En México se usan principalmente pasteurizadores rápidos de dos orígenes: americanos e ingleses (...; 43) denominados pasteurizadores de placas, justamente por componerse de una serie de ellas, separadas entre sí por espacios de 3 a 4 mm, onduladas o con nervaduras, rectangulares o circulares, generalmente en posición vertical, que constituyen el tabique divisorio entre la leche y el medio de calentamiento o refrigerante.

El medio que proporciona calor puede ser, al igual que para la pasteurización baja, agua caliente o vapor; el medio refrigerante, agua, agua helada o salmuera.

Los pasteurizadores provistos de una sección de recuperación de calor, logran una gran economía. Los intercambiadores-recuperadores permiten obtener considerables ganancias de combustible. Su principio es el siguiente: la leche pasteurizada, antes de alcanzar el refrigerante, calienta a la leche cruda que está a punto de entrar en el pasteurizador. Al mismo tiempo la leche caliente comienza su enfriamiento. (89)

De este modo, por ejemplo, cuando una leche pasteurizada a 74°C lleva la temperatura de la leche cruda de 14 a 62°C. Simultáneamente la leche pasteurizada se enfría a 26°C. La recuperación es de:

$$\frac{(62 - 14)}{(74 - 14)} 100 = 80\% \text{ (89)}$$

Antes de entrar a la sección de placas de pasteurización, la leche a 40-45°C puede abandonar el intercambiador-recuperador para ganar el filtro o el depurador centrífugo que permite además regular la tasa de grasa (ver 3.1.1 y 3.1.2).

En todas las instalaciones modernas, el control y la regulación del calentamiento se realizan automáticamente. Pa

ra ello, se utilizan termómetros registradores de bulbo capaces de registrar la temperatura y el tiempo de calentamiento de la leche lo mismo que las interrupciones de la circulación. Por otro lado, estos termómetros comprenden un mecanismo que regula automáticamente una válvula destinada a desviar la circulación normal de la leche cuando el calentamiento es insuficiente. El líquido es entonces regresado al aparato hasta que su temperatura permita su admisión en el intercambiador-recuperador. (89)

Los cambiadores de placas son poco voluminosos y tienen una gran flexibilidad de funcionamiento (modificación del número de placas); el rendimiento térmico es excelente, interesan especialmente para grandes capacidades (10,000 lt/h o más) y permiten un gran automatismo. (1)

3.1.3.2 Pasteurización en quesería

La pasteurización de la leche, en quesería, fue preconizada desde principios de siglo por los daneses. Esta tecnología da lugar a múltiples problemas, algunos de los cuales no se han resuelto. Algunos tipos de quesos (Saint-Paulin, Edam, Gouda...) se fabrican exitosamente a partir de leche pasteurizada, mientras que otros (Camembert, Brie, Roquefort...) toleran más difícilmente la pasteurización y no presentan la plenitud de sus características originales a menos que sean fabricados con leche cruda. (89)

El queso Oaxaca pertenece al primer grupo; no obstante, está sujeto a todas las ventajas o desventajas que presentan los quesos elaborados con leche pasteurizada.

La pasteurización en quesería tiene una doble finalidad:

A. Finalidad higiénica (destrucción de gérmenes patógenos); (1) indispensable para asegurar el saneamiento del queso.

(En el caso de los quesos madurados, se sabe que una maduración suficientemente larga elimina los gérmenes patógenos. Sin embargo, existen muchas opiniones en cuanto al tiempo de maduración; el procedimiento de fabricación de cada tipo de queso puede alargar o recortar el tiempo requerido para la desaparición de dichos gérmenes).

B. Finalidad técnica (destrucción, lo más acusada por

sible de microorganismos indeseables). (1) La leche, desprovista de su flora inicial puede entonces poblarse con fermentos puros y seleccionados (ver: 3.1.7) que permiten al queso trabajar en excelentes condiciones de regularidad. Los productos obtenidos son de calidad constante porque permanecen libres de las fluctuaciones observadas con la población bacteriológica de las leches de recolección. (89) Además, la pasteurización permite obtener productos de la más alta calidad. Si la pasteurización de la leche de queso responde a exigencias técnicas indiscutibles, resta, sin embargo, que su puesta en práctica sobrepase dificultades; algunas de las cuales todavía no encuentran una solución plenamente satisfactoria.

En primer lugar, hay que considerar las modificaciones que produce el calentamiento a la composición y a la estructura físico-química de la leche. (89)

El calentamiento de la leche disminuye la aptitud para la coagulación por el cuajo; la cuajada obtenida es menos dura y la separación del lactosuero muy difícil. Si la temperatura de pasteurización no es muy elevada, se puede corregir mediante la adición de cloruro de calcio antes de la adición del cuajo (1) (ver 3.1.5).

Si el calentamiento de la leche es suficientemente severo, las proteínas solubles coagulan y se encuentran retenidas con la caseína, en el coágulo, en el momento del desuerado (89) lo que trae como consecuencia una modificación de la textura.

(Las proteínas solubles) fijan energicamente el agua y hacen difícil el desuerado satisfactorio del queso.

Además, el calentamiento de las proteínas solubles provoca la liberación de grupos SH y la formación de sustancias reductoras a partir de los ácidos aminados sulfurados, cistina y cisteína. Estas sustancias, al modificar el potencial redox de la leche, actúan probablemente sobre el desarrollo de las bacterias lácticas.

Un calentamiento energético, sobre todo al aire libre, rompe igualmente el equilibrio fosfocálcico de la leche (destrucción del complejo calcio-caseína; 78). El fenómeno se traduce en un empobrecimiento del líquido en sales de calcio solubles y de ahí, en dificultades en la coagulación por la renina. (89)

Una consecuencia de la pasteurización (que algunos

consideran como una tercera finalidad), es el aumento del rendimiento quesero. Ello se debe a tres causas: (1)

- Desnaturalización de las proteínas solubles, cuya intensidad es proporcional a la temperatura alcanzada.
- Insolubilización de una parte de las sales minerales.
- Mejor retención de materia grasa en la cuajada (ver: 3.1.2.4).

Sobre este aspecto del aumento del rendimiento, se han dado resultados muy desiguales (del 1 al 10%). Sin duda, se debe a diferencias en la composición de la leche, a la forma de calentamiento y a los métodos de fabricación. La pasteurización ofrece, por lo tanto, ventajas tangenciales para el fabricante. (1)

3.1.3.3 Control de la pasteurización

Una vez pasteurizada, debe evitarse que la leche entre en contacto con superficies contaminadas o que se mezcle con leche cruda o insuficientemente pasteurizada.

Un control eficaz de la pasteurización debe prever, en principio, por un lado la investigación de gérmenes patógenos, por otro, la de microorganismos banales. (89)

Desgraciadamente, la detección de gérmenes patógenos entraña serias dificultades experimentales. Además, es muy laboriosa, porque se ignora, con anticipación, los gérmenes que pueden estar presentes. De este modo se ha investigado un método indirecto, simple y de aplicación práctica, que permite verificar rápidamente si la leche pasteurizada está efectivamente desprovista de todos los gérmenes patógenos que contenía eventualmente al estado crudo. Este método, puesto en evidencia por Kay y Grahamen en 1935, sostenido y fundado en el hecho de que la fosfatasa alcalina (ver: 2.3.2.1, f) de la leche cruda tiene una temperatura de inactivación ligeramente superior a la temperatura de destrucción del bacilo tuberculoso, el más termorresistente de los gérmenes patógenos comúnmente presentes en la leche. De ahí que cuando la leche de control ya no revela fosfatasa alcalina, puede afirmarse que ha sido calentada en condiciones que aseguran la destrucción de todos los gérmenes patógenos susceptibles de estar presentes en la leche cruda. (89)

En nuestro caso, esta prueba se verifica en el producto terminado (Determinación de Fosfatasa en Queso), siguiendo la metodología de la Association of Official Analytical Chemist. (40)

El número de gérmenes banales, no se investiga en que sería; en realidad nunca debieron destruirse, por eso se reincorpora a la leche la flora bacteriana que se destruye con la pasteurización.

Las bacterias patógenas principales que pudieron incorporarse a la leche y/o a la cuajada por contaminación en algún momento posterior a la pasteurización, también constituyen parte del Control de Calidad del producto terminado (ver: 4.2).

3.1.4 Leche de Quesería

Una vez pasteurizada la leche que se destina a la elaboración de queso (inciso 3.1.3), debe enfriarse rápidamente para impedir el desarrollo masivo de los gérmenes termorresistentes que pueden provocar accidentes de fabricación.

La temperatura final de enfriamiento (en las placas del pasteurizador o por otro procedimiento), dependerá de la decisión de almacenar la leche o conducirla a la(s) tina(s) de cuajado para proseguir la elaboración de queso; en este último caso, la leche puede enfriarse a la temperatura de inoculación de los fermentos (ver más adelante), o bien, calentarse nuevamente en la tina por medio de vapor hasta la temperatura deseada (alrededor de 30°C).

La temperatura y acidez de la leche deben verificarse continuamente en la tina de cuajado.

En algunos tipos de queso, la acidez (titulable) que debe tener la leche pasteurizada que llega a la tina de cuajado no debe exceder de un límite relativamente bajo; cuando la leche no es de buena calidad, la acidez es muy elevada (sobre todo después de la pasteurización lenta) y suele neutralizarse; en el caso del queso tipo Oaxaca, por el contrario, la acidez debe subir considerablemente antes de cuajar la leche.

La elaboración de queso requiere la adición de los siguientes elementos, considerados Aditivos Alimentarios:

- Cloruro de Calcio
- Colorante natural
- Fermentos lácticos
- Cuajo o enzima coagulante

3.1.5 Adición de Cloruro de Calcio

La presencia de iones de calcio es, ante todo, necesaria a la existencia misma de las micelas de caseína. Pero éstas se vuelven muy sensibles a los iones de calcio cuando se someten a la acción del cuajo. Modificaciones mínimas del contenido de la leche en iones de calcio pueden entonces influir en la velocidad de coagulación. (89)

La adición de cloruro de calcio restablece a la leche las sales de calcio solubles y por lo tanto aumenta la aptitud de la leche para la coagulación; propiedad disminuida durante el calentamiento (ver: 3.1.3.2), al romperse el equilibrio fosfocálcico (las sales de calcio se vuelven insolubles).

De esta forma, la adición de cloruro de calcio mejora el rendimiento y acelera de cierto modo la salida del suero y determina una mejor retención de la grasa y otros sólidos. (28)

En general se usa el cloruro de calcio o el fosfato monocálcico; para algunos autores el primero es más eficaz porque al ser más soluble (más ionizado) permite la presencia de más iones libres de calcio.

(Como la elevación de la acidez libera iones de calcio, el cloruro de calcio se emplea en menor cantidad en leches ácidas; 28); es el caso particular de la leche destinada a la fabricación de queso tipo Oaxaca y similares.

El cloruro de calcio (CaCl_2), debe adicionarse en razón de 10 a 20 g/100 litros de leche, es decir 0.01 a 0.02%. Existen en el comercio soluciones líquidas o cloruro de calcio en polvo en presentaciones para uso alimenticio que deben emplearse de acuerdo a la ionización natural del calcio existente en la leche y siguiendo las instrucciones del fabricante para asegurar una perfecta ionización.

No hay que exagerar la cantidad de cloruro adicionado

pues se corre el riesgo de obtener quesos de gusto amargo y de pasta dura y seca.

La presencia de calcio en la leche de quesería se comprenderá mejor cuando tratemos lo referente a la coagulación de la leche (ver: 3.1.8 y 3.1.8.5.2.2.2, C).

3.1.6 Adición de Colorante

Para dar un aspecto más atractivo a la masa del queso, se acostumbra en algunas variedades adicionar a la leche un colorante. (En otros casos, por el contrario, se utilizan de colorantes).

En general se utiliza un colorante a base de la semilla de annato o achiote (*Bixa orellana*) que existe en los países tropicales. La semilla es blanca en el interior, pero está recubierta por una delgada capa altamente coloreada. Los principios colorantes de la semilla de achiote son la Bixina que es amarilla y la Orelina que es roja. (28)

Es más práctico en general usar productos comerciales estandarizados. Estos productos son colocados en el mercado, en polvo, en pastillas, en suspensión, en aceite o en solución acuosa. (28)

Las dosis de empleo dependen de la concentración del producto y del tipo de queso; para el queso Oaxaca es recomendable adicionar 6 ml de preparado líquido comercial por cada 100 litros de leche, lo que equivale al 0.006% (ver: 3.1.8.5.2.4 Apéndice A).

El caroteno es otro colorante que puede adicionarse en la misma proporción.

3.1.6 Adición de Fermentos Lácticos

La importancia y obligatoriedad de la higienización de la leche que va a transformarse en queso con apego a un procedimiento industrial quedaron aclaradas en el inciso relativo a la pasteurización (3.1.3).

La leche cruda que recibe la planta para su transformación en queso, debe tener el menor número posible de gérmenes (banales y/o patógenos), así como un límite de acidez y otras características descritas anteriormente. Con la pasteurización, además de la inactivación de muchas enzimas que pueden provocar modificaciones en la leche, se logra la destrucción bacteriana en proporción considerable. Sin embargo, aun que la leche carezca de microorganismos nocivos, no puede destinarse a la fabricación de queso sin un tratamiento previo; nos interesa su acidificación, pero ahora realizada con bacterias conocidas y bajo condiciones controladas.

Lo anterior se logra adicionando cultivos lácticos a la leche de quesería, teniendo en cuenta todos los factores que favorecen o inhiben el crecimiento microbiano y las características especiales de las bacterias favorables.

Hace menos de cien años los cultivos iniciadores eran desconocidos. Es verdad que los microorganismos en su estado natural habían sido eficaces desde los comienzos de la civilización para contaminar la leche y la crema y conducir a los alimentos fermentados. Aunque algunos de los antiguos "fermentos" constituían un nuevo producto, los agentes fermentadores (del agriado) no fueron conocidos con claridad aparentemente hasta alrededor de 1890 cuando la crema madurada para elaboración de mantequilla fue estandarizada y mejorada por Weigmann en Alemania. Los cultivos iniciadores puros fueron entonces aceptados. En 1910-1920, Orla Jensen, von Freudenreich, J. M. Sherman, Hammer y otros renombrados microbiólogos de la leche, separaron y aislaron bacterias para preparar cultivos puros para leche y quesos fermentados. (12)

La adición de fermentos lácticos tiene por objeto restaurar a la leche la flora microbiana útil a la elaboración de queso que se destruye durante el procedimiento de higienización; de este modo, la presencia de bacterias activas permite la acidificación y la producción de sabor y aroma deseados para cada tipo de queso.

Un mililitro de leche destinada a la elaboración de queso debe contener antes de su coagulación, de 3 a 15 millones de bacterias acidolácticas. (13)

3.1.7.1 Crecimiento bacteriano

3.1.7.1.1 Factores de crecimiento bacteriano

Una gran diversidad de los microorganismos que han sido identificados e integrados a la taxonomía bacteriana, se han diferenciado por alguna característica nutricional, de tipo metabólico o biofísico. Es por ello que en los manuales de bacteriología muchas de estas características, además de la morfología de grupo, se utilizan para describir y distinguir a las distintas especies microbianas (ver 2.8.3).

Los factores de crecimiento de alguna especie bacteriana pueden comprender:

- A. Factores orgánicos de crecimiento (ácidos grasos, aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, materias nitrogenadas no proteicas, etc.).

Los ácidos grasos presentes en la leche, así como otras sustancias que les acompañan se describieron someramente al tratar de la materia grasa (ver 2.3). De manera similar, los carbohidratos también fueron mencionados en 2.8.1; los aminoácidos y las proteínas se mencionarán más adelante.

Las materias nitrogenadas no proteicas (importantes en la nutrición bacteriana), son sustancias de moléculas pequeñas que pertenecen a varias familias químicas (...). En la leche de los rumiantes no representan más que una pequeña parte del nitrógeno total, del 5 al 7% como término medio. (1) En la leche de vaca estas sustancias varían ampliamente.

Los componentes de esta fracción protídica son numerosos; cada uno de ellos se encuentra, pues, en cantidades muy pequeñas. El más abundante es un producto de desecho, la urea, su presencia en la leche de vaca se halla en la proporción media de 0.25 g/lit o sea más de 1/10 de esta fracción. Pero se encuentran también sustancias que tienen un papel importante en la biosíntesis de los componentes característicos de la leche, en especial los nucleótidos y las sustancias que constituyen sus precursores, como las bases nitrogenadas, el ácido orótico, etc. (...) el contenido de estas sustancias en la leche de vaca es escaso, pero en cambio contiene ácido orótico en una proporción relativamente elevada. Puede decirse que existe una relación entre el contenido de nitrógeno no proteico de la leche y la síntesis proteica a nivel de glándula mamaria. (1)

La leche contiene aminoácidos libres. En la leche de vaca el más abundante es el ácido glutámico (30-50 mg/lt); existe igualmente lisina así como glicina y valina en cantidades variables de 5 a 10 mg/lt para cada uno; se encuentran también presentes otros aminoácidos en cantidades más pequeñas. Además, la leche contiene ésteres fosfóricos de estos aminoácidos y sustancias afines, como fosfoerina, fosfoetanolamina, etc. Uno de estos ésteres abunda especialmente en la leche de vaca, se trata de la fosfogliceroetanolamina (50 mg/lt). En esta fracción no parecen existir polipéptidos. (1)

Probablemente el ácido glutámico es la primera fuente de nitrógeno para la nutrición de las bacterias, puesto que su proporción decrece bastante rápidamente en la leche conservada.

El calentamiento de la leche a temperaturas de esterilización provoca un aumento considerable del contenido de materias nitrogenadas no proteicas, como consecuencia de la degradación de las proteínas. (1) Esto tiene especial interés en la leche de cultivos.

- B. Necesidad de factores inorgánicos (oxígeno, anaerobiosis, bióxido de carbono, iones inorgánicos, oligoelementos, siderocromos y transporte de hierro, etc.).

La leche contiene un buen número de elementos traza (elementos vestigiales, oligoelementos), tales como molibdeno, zinc, cobalto, cobre, magnesio, etc. que estimulan el desarrollo de las bacterias acidolácticas. (13)

Los iones inorgánicos que se necesitan en cantidad, son el PO_4^{-3} , el K^+ , el Mg^{++} , y también, en ausencia de una fuente inorgánica de N y S, el NH_3 y el SO_4^{-2} . (10)

- C. Necesidades físicas e iónicas (temperatura, pH, halófilos, agua).

La mayor parte de las bacterias pueden crecer por encima de una temperatura de 30°C o más, si bien existe una zona muy estrecha en la que el crecimiento es óptimo. (10)

Existen, naturalmente, las temperaturas mínima y máxima de crecimiento.

Los límites térmicos para el crecimiento de un organismo son una característica estable de gran valor taxonómico.

En general, las bacterias se clasifican en mesófilas, psicrófilas y termófilas. La mayoría son mesófilas (ver 1.5).

Las bacterias psicrófilas, que son principalmente pseudomonas, toleran temperaturas muy bajas, sin que ello implique que las bajas temperaturas sean las óptimas para estos organismos: la temperatura óptima se sitúa en los 29°, pero son capaces de multiplicarse a un ritmo adecuado incluso a 0° (...). En cambio, las termófilas (principalmente bacilos) presentan temperaturas óptimas de hasta 50 a 55°C, y pueden tolerar temperaturas hasta de 90°C. (10)

La temperatura óptima de crecimiento, por lo regular definida como la temperatura en que la multiplicación es más rápida, sólo es unos grados menor que la máxima. (7)

En la valoración de los efectos de la temperatura en la actividad microbiana es esencial especificar exactamente lo que se estudia, dado que la temperatura óptima de crecimiento no siempre es la más favorable para otro tipo de actividades. Esto puede atribuirse en parte a los distintos puntos térmicos óptimos de varias enzimas, y en parte a la mayor toxicidad de ácidos y otros productos de desecho a temperaturas mayores. (7)

(...) Se ha demostrado que cuando se inactiva por calor alguna enzima microbiana esencial, se puede lograr el crecimiento del microorganismo a una temperatura elevada por demás desfavorable, al añadir el producto normal de dicha enzima al medio de cultivo. (7)

El efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano es complicado; podría expresarse, en términos más sencillos, como la resultante de dos actividades opuestas. Las velocidades de las reacciones enzimáticas, a semejanza de las de cualquier acción química, varían directamente con la temperatura. Son lentas a temperaturas bajas y se aceleran a medida que se eleva la temperatura. Los fenómenos de degradación; v. gr.: desnaturalización de las proteínas, incluidas enzimas, son pocos a temperaturas bajas y se hacen notables cuando se llega a temperaturas moderadas, y ya en ellas aumentan rápidamente. La diferencia entre la actividad beneficiosa enzimática y la desnaturalización nociva es mayor en la temperatura óptima para el crecimiento, en tanto que en la temperatura máxima de crecimiento la actividad destructiva es tan rápida que equilibra los fenómenos de anabolismo y se interrumpe el crecimiento. (7)

El crecimiento y la actividad microbianos son alterados

dos notablemente por el pH del medio, pero hay diferencias amplias entre las necesidades de pH de especies. Estas diferencias reflejan las costumbres normales y hábitat de los microorganismos. Cada especie crece solamente en ciertos límites de pH, y el crecimiento más rápido o abundante aparece en una zona limitada de pH óptimo. (7)

3.1.7.1.2 Curva de crecimiento

El conocimiento de las condiciones en las cuales las bacterias se desarrollan presenta un interés tecnológico considerable. Es lo que permite, especialmente, descubrir la influencia del medio ambiente, escoger los medios más favorables a la multiplicación de gérmenes, definir la acción bacteriostática o bactericida de los agentes inhibidores. (89)

En el sentido biológico del término, el crecimiento significa el aumento de todos los componentes de la materia viva. En el caso de los microorganismos, este aumento resulta de dos fenómenos: (89)

- El aumento de la dimensión de las células antes de su división.
- La multiplicación del número de células.

Estos dos fenómenos tienen lugar alternativamente a un ritmo muy rápido, en tanto los microorganismos presenten la facultad de sintetizar los constituyentes celulares, de dividirse y de sobreponerse a las modificaciones del medio que resultan de su desarrollo.

El crecimiento de las bacterias se define por: (89)

- El tiempo de generación (G) que expresa el tiempo requerido para que una célula produzca dos células hijas.
- La tasa de crecimiento (C) que expresa el número de divisiones por unidad de tiempo.

El tiempo de generación G puede ser determinado fácilmente. Al ritmo de multiplicación máximo, se considera que un número N_0 de bacterias genera después de n biparticiones $N_0 \times 2^n$ bacterias. (89) (Si una bacteria produce 2, éstas a su vez 4 y éstas 8, etc., lo que significa un crecimiento exponencial que se expresa 2^n). Cumpléndose para la ecuación:

$n = 0, 2^0 = 1; n = 1, 2^1 = 2; 2^2 = 4, \text{ etc.};$ lo que quiere decir que si no hay bipartición, el número de células permanece constante (una bacteria), si hay una bipartición, habrá 2 células, 2 biparticiones, 4 células, etc.

Estas (n) biparticiones se producen durante el tiempo (t) y son el origen de la formación de un número N_1 de células.

De donde:

$$N_1 = N_0 \times 2^n \quad \text{y} \quad 2^n = \frac{N_1}{N_0}$$

Si partimos de una sola célula inicial ($N_0 = 1$), la ecuación 2^n no se modifica $N_1 = 1 \times 2^n; N_1 = 2^n$; pero como el número inicial de células es mayor: $N_0 = 2, N_0 = 3, \text{ etc.}$ este número debe multiplicarse por 2^n .

De la ecuación $2^n = \frac{N_1}{N_0}$ puede obtenerse otra ecuación, tomando logaritmos de base 10 a ambos miembros de la ecuación:

$$\log (2^n) = \log \frac{N_1}{N_0}$$

El logaritmo de un número elevado a una potencia (n), es igual al logaritmo base 10 del número, multiplicado por la potencia (n).

El logaritmo de un cociente es igual al logaritmo del dividendo menos el logaritmo del divisor.

Entonces: $(\log 2) n = \log N_1 - \log N_0$

de donde el número (n) de biparticiones observadas durante el tiempo (t), se calcula;

$$n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2}$$

El tiempo de generación es entonces: $G = \frac{t}{n}$

Varía según las bacterias, pero se sitúa frecuentemente para la mayoría de los gérmenes que interesan a la industria láctea, alrededor de 20 a 30 minutos, cuando las condiciones de cultivo son favorables. (89) Algunas bacterias de interés como el Mycobacterium tuberculosis, tienen un

tiempo de generación mucho más elevado; de 13 a 15 horas.

Supongamos que al cabo de 60 minutos después de haber sembrado 8 bacterias en un medio de cultivo, el recuento celular nos da 64, entonces el tiempo de generación será:

$$\begin{array}{l} N_0 = 8 \text{ células} \\ N_1 = 64 \text{ células} \end{array} \quad n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2}$$

$$n = \frac{\log 64 - \log 8}{\log 2}$$

$$n = \frac{1.806 - 0.904}{0.3}$$

$$n = 3$$

(lo que en términos de bipartición celular $N_1 = N_0 \times 2^n$, significa: $64 = 8 \times 2^n$; $n = 3$).

El tiempo de generación $G = \frac{t}{n}$, será:

$$G = \frac{60}{3} = 20 \text{ minutos}$$

La tasa de crecimiento (C), se expresa por la inversa del tiempo de generación. (89)

$$C = \frac{n}{t}$$

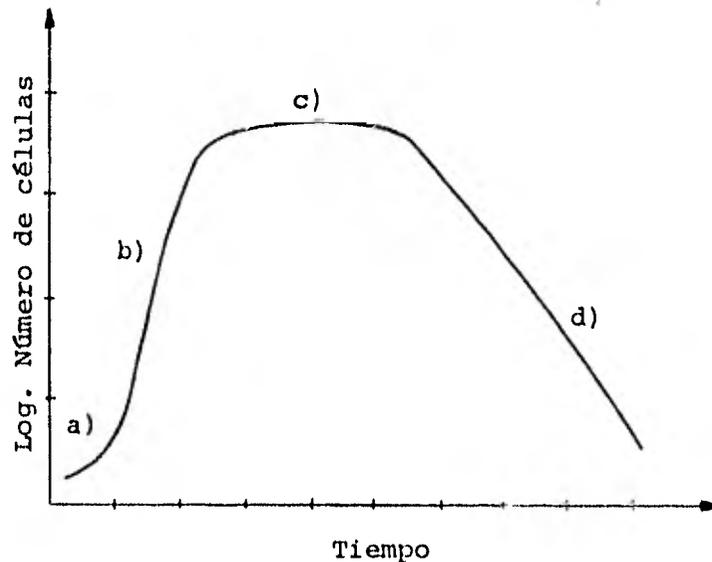
Esta tasa de crecimiento, que traduce la actividad biosintética de los microorganismos aumenta progresivamente en cuanto son llevadas al interior del medio de cultivo, posteriormente la tasa permanece constante durante el tiempo en que las bacterias están en período activo de multiplicación.

En el ejemplo anterior significa:

$$C = \frac{3}{60} = 0.05,$$

es decir, la tasa de crecimiento es 5 centésimas del período de reproducción por unidad de tiempo.

La evolución de un cultivo microbiano sembrado (o inoculado) en un medio favorable puede describirse por una curva de crecimiento cuya trayectoria presenta ciertos rasgos característicos:



en donde:

- a) = fase de latencia
- b) = fase de crecimiento exponencial o fase de multiplicación máxima
- c) = fase máxima estacionaria
- d) = fase de declinación

La fase llamada "de latencia", que sigue a la inoculación y que dura generalmente dos a tres horas, es decir, el tiempo que transcurre entre la inoculación y el momento en que la multiplicación llega a ser máxima y constante. La duración de esta fase está influida por numerosos factores. En un medio mal adaptado, puede prolongarse 24 horas o más.

De igual modo, cuando las bacterias han sufrido daño (acción del calor, del frío, de inhibidores...), la fase de latencia puede encontrarse considerablemente alargada. Finalmente, la edad de las bacterias constituyentes del inóculo no es indiferente. Gérmenes jóvenes, de dos a tres horas de edad, es decir, provenientes de un cultivo en pleno desarrollo, se multiplican inmediatamente en el medio a una velocidad máxima. Los mismos gérmenes, con seis horas de edad o mucho más, se multiplican mucho más lentamente. (Lambin y German, citados por 89) Este fenómeno se atribuye generalmente a deficiencias en enzimas o en intermediarios metabólicos cuyas concentraciones deben restablecerse por sín-

tesis para que las células alcancen la tasa normal de crecimiento. Contrariamente, en algunos casos, la causa del fenómeno es diferente. La mayoría de los gérmenes inoculados pueden ser incapaces de desarrollarse en el nuevo medio, únicamente algunas células mutantes están en posibilidades de hacerlo. Es solamente hasta que la descendencia de estas células predomina, que el crecimiento máximo se desarrolla. (Stanier y col., citado por 89)

Las esporas constituyen las formas bacterianas susceptibles de permanecer en estado de latencia durante mucho tiempo, varios días e incluso varias semanas.

En el curso de la fase de latencia se registra una aceleración progresiva de la tasa de crecimiento hasta que esta alcance el valor máximo que caracteriza la segunda fase de la curva de crecimiento. (89)

Fase de multiplicación máxima o fase logarítmica, llamada aún fase exponencial. El tiempo de generación alcanza su duración mínima y la tasa de crecimiento se mantiene a un valor constante. La concentración del medio en gérmenes aumenta regularmente según una progresión geométrica. Si se traduce este aumento en una gráfica, establecida en coordenadas semilogarítmicas, se obtiene una recta (ver la figura anterior). La pendiente de esta recta depende de la tasa de crecimiento, influenciada a su vez por numerosos factores: composición del medio, pH, rH, temperatura, presión osmótica, etc. La tasa de crecimiento está influenciada también por la naturaleza de los gérmenes (89) (mesófilos, termófilos o psicrófilos). La fase logarítmica tiene una pendiente constante para cada una en un medio dado (...1)

La fase de multiplicación máxima dura generalmente cinco a ocho horas, en condiciones óptimas; posteriormente, el medio es menos favorable en razón de la acumulación de sustancias metabólicas más o menos tóxicas. La tasa de crecimiento disminuye entonces y hacia la treintava hora, la multiplicación parece detenerse. La fase estacionaria máxima del cultivo es alcanzada. (89)

Si las células que crecen de forma exponencial en un medio rico en nutrientes, son trasladadas a un medio idéntico, recién preparado, la fase de retraso no aparece (...). Uno de los factores que favorecen la aparición de una fase de retraso es la inhibición del crecimiento por acción de contaminantes en el medio -por ejemplo, jabón o iones metálicos pesados. (10) (Ver más adelante: 3.1.7.3.4 Presencia de antibióticos y antisépticos).

Fase estacionaria máxima, caracterizada por el mantenimiento del número de células vivas en un valor máximo y constante. Este valor expresa el rendimiento según el cual los nutrimentos del medio son transformados en materia celular.

Fase de declinación, que corresponde a la disminución progresiva del número de células vivas debido a la reducción de ciertos constituyentes nutritivos del medio o a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo microbiano. Comúnmente se establece una tasa de mortalidad constante y el número de sobrevivientes disminuye exponencialmente. En algunos casos, los gérmenes sobrevivientes pueden, en un momento dado, iniciar una nueva fase de multiplicación utilizando los productos liberados en el medio por lisis de las células. (...89)

3.1.7.2 Preparación de los fermentos

La microbiología es definitivamente una de las ciencias auxiliares más importantes de la lactología.

El efecto de los microorganismos en la leche y productos lácteos se distingue por los aspectos de tecnología, alteraciones e infecciones e intoxicaciones alimentarias (ver 2.1.1).

Impedir que ocurran alteraciones en la leche o los productos, eliminar el riesgo de enfermedades y emplear inteligentemente las propiedades de los distintos microorganismos en la tecnología de alimentos, constituyen la participación más valiosa de la microbiología y ciencias afines.

3.1.7.2.1 Consideraciones previas

La preparación de fermentos es un magnífico ejemplo del uso inteligente de los microorganismos; demostrado el carácter imprescindible de las bacterias lácticas en la elaboración de queso, debe procurarse todo el conocimiento que sea posible para aprender a controlarlas (identificación, susceptibilidad a antibióticos, condiciones de temperatura, pH, nutrimentos, etc.). En este inciso mencionaremos brevemente otros aspectos del mundo microbiano.

Existen, para los estreptococos y lactobacilos, la

clasificación de Lancefield y Sharpe, respectivamente. Ambas son completamente independientes una de otra. Se trata de clasificaciones serológicas. (La evidencia e identificación de ciertos componentes bacterianos llamados antígenos -con poder inmunizante-, permite la "tipificación" de las cepas y el establecimiento de una clasificación serológica).

Además, las bacterias pueden tipificarse y/o clasificarse de acuerdo con sus caracteres citomorfológicos, fisiológicos o bioquímicos.

En la práctica, se encuentran frecuentemente muchas dificultades para designar una cepa de bacterias lácticas aisladas de un producto lácteo. La identificación es un trabajo delicado reservado a los laboratorios especializados.

(1)

A. Caracteres Citomorfológicos

La identificación de las bacterias por observación al microscopio debe hacerse con precaución. Existen varias causas de error:

- Modificación de la forma de las células, como con secuencia de un cambio importante en las condiciones del medio; por ejemplo, pase de un medio sólido a un líquido. (1)
- Efectos de coloración; algunas bacterias alargadas, especialmente de los *Corynebacterium* y de los bastoncitos encapsulados, pueden parecer estreptococos. (1)
- Un cultivo muy viejo, originalmente grampositivo, puede aparecer gramnegativo.
- Etc.

B. Caracteres Fisiológicos

- Temperatura de crecimiento y de actividad. De especial interés es la posibilidad de cultivo a temperaturas relativamente bajas (10-15°C) o relativamente altas (45°C).

El grado óptimo no siempre es el mismo para las diferentes actividades; por ejemplo, algunos estreptococos lácticos dan un aroma más pronunciado a una temperatura inferior a la óptima para su

crecimiento y producción de ácido. Es igualmente necesario considerar la temperatura límite del crecimiento y la resistencia al calentamiento.

(1) En la producción de queso tipo Oaxaca se utilizan especies mesófilas, activas entre 20 y 30°C.

- La inhibición por el cloruro de sodio a concentraciones de hasta 6.5% es un carácter importante.
- Variaciones en las exigencias nutricionales. Dado que se trata de especies muy exigentes, los medios utilizados para el cultivo de las bacterias lácticas, deben ser muy ricos en vitaminas, aminoácidos y sales minerales.
- Etc.

C. Caracteres Bioquímicos

- La producción de gas carbónico (fermentación gaseosa de los azúcares), distingue a las especies heterofermentativas (ver 2.8.2.3).
- Actividad proteolítica. Las bacterias lácticas tienen una acción proteolítica muy limitada durante la preparación y utilización de los fermentos. No ocurre lo mismo en las cuajadas de quesería, donde la acción de sus proteasas se añade a la del cuajo para degradar la caseína. (1)

Una reacción de degradación de los aminoácidos resulta útil para la determinación de las especies; se trata de la hidrólisis de la arginina con producción de amoníaco (desaminación), que se pone de manifiesto con el reactivo de Massler. (1)

- Acidificación. La aptitud de una cepa determinada no se mide solamente por el máximo de acidez que puede producir, es necesario conocer también la velocidad de la acidificación (...). El volumen de la inoculación influye sobre el resultado. Es indispensable observar condiciones bien estandarizadas, (1) y poder obtener curvas de crecimiento y acidificación.

El poder acidificante está en relación con la resistencia de cada cepa en los medios ácidos. Los estreptococos, que producen de 0.5 a 1% de ácido y rebajan el pH hasta 4.5, no soportan la acidez

producida por los lactobacilos; estos últimos pueden rebajar el pH hasta 3.5. (1)

- Variabilidad de las cepas. Durante períodos de tiempo prolongado, ciertas cepas varían su poder acidificante, mientras que otras presentan una buena estabilidad. Por otro lado, pueden presentarse variaciones bajo la influencia del modo y del medio de cultivo. (1)
- Viscosidad de los cultivos. Es interesante conocerla cuando se trata de cepas para la crema de consumo, para las leches fermentadas y para los quesos de pasta fresca la viscosidad depende de las propiedades de la cepa; la acidez alcanzada, así como la temperatura de pasteurización de la leche o de la crema, tienen también una influencia comprobada.
- Producción de sustancias aromáticas. Se busca especialmente la producción de diacetilo.
La producción de acetoina (acetil-metil-carbinol) está limitada a algunas cepas de estreptococos: en general es lenta; este cuerpo se pone de manifiesto (bajo su forma oxidada, el diacetilo) gracias a reacciones coloreadas muy simples, especialmente la de Voges-Proskauer (producción de coloración roja debida a la reacción del diacetilo sobre un grupo guanídico, en medio alcalino).
- La actividad reductora (estreptococos).
- Etc.

Además de los aspectos anteriores, debe considerarse la sensibilidad frente a los bacteriófagos y otros factores de inhibición que mencionaremos más adelante.

3.1.7.2.2 Bacterias productoras de ácido láctico

Las bacterias productoras de ácido láctico se mencionaron en Acidez (2.8) estableciendo, conforme al Manual Bergey's, las principales dos familias de bacterias (Streptococcaceae y Lactobacillaceae) y las especies de interés de cada una. Conviene ahora mencionar otros aspectos.

Las características de cada grupo bacteriano o de al

guna especie en particular, la distinguen para la elaboración de un determinado tipo de queso.

Algunos quesos requieren la concurrencia de varias especies de microorganismos, que actúan por turno o conjuntamente; otros, únicamente requieren las bacterias acidificantes de uso común, sea en cultivo puro o como mezcla de varias cepas. A su vez, las cepas pueden ser de las llamadas homofermentativas o heterofermentativas (ver 2.8.2.3) a la temperatura empleada en su propagación.

Las más empleadas en quesería y que se utilizan industrialmente para la elaboración de queso tipo Oaxaca, son cepas homofermentativas. Las especies principales son: S. lactis y S. cremoris (ver 2.8.3.1.1).

Conviene que los fermentos lácticos estén constituidos por diferentes cepas de una misma especie bacteriana, a fin de que contengan la que, de acuerdo con la aptitud de la leche para el desarrollo microbiano, crezca mejor en las condiciones prefijadas.

Streptococos

Respecto a los lactobacilos y aparte sus caracteres morfológicos, los estreptococos se distinguen por una acidificación más moderada de la leche (de 0.5 a 1% de ácido láctico para las especies homofermentativas), aunque la producción de ácido se inicia a mayor velocidad. El pH alcanza justamente el punto isoeléctrico de la caseína (4.6). La actividad proteolítica de los estreptococos es en general débil, su equipo enzimático no contiene proteinas ni peptidasas activas, en la mayor parte de las especies.

Las cepas de estreptococos utilizados para la siembra de las cremas y de las leches en quesería (pastas frescas y pastas blandas), pertenecen a las especies lactis, cremoris y diacetylactis. Cuando se cultivan en la leche, entre 20 y 30°C, se obtiene un coágulo firme, homogéneo, sin exudación de suero; pueden presentarse algunas pequeñas burbujas de gas a 30°C, pero nunca a 20-25°C. (1)

Parece que existe un antagonismo entre los estreptococos lácticos y las bacterias del grupo Coli; así, por ejemplo, la producción de gas en la leche por estas últimas, puede impedirse, si al mismo tiempo se siembra una cepa vigorosa de estreptococos, en cantidad suficiente (...). No es cierto que se trate en todos los casos de la detención del crecimiento de las bacterias coliformes por descenso rápido

del pH; es posible que su metabolismo se modifique en presencia de los estreptococos, ya que prácticamente no producen gas.

Algunas cepas de estreptococos lácticos producen sustancias con propiedades inhibitoras frente a cierto número de especies microbianas; estas cepas pertenecen a las dos especies S. lactis y S. cremoris (1) (ver más adelante).

S. lactis puede diferenciarse del S. cremoris (entre otras cosas), por su habilidad para crecer a 40°C en un medio que contenga 4% de cloruro de sodio y a un pH de 9.2. S. cremoris no crece bajo estas condiciones. (1)

Las bacterias del género Leuconostoc (ver 2.8.3.1.2), se caracterizan por una fermentación gaseosa de los azúcares, con producción de CO₂ y acetofina; forman ácido láctico inactivo en débil cantidad; son poco acidificantes.

Los lactobacilos (inciso 2.8.3.2), acidifican la leche menos rápidamente pero más acusada que los estreptococos; se encuentran en este grupo los mayores productores de ácido láctico, hasta del 2.8%. Los lactobacilos soportan valores de pH muy bajos, hasta del 3.5. Poseen actividad caseolítica marcada, en general, debido a la presencia de proteínas activas. (1)

La clasificación y rasgos distintivos de las especies de interés en cuanto al tipo de fermentación y temperatura de crecimiento fueron mencionadas con anterioridad.

Los lactobacilos heterofermentativos que se encuentran en la leche, se desarrollan más lentamente y producen poco ácido (0.5% como máximo), en forma de una mezcla de ácidos láctico, succínico, etc.; producen también un poco de alcohol. Su característica dominante es la producción de gas en cantidad importante durante la fermentación de los azúcares. Su intervención en la industria lechera es nefasta, puesto que pueden provocar el hinchamiento precoz de la cuajada o del queso recientemente fabricado. Estos lactobacilos son aportados a la leche por el cuajo o por restos vegetales. (1)

3.1.7.2.3 Selección y adquisición del cultivo conveniente

Una vez establecida la necesidad de adicionar las bacterias lácticas (mesófilas) a la leche de quesería, debe también determinarse la forma de obtenerlas en el momento en

que se requieran. Para ello es importante distinguir las distintas posibilidades y escoger la que se adapte mejor al ritmo de trabajo, volumen de producción, personal e instalaciones de la planta transformadora, etc.

En términos generales, cuando se elabora una pequeña cantidad de fermentos, destinada, a su vez, a preparar otra cantidad más grande, se le llama Fermento Madre; la cantidad mayor obtenida a partir del fermento madre se le llama Fermento Industrial (puede haber fermentos intermedios). El fermento industrial es el que finalmente se emplea para inocular o sembrar los volúmenes de leche pasteurizada de las tinas de quesería. Sin embargo, en el comercio existen diferentes presentaciones de cultivos lácticos mesófilos (líquidos, desecados o liofilizados), que se adaptan a las necesidades del productor. Los hay que pueden emplearse directamente para grandes cantidades de leche destinada a la fabricación de quesos, eliminando la propagación del cultivo madre o la preparación de cultivos intermedios: se componen de una gran cantidad de bacterias productoras de ácido y son congeladas con nitrógeno líquido. Su actividad se conserva mejor cuando se guardan a -70°C o más fríos.

Los cultivos secados y congelados, que requieren una o dos propagaciones para activarse (cultivo madre) o que en mayores cantidades puede emplearse para preparar el fermento industrial, son otro tipo de presentación comercial. El empleo de estos cultivos (liofilizados), tiene la ventaja de que pueden enviarse por correo, sin refrigeración, con una ligera pérdida de actividad. De preferencia deben almacenarse a temperaturas menores a la congelación, aunque la temperatura regular del refrigerador también ayuda a mantener su actividad. En algunas presentaciones (americana, por ejemplo), un sobre que contenga 2 gramos aproximadamente de cultivos desecados y congelados, es suficientemente activo para inocular 632 ml de leche para preparar el fermento madre o bien 37.9 litros de leche para preparar el fermento industrial sin pasar por el cultivo madre, pero alargando el tiempo de incubación.

Hay al menos 40 tipos distintos de cultivos iniciados para las fermentaciones de la leche que tienen una marcada morfología y diferente utilidad. (31) Actualmente, los queseros pueden procurarse y utilizar en excelentes condiciones fermentos seleccionados de bacterias lácticas, hongos, bacterias alcalinizantes, bacterias propiónicas, etc.

Los cultivos lácticos pueden componerse de una o múltiples cepas de distintas bacterias.

Las cepas y especies son seleccionadas por su velocidad de crecimiento y producción de ácido láctico, por su aroma y producción de CO₂, por sus características de resistencia a los bacteriófagos y algunos por su habilidad para crear fermentaciones viscosas o hiladas en algunos alimentos lácteos. (31)

Los cultivos líquidos presentan la ventaja de ser utilizables inmediatamente porque los gérmenes pueden conservar su actividad durante varios días a condición de que sean mantenidos a 5°C antes de alcanzar 65 a 70°D (...89) Además, la ventaja de tener alta resistencia a los bacteriófagos (ver más adelante), ser buenos y confiables como adherentes o como recurso en casos de emergencia. (31) Sin embargo, son más caros que otros tipos de cultivos.

Los cultivos en polvo son cultivos líquidos que sufrieron desecación, sea por secado en una instalación de tipo spray o por liofilización. En el primer caso, el secado debe realizarse con muchas precauciones para no destruir una proporción masiva de gérmenes. El aire caliente que penetra en la instalación no debe poseer una temperatura superior a 85°C. Se pueden preservar entonces más allá del 50% de los gérmenes presentes inicialmente en el cultivo líquido. El secado no interviene generalmente sobre el cultivo solo, sino sobre su mezcla con almidón o leche seca a fin de reducir su humedad para obtener rápidamente un polvo, cuyo contenido, suficientemente elevado de materia seca, lo protege de la acción bactericida del calor. (89)

La liofilización es un procedimiento más reciente que consiste en secar el cultivo líquido previamente congelado, por sublimación al vacío. (89)

La liofilización está basada sobre el simple principio físico siguiente: mientras más baja es la presión de un líquido, más bajo es su punto de ebullición. A la presión atmosférica el agua hierve y se evapora a 100°C; pero si se disminuye la presión, la temperatura de evaporación desciende al mismo tiempo (...) a una presión inferior a 4.5 mm de mercurio, el punto de ebullición del agua es inferior a 0°C. (39)

Consecuentemente, si se coloca agua en un espacio cerrado y se extrae el aire, el agua inicia la ebullición con mayor intensidad a medida que la presión baja en el espacio cerrado. (39) No obstante, cuando la presión sea inferior a 4.5 mm de mercurio el agua no evaporada se congelará.

Si, inversamente, se congela el líquido para colocarlo bajo vacío elevado, se produce una evaporación en la superficie del líquido congelado hasta el momento en que la temperatura de ese líquido haya disminuido para alcanzar el valor correspondiente a la presión existente. (39)

Para obtener la evaporación del agua de una sustancia congelada bajo vacío elevado, se requiere proveer continuamente de calor, y simultáneamente, eliminar el vapor que se produce. La liofilización permite fabricar cultivos secos, cuyo contenido en bacterias viables nuevamente es del mismo orden que el de los cultivos líquidos. (39)

El inóculo puede ser sensiblemente reducido y la reactivación de los cultivos es muy rápida porque el primer subcultivo obtenido a partir del polvo liofilizado presenta ya una actividad conveniente.

La siembra directa de la leche de fabricación con cultivos liofilizados presenta algunas dificultades porque las bacterias tienen una fase de latencia demasiado larga.

3.1.7.2.4 Lugar de trabajo

Antes de mencionar los aspectos de mayor interés para la preparación de los fermentos lácticos, debemos, dada su importancia, establecer brevemente las características del lugar de trabajo.

Debe procurarse un área que siempre se mantenga limpia y que ofrezca protección contra la contaminación; de preferencia, alejada del área de producción o bien con una entrada independiente o no comunicada con la planta, para evitar la entrada de los microorganismos que en ella se encuentran.

El lugar debe destinarse exclusivamente a la preparación de los cultivos. No debe haber corrientes de aire y de ser posible, disponer de aire filtrado, éste deberá ser forzado al interior del área para lograr una presión mayor que en las áreas vecinas.

Todo el equipo necesario deberá colocarse dentro del área de trabajo cuyos pisos, paredes y techos deben ser de un material que resista la sanitización y los distintos tratamientos bactericidas. (53)

En la preparación de los cultivos y su propagación, se usan diversos continentes, los más usuales son recipientes de vidrio resistentes al calor, como los matraces de Erlenmeyer, provistos de un tapón de rosca o tapados con abundante algodón envuelto en malla y/o papel; que ofrecen, además, la ventaja de poderlos enfriar rápidamente sin riesgo de que se rompan.

Debe evitarse, en todo momento, que los fermentos entren en contacto con la atmósfera, pues en ella están presentes siempre microbios en cantidades variables.

Los recipientes que contengan la leche y donde se realicen las inoculaciones, deben estar estériles o perfectamente lavados y desinfectados. La operación deberá realizarse con la mayor higiene posible por parte del operador y trabajándose siempre en presencia del mechero de gas o una lamparilla de alcohol en su defecto. Esto permite, además de crear una corriente de aire caliente ascendente que impide la caída de polvo y microbios, poder flamear los cuellos de los recipientes y las pipetas o cucharillas de trabajo con que se realizan las inoculaciones.

3.1.7.2.5 Fermento madre

3.1.7.2.5.1 Selección de la leche

La selección de la leche que servirá para la propagación de los cultivos lácticos es muy importante. Frecuentemente se observan variaciones en la actividad de los cultivos, según se emplee leche descremada en polvo rehidratada, leche fresca descremada, leche entera o leche baja en calcio. El porcentaje de sólidos no grasos, la presencia o ausencia de grasa, la concentración de varias sales minerales, etc. de la leche, influyen el grado de acidez desarrollada, así como el sabor y el aroma producidos por los cultivos lácticos (según los requerimientos nutricionales anotados).

Cuando se utiliza leche descremada en polvo rehidratada que proviene de una buena leche descremada y desecada a baja temperatura, la formación de ácido y el desarrollo del sabor por los cultivos lácticos no difiere del que se obtiene con leche descremada fresca de buena calidad. Sin embargo, la cantidad de ácido formado en un período dado de tiempo y a una temperatura constante dependerá del contenido de sólidos. Mientras más sólidos haya, el número de bacterias

viabiles y la cantidad de ácido láctico serán mayores, aunque el pH sea más alto (menos ácido) debido a la acción buffer o amortiguadora de los sólidos; esto favorece a su vez la viabilidad bacteriana. Por ello, si los cultivos lácticos se inoculan en una leche rehidratada con bajo porcentaje de sólidos totales, el tiempo de incubación debe ser menor para evitar la pérdida de actividad bacteriana.

Una verdadera ventaja del empleo de la leche descremada en polvo, es que puede ser probada de antemano.

La leche fluída descremada es la más frecuentemente empleada en la propagación de los cultivos lácticos; sin embargo, el comportamiento de los cultivos puede variar día a día dependiendo de la calidad, del contenido de sólidos y del tratamiento térmico. Generalmente, un alto contenido de sólidos no grasos es preferible para el crecimiento de los cultivos lácticos. (53) Las variaciones estacionales de la composición de la leche a menudo producen variaciones en la proporción de las bacterias que contiene el cultivo (leucostoc y estreptococos), pero la adición de pequeñas cantidades de magnesio - un ml de una solución molar de sulfato de magnesio al 0.02 por galón (3.785 lt) de leche- elimina la variación. (53)

Algunos cultivos producen más ácido en leche entera que en la leche descremada. Se cree que ciertas fracciones estimulantes asociadas con la membrana del glóbulo graso son las responsables. La leche entera puede usarse satisfactoriamente en la propagación de los cultivos cuando se ha obtenido higiénicamente y ha sido cuidadosamente seleccionada (ver 3.1.7.3). Sin embargo, es conveniente someterla a prueba antes de utilizarla.

Leche con bajo contenido en calcio. Actualmente, los cultivos lácticos son más resistentes a la infección por bacteriófagos (ver 3.1.7.3.5), cuando son propagados en leche tratada con agentes que fijan los iones de calcio, que en la leche regular o la leche descremada rehidratada. Removiendo el calcio de la leche o adicionando fosfatos, oxalatos (oxalato de amonio 0.5%) o citratos que lo fijen, el control de los bacteriófagos es muy efectivo. La mayoría de los bacteriófagos de los estreptococos lácticos no se multiplican en un medio deficiente en iones de calcio porque el calcio es necesario para la completa adsorción y penetración del bacteriófago en la célula bacteriana. La repetida transferencia de un cultivo infectado por bacteriófagos en un medio pobre en calcio puede eliminar o liberar el fago del cultivo. Una concentración excesiva de los agentes fijadores de calcio, necesaria para inhibir a los bacteriófagos, retar

da o inhibe completamente el crecimiento de las bacterias lácticas.

Por otro lado, el grado de desarrollo y de ácido láctico producido por los cultivos lácticos en un medio pobre en calcio varía significativamente entre los cultivos.

3.1.7.2.5.2 Tratamiento térmico de la leche

Son varios los factores que deben considerarse para seleccionar la temperatura y el tiempo a los que se someterá la leche que va a utilizarse para la propagación de los cultivos lácticos o la preparación del fermento industrial.

El contenido bacteriano de las diferentes leches es variable y la exposición al calor debe seleccionarse de manera que destruya tantas bacterias como sea posible. El tratamiento térmico elevado no siempre inactiva a los diferentes inhibidores bacterianos que posee la leche cruda. Por otro lado, el calentamiento puede mejorar las propiedades de la leche como medio de cultivo.

El calentamiento de la leche a una determinada temperatura y la proporción de ácido que desarrolla un cultivo láctico en ella está relacionada con el tiempo de exposición al calor.

El tratamiento térmico óptimo de la leche destinada a la preparación del cultivo varía con el origen de la leche. De este modo, en algunos casos, un calentamiento a 82° durante 10 minutos o 72° durante 40 minutos permite obtener ulteriormente el desarrollo máximo de las bacterias lácticas.
(88)

Diferentes experimentos en los que se manejaron las variables temperatura y tiempo de exposición condujeron a resultados satisfactorios desde el punto de vista práctico en la propagación del cultivo madre en leche calentada a 120° durante 15 a 20 minutos, o bien, a 90°C durante una hora.
(53)

En el curso del calentamiento que se aplica a la leche (esterilización a 120°C/20 minutos) se operan modificaciones con respecto a su aptitud para el desarrollo microbiano; entre otros, podemos citar:

- Destrucción de inhibidores naturales: aglutininas y lactoperoxidasa (ver 1.3.1).

- Desaparición de substancias estimulantes naturales tales como aminoácidos y factores de crecimiento, que puede deberse a descomposición, o en el caso de los aminoácidos, a la combinación con la lactosa o sus productos de descomposición.
- Aparición de substancias estimulantes o inhibidoras, como consecuencia de la descomposición de ciertos constituyentes de la leche, en particular de: (1)
 - a) La betalactoglobulina, que hacia 80-90°C da origen a sulfuros volátiles con propiedades inhibidoras.
 - b) La lactosa, que en el curso de la esterilización en el autoclave o a temperaturas un poco inferiores origina substancias estimulantes, especialmente ácido fórmico.
 - c) La caseína, que en las mismas condiciones da origen a substancias estimulantes, péptidos y aminoácidos.
- Efectos del calentamiento sobre la caseína.

Se ha dicho que la caseína es una proteína "naturalmente desnaturalizada"; el calentamiento a 100° no provoca perturbaciones revelables en el complejo proteico que forma la micela de caseína. (1)

Es preciso exponer las soluciones neutras de caseína entera a temperaturas superiores a 100° para observar una degradación notable. Tras un calentamiento de una duración de 20 minutos a 120° (condiciones de la esterilización en autoclave), el 1.3% de nitrógeno, el 9% de fósforo y el 20% de ácido siálico se han liberado bajo forma no proteica (...). Un calentamiento más pronunciado provoca la desfosforilación total de la caseína (una hora a 135°); es probable que todo el ácido siálico se separe también en estas condiciones, mientras que solamente el 15% de nitrógeno se libera. El fósforo se encuentra en forma mineral; se ha roto el enlace éster con la caseína. (1)

La caseína sensible al calcio (α_B) se degrada con más intensidad que la caseína beta (ver 3.1.8.3).

Junto a las substancias nitrogenadas de molécula pe-

queña, se forman también péptidos no dializables, de peso molecular bastante elevado. A partir de la caseína kappa calentada a 120°C durante 20 minutos se ha obtenido un péptido cuya composición en aminoácidos semeja a la del caseíno-glicopéptido liberado por el cuajo. (1)

La respuesta de los diferentes gérmenes es evidentemente muy variable según su sensibilidad a estas diversas substancias de nueva formación en la leche calentada.

La cantidad de leche destinada a la preparación de los fermentos se distribuye en uno o varios matraces evitando que su llenado sobrepase las dos terceras partes y se somete al tratamiento térmico indicado, sea esterilización en autoclave o empleando un baño maría.

Si se trata de leche entera y el calentamiento se realiza en un recipiente al baño maría, suele formarse en la superficie del líquido una ligera película, constituida por esporas de gérmenes resistentes al calor. Esta película debe quitarse con una cucharilla estéril con cuidado de no remover el líquido y disgregarla, pues de este modo se reinfecta el medio.

(Las pipetas que se utilizan para la inoculación pueden esterilizarse en el autoclave, en el horno, o bien sumergirse en agua hirviendo).

3.1.7.2.5.3 Inoculación e incubación de la leche

Antes de continuar debe tenerse presente que la manera en que se prepara el fermento madre repercute sobre el fermento industrial y la preparación de este último repercute sobre el producto final. Debe establecerse, lo mejor que se pueda, la uniformidad en el trabajo para asegurar un producto de calidad constante.

La forma de trabajar difiere notablemente de una planta a otra en casi todos los aspectos; inclusive, el empleo de bacterias mesófilas puede variar dependiendo del laboratorio y tipo de cepas con que se preparan los fermentos en las distintas industrias. Por ello, lo más recomendable es la experimentación cuidadosa.

Después de analizar y escoger las cepas de uno o más laboratorios, en base a las características deseadas de producción, la observación y atento seguimiento del proceso de

elaboración iniciado desde la recepción de la leche, continúa ahora en:

- . La preparación del cultivo madre
- . La preparación del cultivo industrial

En su relación con la obtención del producto final.

La interrelación que guarda el tratamiento de la leche (clarificación, descremado, pasteurización, etc.) con el fermento madre, el fermento industrial y el producto, constituyen una cadena de efectos que culminan, en nuestro caso, con la elaboración de queso tipo Oaxaca. Únicamente la atenta observación y análisis de los factores indeseables y el conocimiento de los procesos de elaboración, permiten sugerir o instaurar modificaciones que mejoren la calidad del producto.

Después del tratamiento térmico, la leche para cultivos se enfría a la temperatura de inoculación. La temperatura a la que se siembran las bacterias depende del tipo de cepa que se utilice. Hay cultivos que se inoculan entre 21 y 23°C, otros a 30°C.

El procedimiento a seguir para inocular correctamente una leche con un cultivo comercial depende del tipo de presentación (desechado, liofilizado, etc.). El fabricante proporciona siempre las instrucciones para el manejo del envase y del producto. Por ejemplo, algunos laboratorio especifican:

"Para inocularse, la leche del cultivo madre debe enfriarse a 21.1-22.2°C. La cantidad de leche para inocular un sobre conteniendo aproximadamente 2 g del cultivo en polvo, es de 632 ml". (53)

La inoculación de la leche para la propagación del cultivo madre requiere un procedimiento que la proteja de cualquier contaminación, de lo contrario, ésta se acentuará en el fermento industrial. Deben esmerarse las precauciones de higiene en todo momento.

Una de las ventajas de los cultivos que se agregan directamente a la leche es que si algún tipo de contaminación se introduce a la leche al tiempo de inocularla, no será transportada en las distintas propagaciones.

Cuando se habla de la actividad de un fermento se entiende por ello, la cantidad de ácido elaborada en un lapso

de tiempo dado y a una temperatura determinada. (39) La combinación de estos dos elementos en la incubación de los cultivos, debe establecerse según el producto a elaborar, la disponibilidad de personal y equipo y el ritmo de trabajo de la planta transformadora; además de considerar, entre otros, los siguientes aspectos:

- . Tipo de leche.
- . Tipo y características de la cepa o cepas que componen el cultivo.
- . Cantidad de inóculo.
- . Velocidad de acidificación y edad del cultivo (mientras más fresco sea el cultivo sembrado, será más activo).
- . Velocidad de acidificación deseada para el fermento industrial (en atención a la leche y cantidad de inóculo acostumbrado, etc.).
- . Etc.

Hay cultivos que se inoculan entre 21 y 23°C durante 12 horas aproximadamente o más; otros se incuban a 30°C y al cabo de 5 a 6 horas alcanzan el grado de acidez deseada (dentro de los límites de tolerancia de las cepas utilizadas y siendo constante la cantidad de inóculo, a mayor temperatura, menor tiempo de incubación y viceversa). Pueden, incluso, hacerse combinaciones; incubar las primeras horas a una temperatura que acelere la acidificación y posteriormente disminuir la temperatura, para evitar una producción excesiva de ácido láctico.

Un fermento que ha alcanzado el máximo de acidez representa un cultivo en declive, que contiene muchas células muertas. (1) La máxima acidificación no coincide con el máximo crecimiento.

La temperatura de incubación de los fermentos congelados con nitrógeno líquido, puede variar entre 21 y 25°C dependiendo del tiempo de incubación deseado.

La incubación del cultivo termina cuando éste alcanza el grado de acidez requerido, merced a la intervención de todos los factores hasta aquí señalados. Para el fermento madre, la acidez final suele ser alrededor de 70°D.

Si el cultivo no sube de acidez o se presenta otra anomalía en cuanto a olor, sabor, producción de gas o apariencia, debe hacerse rápidamente una investigación del fermento.

Cuando el cultivo no pueda emplearse de inmediato al secarlo de la estufa, debe enfriarse rápidamente para evitar que la acidez continúe desarrollándose; para ello pueden sumergirse las botellas o frascos en agua con hielo hasta que alcancen una temperatura cercana a 7°C y posteriormente guardarse en refrigeración hasta el momento de su utilización. No deben guardarse más de 36 a 48 horas.

Además de la medida de acidez, la persona experimentada en la preparación de los fermentos, llega a reconocer visualmente el momento en que un frasco con cultivos se encuentra a punto, es decir, que presenta el grado de coagulación deseada; es entonces cuando debe enfriarse para mantener el balance de la cantidad de ácido producida o de otras sustancias precursoras de aroma, así como de la actividad bacteriana.

Cuando se trata de varias cepas en el mismo cultivo, deben considerarse las diferencias, por ejemplo, las bacterias productoras de ácido láctico son menos tolerantes al ácido que las productoras de ácido cítrico. Por ello, si se desea incrementar la proporción de bacterias productoras de ácido cítrico en un cultivo, el procedimiento usual es dejarlo en incubación un poco más de tiempo después de obtenida la coagulación de la leche.

La proporción de las bacterias productoras de ácido láctico en un cultivo, puede incrementarse disminuyendo el tiempo de incubación y enfriando el cultivo con menor adidez. (53)

Para cultivar juntas diferentes cepas de una misma especie o de diferentes especies, han de ser compatibles, es decir, capaces de crecer unas al lado de otras sin perjudicarse mutuamente. Es difícil mantener en ellas la proporción deseada de unos y otros organismos (19) (ver 3.1.7.3.3). Por este motivo se aconseja que se cultiven por separado las cepas puras y no se mezclen sino hasta el momento de la inoculación de la leche de quesería o en el momento de la preparación del fermento industrial.

Estos detalles y muchos otros se afinan durante la práctica diaria atendiendo al tipo de queso u otro producto lácteo que se elabore. No pueden describirse sino los conceptos fundamentales del manejo de las bacterias y los pasos de mayor importancia en la elaboración de los fermentos. Se recomienda acudir a la literatura general y a la que proporcionen los distintos laboratorios comerciales.

Una vez que el cultivo ha adquirido las característi

cas deseadas, se aparta una pequeña cantidad para su nueva propagación y el resto se destina a la elaboración de fermentos intermediarios o del fermento industrial.

La resiembra del cultivo se hace generalmente en razón del 1 al 5% en leche sometida al mismo tratamiento térmico que la anterior y considerando nuevamente todos los factores enumerados.

(...) Es posible transferir cultivos durante muchos años sin afectar sus cualidades. Varios fabricantes de queso han usado y transferido exitosamente un cultivo láctico por más de diez años, pero muchas compañías no pueden hacer esto y la práctica corriente es el empleo de un nuevo cultivo iniciador liofilizado cada tres o cuatro semanas. (31)

3.1.7.2.6 Fermento industrial

En realidad esta operación se reduce a una multiplicación de las bacterias que existen en el fermento madre o en el fermento intermediario.

Un fermento madre es un pequeño volumen de leche o suero con cultivos que se transfieren diariamente en tres o más botellas de donde la mejor de ellas es seleccionada para la producción del fermento industrial. (32)

La función principal del fermento industrial que se emplea para la fabricación de quesos es la producción de ácido a lo largo de todo el proceso y durante la maduración.

Una de las razones principales por las que no se utiliza directamente el fermento madre en la elaboración de queso o de otros productos lácteos es la economía; una planta que requiere muchos litros de fermento industrial al día generaría un gasto muy elevado con la compra de cultivos directos o necesarios para preparar el fermento madre.

El lugar de trabajo, de preferencia, debe estar apartado del laboratorio en que se prepara el fermento madre; pero las características descritas anteriormente (3.1.7.2.4) son las mismas.

La selección de la leche plantea las mismas posibilidades enumeradas en 3.1.7.2.5.1. El fermento puede prepararse a partir de leche entera, leche descremada fluida o en polvo rehidratada, así como medios iniciadores de venta comercial que poseen factores de crecimiento microbiano.

La leche es el material usual de transferencia para los fermentos industriales, pero medios alterados en su composición salina pueden utilizarse. Estos medios contienen polvo de leche descremada, sales de fosfato, dextrosa, dextrina y pancreatina. Muy recientemente, su uso se ha extendido en la preparación de fermentos industriales para quesos italianos u otras prácticas queseras. (31)

La leche descremada fluida libre de sustancias inhibidoras (antibióticos, bactericidas, etc.) y que posea una cuenta bacteriana baja puede emplearse satisfactoriamente. (53)

La leche rehidratada en polvo se recomienda cuando la planta no puede abastecer suficiente leche descremada al efecto; ofrece la ventaja de poder probarse antes de su uso.

Hay diferencias de opinión con respecto a la proporción en que debe rehidratarse, pero extensas experimentaciones indican que 4.54 a 5.44 kg (10 a 12 libras) de leche descremada en polvo en 40 a 41 litros de agua (88 a 90 libras) respectivamente, proporciona resultados satisfactorios. El agua empleada para rehidratar la leche, debe encontrarse libre de metales tóxicos y otros componentes químicos que inhiban el crecimiento bacteriano. (53)

La leche destinada a la preparación del fermento industrial debe calentarse en un recipiente destinado a ello. Y durante el calentamiento y enfriado la boca del frasco debe cubrirse con un filtro (hisopo) que prevenga la contaminación de bacterias y bacteriófagos presentes en el aire. (53)

Cuando se preparan grandes volúmenes de fermento industrial conviene el empleo de cubas especiales con agitador y camisa para agua y vapor. Es conveniente que todos los procesos, calentamiento, enfriamiento, inoculación e incubación, se efectúen en un mismo recipiente para disminuir el peligro de contaminación con el ambiente o por contacto superficial.

La leche (descremada o rehidratada), deberá calentarse a una temperatura que oscile entre 86 y 96°C durante una hora con las modificaciones que permitan la experiencia y el equipo disponible.

La cantidad de inóculo varía, en atención a las consideraciones anotadas para el fermento madre, entre 1 y 4% para el fermento industrial. El procedimiento de inoculación debe ser tal, que proteja al cultivo de cualquier contaminación o de lo contrario se incrementará en el queso.

La incubación (temperatura-tiempo y otros factores) puede oscilar entre 21 y 24°C durante 14 a 16 horas, pero tanto el rango de temperatura como el período de incubación, están sujetos a la variación que establezca la experiencia con los distintos tipos de fermentos.

La acidez final del cultivo industrial depende principalmente del tipo de leche utilizada (cantidad de sólidos) y del tipo de cepas en cuestión; algunas de ellas pueden resistir hasta 90 o 100°D.

La acidez titulable final del cultivo industrial preparado a partir de una leche descremada con un 9% de sólidos, no deberá exceder a 0.70% para lograr un máximo de actividad. Si la cantidad de sólidos es de 10 a 12%, la cantidad de ácido titulado no excederá de 0.85 y 1.0% respectivamente. Estos grados de acidez se refieren al cultivo enfriado y no al inicio del enfriamiento. (53)

Si el fermento industrial no va a utilizarse inmediatamente, deberá enfriarse para impedir un mayor desarrollo de la acidez. Si va a emplearse en su totalidad el mismo día, bastará enfriarlo a 10°C. Pero si alguna parte de él se utilizará hasta el día siguiente, deberá enfriarse a 7.2°C o ligeramente más frío. No es recomendable guardar el fermento industrial más de 24 horas después de su preparación. (53)

Cuando se utilizan cubas especiales para la preparación del fermento industrial, el fermento debe mantenerse en la misma cuba haciendo pasar por la camisa agua muy fría, salmuera o incluso añadir hielo.

Nunca debe prepararse el cultivo industrial del día a partir de una fracción del cultivo industrial de la víspera. (No solamente se corre el riesgo de provocar contaminaciones, sino que se favorece la multiplicación de gérmenes termorresistentes y esporulados que no fueron destruidos por el tratamiento térmico de la leche; 89).

3.1.7.3 Inhibición de los cultivos lácticos

Al cabo de un cierto tiempo, variable de unos casos a otros, habrá que acudir nuevamente al cultivo comercial para la preparación del cultivo madre, ya que éste va perdiendo gradualmente sus propiedades.

Las causas de ello son muy variadas; en algunas oca-

siones, los microbios van perdiendo progresivamente su actividad al ser continuamente sembrados en un mismo medio; en otros casos, cuando se trata de un cultivo compuesto por determinadas proporciones de cultivos puros, las proporciones iniciales se van perdiendo y predominan unos microbios sobre otros. Puede, por otro lado, deberse a algún problema de inhibición.

Numerosos factores pueden ser responsables de la inhibición o destrucción de las bacterias de los cultivos lácticos. La inhibición puede notarse por una ligera disminución o el cese total de la formación de ácido y/o la ausencia de los componentes saborizantes debido al decremento de la fermentación de ácido cítrico. (53)

Donde el ácido láctico no es producido por un cultivo iniciador a partir de la lactosa en el grado de velocidad deseado, el cultivo es llamado "lento". Casi cualquier condición que conduce al deterioro del crecimiento de las bacterias del cultivo resulta en un cultivo lento (...) Se conocen las causas de ello, pero no son conocidas completamente en todos los casos. (31)

Comunmente, varios factores se involucran al mismo tiempo en la inhibición, por lo que la remoción de una sola causa no soluciona el problema de inhibición. (53)

Algunas de las más importantes que deben tenerse en cuenta son las siguientes:

3.1.7.3.1 Técnica defectuosa

La técnica empleada en la elaboración de cultivos está estrechamente ligada a los principios de bacteriología que consideran las condiciones de desarrollo microbiano. Estas características fueron expuestas someramente en el inciso 3.1.7.1. y siguientes. No obstante, podemos insistir en algunos factores de extrema importancia.

La temperatura óptima para el crecimiento bacteriano y el desarrollo de acidez es variable; temperaturas muy elevadas (39-40°C) disminuyen grandemente el crecimiento bacteriano; otro tanto podemos decir cuando no se incuba a temperaturas regulares.

El cultivo madre o el cultivo industrial no siempre se utilizan de inmediato. Cuando el cultivo láctico se mantiene a la temperatura de incubación después de haber coagu-

lado, el pH del cultivo continuará disminuyendo hasta valores de 4.3 a 4.4. Se producirá más ácido del que las bacterias pueden tolerar trayendo como consecuencia la disminución de la actividad celular y la destrucción de algunas bacterias. Por ello, si el cultivo láctico no se emplea de inmediato debe enfriarse para retrasar el desarrollo posterior de ácido.

La contaminación masiva es también producto de una técnica defectuosa, lo que conduce a la obtención de fermentos anormales, con formación de gas, olores desagradables, etc. que obligan a recurrir nuevamente a la cepa comercial y a perfeccionar la técnica de elaboración.

3.1.7.3.2 Causas intrínsecas

Se refiere principalmente a las características de la leche:

A. Sustancias inhibidoras naturales (ver 1.3.1)

El tratamiento térmico aplicado a la leche para la elaboración de los cultivos debe ser el indicado para lograr, en la mayor proporción posible, la destrucción de las sustancias inhibidoras naturales; el empleo de leche cruda o mal calentada ocasiona trastornos en el curso normal de la acidificación.

Las propiedades de las cepas de bacterias lácticas pueden variar, sobre todo cuando se cultivan largo tiempo en el laboratorio (...). Pero se precisa prudencia al interpretar las variaciones de actividad y distinguir bien entre la sensibilidad a los inhibidores y la pérdida de poder acidificante. Con frecuencia se observa en el laboratorio (nos dice Ch. Alais), tras largas series de resiembras en leches sometidas a la acción del autoclave o en medios de cultivo, que determinadas cepas de bacterias lácticas, resistentes a las acciones inhibidoras, pierden progresivamente su aptitud para fermentar la lactosa y para producir ácido láctico (ver 2.8.2.1); por otra parte, puede observarse también que en las mismas condiciones, otras cepas desarrollan sensibilidad a los inhibidores (ya sea a la peroxidasa, y a las aglutininas), sin pérdida del poder acidificante. Estos dos tipos de cepas, sembradas en una leche que contenga inhibidores, no producirán prácticamente ácido por razones diferentes; las primeras cepas, insensibles a las lacteninas, prolifera-

rán en la leche, pero sin fermentar la lactosa; las segundas no se desarrollarán por el hecho de la inhibición. (1)

Las cepas "lentas" son aquellas que, por resiembra en el laboratorio, han perdido parcial o enteramente su poder acidificante (por oposición de las cepas "rápidas" que provocan una fermentación láctica enérgica). Sin embargo, las cepas lentas tienen un índice de crecimiento comparable al de las cepas rápidas; son más sensibles a la acción estimulante de los compuestos nitrogenados (...) que provoca un aumento del nivel de utilización de la lactosa y, por lo tanto, un aumento en la producción de ácido, sin acelerar el crecimiento. (1)

Se ha observado con frecuencia que la actividad de los fermentos lácticos varía según el origen de la leche utilizada. Igualmente se han señalado, en determinadas regiones, variaciones estacionarias. Parece que ni la lactoperoxidasa, ni las aglutininas, intervienen en este tipo de variaciones, ya que su contenido en la leche es bastante regular y parece no depender del individuo, de la raza, de la edad o del estado de lactación (exceptuando el calostro). Las sustancias estimulantes tienen probablemente un papel muy importante en estos fenómenos (1) (ver 1.3.2). Tal es el caso de las vitaminas del grupo B y la presencia de distintos aminoácidos, péptidos y proteosa-peptona.

El desarrollo de las bacterias lácticas está más condicionado por el contenido de la leche en sustancias activadoras, que por el contenido en sustancias inhibitoras (ver 1.3.2).

Por otro lado, el tratamiento térmico de la leche, según se apuntó anteriormente, da lugar a la formación de factores de activación para el desarrollo microbiano; además, destruye las enzimas que causan trastornos perjudiciales en la composición de la leche, principalmente la inactivación de las lipasas.

B. Leches de composición anormal o no aptas para la elaboración de fermentos

Las leches de composición anormal o pobres en factores de crecimiento ocasionan lentitud o ausencia de acidificación.

Las propiedades nutricionales de la leche varían lo suficiente para provocar diferencias en la proporción de ácido desarrollado por los cultivos lácticos. Una leche con un

alto contenido de grasa ocasiona un mayor crecimiento bacteriano y producción de ácido que una leche pobre en grasa (ver 3.1.7.2.5.1). Debe reconocerse que la leche con alto contenido graso posee también más lactosa, proteínas y sales minerales que una leche pobre en grasa. (53)

La leche cruda, además de contener las sustancias de inhibición en una proporción bastante constante, se compone de una flora microbiana contraria al desarrollo de los fermentos y que produce acidificación o fermentaciones indeseables.

Una asociación antagónica entre microorganismos en detrimento de uno de ellos se conoce como antibiosis. (53)

Cuando un cultivo láctico es adicionado a leche bronca que posee una flora bacteriana mixta, se produce comúnmente un antagonismo entre las bacterias presentes en la leche. El antagonismo puede deberse al crecimiento competitivo, o bien, a la producción de sustancias antibióticas por los cultivos lácticos. (53)

La leche proveniente de animales enfermos de mastitis (ver 2.1.4), leche calostrual o de la etapa final del período de lactación, son altamente perjudiciales y contrarias al desarrollo de las bacterias lácticas.

Leche con lipasas activas (leches rancias o en vías de enranciamiento); liberan ácidos grasos que pueden tener un efecto tóxico (caprílico, cáprico y láurico; 32).

(...) el St. lactis, especie corriente de los fermentos, es especialmente sensible a la rancidez; basta una proporción de 5% de leche rancia en una leche de mezcla para retrasar el crecimiento. (1)

3.1.7.3.3 Cepas de bacterias lácticas que producen sustancias inhibidoras.

Algunos estreptococos lácticos producen sustancias inhibitorias, además del ácido láctico, contra cierto número de microorganismos existentes en el queso (...32). Estas propiedades de algunos estreptococos refuerzan la barrera contra los organismos indeseables.

Sin embargo, las sustancias producidas por algunos de estos estreptococos afectan la flora de los fermentos lácticos.

Las sustancias producidas son la "nisina", por las cepas de Streptococcus lactis y la "diplococcina" por las cepas de Streptococcus cremoris. (1)

Las cepas productoras de antibióticos son comunes en la leche, los fermentos y los quesos; son las "cepas inhibidoras". (1)

La nisina es la más conocida de las sustancias antibióticas producidas por los estreptococos lácticos. Presenta un especial interés, ya que es el primer antibiótico utilizado en la práctica de las industrias alimenticias. (1)

En realidad no se trata de una nisina sino de varias, ya que está formada por una mezcla de polipéptidos. (1, 32)

Las proporciones relativas de estos péptidos varían con las cepas de Str. lactis y con las condiciones de cultivo: composición del medio y temperatura. Estos diferentes péptidos no poseen la misma actividad; por este hecho, el "espectro antibacteriano" puede variar según las preparaciones. (1) Por ejemplo, un grupo de Str. lactis fue cultivado a 20°C y a 30°C. En la incubación de temperatura más elevada se obtuvo una nisina activa contra el Str. cremoris y el Str. agalactiae. En la producida a más baja temperatura de las dos, se obtuvo una nisina activa contra el Str. cremoris, pero inactiva contra el Str. agalactiae. (32)

La nisina es activa para numerosas bacterias grampositivas; independientemente de otras bacterias lácticas (Streptococcus y Lactobacillus); citaremos los Clostridia y los Mycobacteria, como el Mycobacterium tuberculosis. Es inactiva contra las bacterias gramnegativas, frecuentemente encontradas en los productos lácteos, como las del grupo del E. coli.

En cualquier muestra de leche cruda el número de estreptococos inhibidores oscila del 0 al 100% de la población total bacteriana. (32)

La pasteurización de la leche destruye los estreptococos lácticos inhibidores, pero no destruye sus sustancias inhibidoras. Si leche pasteurizada, que contiene grandes cantidades de estas sustancias es inoculada de nuevo con cultivos de bacterias sensibles, se produce escasa cantidad de ácido láctico. (32)

El estreptococo láctico más sensible a la nisina es el Str. cremoris, pero muchos lactobacilos son igualmente susceptibles. (32)

Cultivos resistentes de estreptococos y lactobacilos pueden seleccionarse a partir de los que sean sensibles a la nisina, mediante sucesivas multiplicaciones, en un medio que contenga concentraciones del antibiótico progresivamente mayores.

La resistencia a la nisina de ciertas cepas de bacterias lácticas y de otras familias, como los estafilococos, es paralela a la producción de una "nisinasa". Esta enzima destruye específicamente la nisina; pero es inactiva contra otros antibióticos, aun los de naturaleza polipéptica. (1)

La nisina es relativamente estable a altas temperaturas. No se destruye o sólo lo es muy ligeramente, cuando se la somete a una temperatura de 100°C durante unos minutos. Su actividad se reduce aunque no del todo, si se la trata en autoclave. Entre pH 4 y 7, asociada con leche y queso, la nisina es activa. Esta actividad, en el queso natural o en el fundido, persistente durante muchos meses, con tal que no existan bacterias destructoras de la nisina. (32)

La diplococcina producida por el Str. cremoris es una substancia diferente de la nisina. No contiene tanto azufre como aquella y es inactivada por el alcohol etílico. Pero al igual que la nisina, es termoestable y no inhibe a los organismos gramnegativos. (32)

Es preciso observar que cada una de estas substancias es muy activa contra el germen que produce la otra substancia; las dos especies son por consiguiente, antagónicas. (1) La diplococcina inhibe notablemente al Str. lactis, mientras que la nisina inhibe marcadamente al Str. cremoris. (32)

En los fermentos en que participan los lactobacilos (Lactobacillus lactis, principalmente), su crecimiento es, en general, más lento que el de los estreptococos lácticos, pero produce del 2 al 3% más de ácido láctico.

El ácido láctico tiene un efecto inhibitor a estos altos niveles, pero no es el único producto que los lactobacilos proporcionan. También se produce peróxido de hidrógeno o substancias que producen la reacción del peróxido. Estas substancias acumulan hasta 200 microgramos por ml en cuyo punto alcanzan los lactobacilos el límite máximo de tolerancia. En tales concentraciones, los peróxidos son inhibidores para ciertas bacterias, incluyendo los estafilococos, estreptococos, coliformes y clostridias (...) Muchas de es-

tas bacterias son susceptibles a concentraciones más pequeñas. Algunos estafilococos, por ejemplo, no pueden tolerar 4 microgramos por ml. (32)

La acción inhibitoria, influenciada grandemente por la temperatura de incubación, actúa solamente en presencia de células vivas de lactobacilos, ya que el peróxido de hidrógeno se descompone rápidamente en su ausencia. Dicha acción es ejercida aun cuando las bacterias sensitivas, como sucede con los estafilococos sean productoras de catalasa, incluso en condiciones relativamente anaeróbicas. (32)

3.1.7.3.4 Presencia de antibióticos y antisépticos

El empleo de antibióticos en el ganado vacuno, especialmente aquellos que se aplican por vía intramamaria, se eliminan en la leche.

Las soluciones a los viejos problemas a menudo plantean otros mayores y la adopción de la penicilina como eficaz producto antimastítico no es una excepción aislada. Las bacterias usadas como fermentos en la leche, en la manteca y en el queso, no pueden desarrollarse en leche contaminada con antibióticos. (32)

Si 1 ml de cultivo iniciador es añadido a 10 ml de leche previamente calentada a alta temperatura, libre de antibióticos e incubada a 35°C, no produce coagulación y acidez titulable mayor de 0.70% al cabo de cuatro horas, se trata de un cultivo lento. El grado de lentitud depende del porcentaje de ácido láctico. Cuando no hay desarrollo de ácido, indica "muerte" del cultivo. (31)

La cantidad de antibióticos que pasan a la leche de vacas sometidas a tratamiento es variable, aun cuando a distintas vacas se les haya inyectado o aplicado la misma dosis. (32)

Factores importantes que contribuyen a la variabilidad mencionada son:

- a) Las características individuales y condiciones de la vaca y de su ubre

Las vacas no son semejantes en lo que se refiere a su facilidad para expulsar, a través de la leche, el antibiótico inyectado, según sus condiciones fisiológicas individua

les. Aun en los diferentes cuartos de la ubre de una misma vaca, la difusión de la penicilina en la leche varía tanto como entre una vaca y otras. Es también evidente que las ubres sanas segregan más penicilina que las ubres infectadas. (32)

De cualquier modo, todos los medicamentos de aplicación en el ganado lechero, deben indicar (previo estudio que considere los factores anteriores), el tiempo que debe transcurrir desde su aplicación hasta la completa eliminación del medicamento.

b) La dosis inicial del antibiótico

La cantidad de antibióticos retenidos por la leche está directamente influida por las dosis empleadas. Grandes cantidades administradas a las vacas se traducen en cantidades proporcionalmente grandes en la leche. Dosis terapéuticas de antibióticos como la penicilina se usan en concentraciones de 25,000 a 100,000 UI por cuarto de la ubre o aún más. (32)

Comunmente, dosis masivas de penicilina son inyectadas a los animales enfermos. La leche proveniente de la primera ordeña seguida a la inyección contiene varios miles de unidades de penicilina por litro (...89).

Se estima, en término medio, que un animal tratado en un hato de cien vacas, existe el riesgo de ocasionar perturbaciones en la fabricación de quesos. Cuando el 10% de los animales son tratados, la leche del hato resulta prácticamente impropia para quesería. (89)

Es necesario considerar la cantidad o dosis crítica, a partir de la cual se observa una depreciación en la fabricación de queso. Esto depende del modo de fabricación y de la sensibilidad de las bacterias.

(...) En lo que se refiere a la penicilina, los estreptococos son más sensibles que los lactobacilos; los primeros son inhibidos por 50 a 300 UI por litro, los segundos, por 300 a 600 UI según las cepas (1) (UI = Unidad Internacional; corresponde a 0.6 microgramos de penicilina G de sodio pura cristalizada).

Los problemas que plantea el uso de la penicilina, son idénticos a los que presentan otros antibióticos (estrep-tomicina, terramicina, aureomicina, neomicina, etc.).

La aureomicina prácticamente detiene por completo el

desarrollo de ácido láctico por los cultivos cuando se encuentra en cantidades de 0.5 microgramos por ml. (33)

Sulfas en la leche. Las sulfas, como la sulfametacina, se emplean solas o en combinación con antibióticos para el control de las infecciones de la ubre. Krienke (citado por 53), observó que el desarrollo de acidez por los cultivos se inhibe ligeramente en la leche que contiene 0.1 ml de una solución de sulfametacina al 25% y prácticamente no hay desarrollo de acidez cuando la leche contiene 5 ml por cada 100 ml. (53)

Por otro lado, (...) está comprobado que pequeñas cantidades de antibióticos, por insignificantes que sean, estimulan el crecimiento bacteriano, mientras que en más elevadas concentraciones, el mismo antibiótico actúa como inhibidor. (32)

c) La cantidad de leche que se produzca

La escasa producción de leche, consecuencia de diversas condiciones -incluida la larga duración del estado de lactancia-, va asociada a un gran número de antibióticos en la leche de las vacas tratadas. Generalmente, alrededor del 50% de la penicilina u otro antibiótico inyectado al ganado se incorpora a la leche, y casos hay en los que se incorpora una mayor cantidad.

d) El tipo de preparación antibiótica

El tipo de preparado antibiótico es de gran importancia al influir sobre la retención de la penicilina en la ubre durante un período más largo y por lo tanto facilitan la entrada del antibiótico en la leche durante más tiempo.

Bactericidas en la leche

Los bactericidas pueden incorporarse a la leche en la granja o en la planta. Una de las principales causas de los bactericidas en leche es un mal drenado de las tinas y líneas de leche después de un tratamiento bactericida. Los bactericidas más comunmente empleados son los compuestos clorados, yodados y los cuaternarios de amonio, estos últimos tienen el mayor efecto en los cultivos lácticos. Un decremento muy significativo en el desarrollo de acidez en la leche se produce por la presencia de 3 ppm de sales cuaternarias de amonio. Con más de 50 a 100 ppm se suspende la pro-

ducción de ácido. Los compuestos clorados (hipocloritos, cloramina-T, etc.) presentes en la leche, disminuyen la producción de ácido láctico cuando están presentes en cantidades de 5 ppm o más. Una inhibición considerable es causada por 25 ppm. Los yodóforos no influyen en el desarrollo de acidez ni en el crecimiento bacteriano cuando están presentes en concentraciones de 5 a 50 ppm. (53)

Otro tanto puede esperarse con la presencia de detergentes, soluciones de sosa, etc. en los recipientes mal lavados y/o enjuagados.

3.1.7.3.5 Bacteriófagos

La comprensión de la inhibición por bacteriófagos implica amplios estudios de virología, debido a la complejidad de los conocimientos que deben manejarse. En este inciso nos limitaremos a mencionar algunos aspectos de interés general, complementados en el inciso siguiente con lo relativo a su control. Dada la importancia que tienen en la práctica lechera, convidamos a emprender un estudio más profundo en los textos y manuales de virología general, así como la consulta de literatura especializada.

Los bacteriófagos (virus de las bacterias), desintegran a algunas células bacterianas susceptibles. Su acción consiste en adsorberse a la bacteria e introducirle los componentes esenciales de la réplica del bacteriófago para que la célula bacteriana sintetice las proteínas y el DNA viral, se formen las nuevas partículas virales y ocurra la lisis celular con eliminación de las partículas virales maduras. (53)

Los bacteriófagos fueron identificados como causantes de la inhibición de los fermentos o provocadores de acidificación lenta; para manifestarse requieren forzosamente de células huésped respectivas.

(...) Sin embargo, cada bacteriófago ataca únicamente cepas específicas de bacterias, y si éstas no están presentes en la leche, la fermentación procede normalmente. (31) No obstante, algunos fagos pueden atacar a más de una cepa bacteriana.

Una partícula viral produce cerca de 200 nuevas partículas durante la lisis y cada partícula puede producir, en presencia de nuevos huéspedes un número similar de partículas y así sucesivamente. (31)

Una de las dificultades en el estudio de estos virus es su diminuto tamaño. Las partículas activas que atacan a los estreptococos lácticos productores de ácido no pueden verse con el microscopio ordinario debido a que su longitud oscila entre 180-280 nm. La sección anterior (cabeza) (en cuyo interior se encuentra el DNA), tiene 60-90 nm de diámetro y la sección de la cola de 120 a 190 nm de longitud, por 20-40 nm de espesor. El pequeño tamaño de los fagos y el gran número que se libera durante la lisis celular causa una extensa contaminación del aire y el equipo de una planta. (53)

Son muchos los factores que determinan el ataque bacteriano por los bacteriófagos, algunos de ellos son:

- . Susceptibilidad o especificidad bacteriana.
- . La concentración de partículas virales y sus propias características (tiempo empleado para reproducirse, etc.).
- . Porcentaje de calcio y fósforo en el medio (los iones de calcio son indispensables).
- . Etc.

Un pH alto o bajo no es particularmente crítico para la viabilidad de los bacteriófagos. Dado un medio ambiente libre de factores restrictivos, algunos bacteriófagos resistentes pueden sobrevivir durante 10 años.

Existen cepas lisógenas, contaminadas simbióticamente por el bacteriófago, bajo una forma no infecciosa: el probacteriófago; de este modo se perpetúa el bacteriófago hasta que interviene la lisis. El desencadenamiento de la transformación del probacteriófago en bacteriófago se encuentra bajo la dependencia de factores externos (rayos UV, agentes químicos, etc.). (1)

El estado de la bacteria tiene importancia; la lisis no tiene lugar más que en bacterias jóvenes y en vías de crecimiento. En general, el medio favorable a la bacteria conviene también al fago, a condición de que contenga calcio, triptófano y tal vez otras sustancias indispensables. (1)

Lisina asociada con bacteriófagos. Algunos cultivos de *Str. lactis* y *Str. cremoris* resistentes a un tipo particular de fago, pueden sufrir lisis cuando se mezclan con fagos y células sensibles a la acción de los fagos. La lisis es causada por una enzima asociada con el fago. Aunque el fago es necesario para la síntesis de la lisina, no se forman fa-

gos adicionales por la acción de la lisina sobre las células bacterianas. (53)

La presencia de la lisina se evidencia a menudo con los procedimientos de detección de bacteriófagos. Un filtrado libre de bacterias proveniente de un cultivo puede contener tanto a los virus como a la enzima. Cuando ambas están presentes, un cultivo que no es sensible a la acción viral puede sin embargo sufrir lisis por la enzima.

La presencia de fagos en cuanto a salud pública no es tan crítico como la existencia de antibióticos en la leche, pero cuando disminuye la fermentación láctica en la leche, se favorece el crecimiento de bacterias indeseables.

La industria lechera ha tenido muchos problemas con la acción de los bacteriófagos. Sin embargo, el conocimiento de la acción viral y los métodos para controlarla aumentan sólidamente. (53)

3.1.7.4 Procedimientos de control y evaluación

Este inciso no es otra cosa que complemento del anterior, por ello seguiremos la secuencia de los puntos tratados en la Inhibición de los Cultivos Lácticos.

a) Técnica de preparación

En cuanto a esta técnica, debemos insistir en la adecuada preparación del personal encargado de los fermentos.

Los cultivos madres que se preparan continuamente en una planta deben ser examinados para descubrir posible contaminación. Si los cultivos se preparan en botellas de vidrio transparentes, éstas deben ser examinadas visualmente después de la coagulación para descubrir trazas de gas y crecimiento superficial como evidencia de contaminación. El examen microscópico de la especie es útil con tal de que la observación la realice una persona que conozca la morfología del cultivo. (53)

El examen microscópico sólo revela la contaminación cuando el agente contaminante es de forma diferente que el germen deseado y muy abundante. Otros métodos consisten en la siembra del cultivo en placas de un medio de agar que permite el crecimiento de los contaminantes, pero no de los microorganismos deseados. (19) El medio en placas puede ser agar papa-dextrosa acidificada para la detección de hongos y

levaduras, un medio selectivo para bacterias coliformes, o agar para cuenta en placa.

También se pueden hacer pruebas para detectar la presencia de substancias que no pudieron haber sido producidas por el microorganismo en cuestión; por ejemplo, la presencia de catalasa en un cultivo de bacterias lácticas catalasa-negativas demostrará la presencia de contaminantes catalasa-positivas. (19)

La mayoría de los cultivos producen ácido lentamente, inoculados en leche a temperaturas de aproximadamente 39°C. Sin embargo, si la temperatura es más baja, de 20 a 35°C y se eleva gradualmente hasta 39°C, la producción de ácido procede rápidamente. Es decir que el cultivo se aclimata a la temperatura elevada.

Cada uno de los pasos necesarios en la propagación de los cultivos requiere mucha vigilancia hasta llegar a la refrigeración adecuada cuando el fermento no se utiliza de inmediato.

b) Causas intrínsecas

La leche que se emplee para propagar un cultivo o para la elaboración de los productos lácticos en los que se empleen cultivos, debe ser de buena calidad.

El tratamiento térmico debe aplicarse rigurosamente.

Muchas plantas elaboradoras de lácteos prefieren emplear leche en polvo descremada para la propagación de los cultivos. Esta práctica permite probar el producto antes de emplearse para estar seguros de que se obtendrá un buen crecimiento del cultivo.

Cuando la leche muestre características inhibitorias, debe determinarse la causa de la inhibición. Los procedimientos de laboratorio disponibles permiten detectar leches "mastíticas", rancias, etc. Se recomienda consultar la última edición del Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (2)

Cuando se trata de comprobar la idoneidad de varias muestras de leche fresca o rehidratada (para el crecimiento bacteriano), todas deben someterse al mismo tratamiento térmico, de lo contrario puede llegarse a conclusiones falsas sobre la actividad de un cultivo en cuanto a crecimiento y formación de ácido.

c) Bacterias lácticas que producen sustancias inhibidoras

Debido a que el tratamiento térmico en autoclave de una leche en donde crecieron bacterias productoras de sustancias inhibidoras, únicamente reduce la actividad de dichas sustancias, se recomienda el empleo de cepas resistentes o el cambio de la leche destinada a la preparación de los fermentos.

d) Presencia de antibióticos y antisépticos

La leche susceptible de contener penicilina no debe emplearse en la elaboración de fermentos.

Debe destacarse el hecho de que la penicilina es un antibiótico muy resistente al calor, no se inactiva en el curso de la pasteurización de la leche y sólo se destruye parcialmente en el autoclave (10 min a 1 kg/cm²). (1)

Cuando se entregue una leche con antibióticos a la fábrica, debe hacerse por separado y nunca debe mezclarse con la leche proveniente de animales sanos.

Desgraciadamente, esta precaución elemental está lejos de observarse siempre y los industriales se han visto en la necesidad de buscar los medios que les permitan trabajar, más o menos normalmente, las leches que contienen antibiótico. (89)

La adición de grandes cantidades de fermentos no logra oponerse al desenvolvimiento de los antibióticos, por es casa que sea la concentración de estos y, por otra parte, no sería práctica su aplicación. A la luz de estas dificultades pueden seguirse dos caminos: (32)

- Neutralizar los efectos antibióticos con medios científicos.

Los dos medios científicos más prometedores son: la aplicación de fermentos resistentes y el uso de una enzima (penicilinasas) que puede inactivar a la penicilina. (32) Esta enzima es aislada y preparada en el laboratorio a partir de cultivos de diversos gérmenes (bacilos y estafilococos). (89)

El método es muy costoso y puede preferirse al empleo de cepas lácticas seleccionadas en función de su resistencia a la penicilina. Estas cepas de fermentos penicilina-resistentes son aisladas y

distribuidas por los laboratorios especializados.
(89)

La penicilinas, como cualquier enzima, tiene condiciones óptimas de acción dependiendo de la concentración, el tiempo de reacción, pH, temperatura, etc.

La leche que se emplea en la elaboración de los fermentos, debe chequearse regularmente empleando métodos muy sensibles a la presencia de antibióticos. Existen preparados comerciales que determinan residuos de penicilina en la leche, en concentraciones de 0.002 UI de penicilina por ml de leche.

- Efectuar el control de antibióticos, educando y regulando la producción.

La presencia de bactericidas también puede evitarse teniendo precauciones en su manejo y efectuando un enjuague conveniente; para su detección, existen procedimientos de laboratorio (consultar 2).

e) Bacteriófagos

El control de los bacteriófagos, al igual que el de las bacterias o el de cualquier otro microorganismo, exige el conocimiento de los factores que resultan favorables a su propagación y viabilidad para poderlos contrarrestar o suprimir.

Debido a que los bacteriófagos se multiplican únicamente en presencia de células vivas susceptibles, sería conveniente hacer hincapié en que cualquier material que contenga gran cantidad de organismos de cultivo láctico es una fuente potencial de bacteriófagos. El suero de las tinas de quesería, las prensas de queso y el agua de enjuague de los recipientes en que se preparan los fermentos, etc. deben considerarse como fuentes de bacteriófagos.

Debe reconocerse que por ligera que sea la contaminación del cultivo madre, generalmente conducirá a una mayor contaminación del cultivo industrial. Frecuentemente se encuentran muchas células destruidas por la gran concentración de bacteriófagos en el cultivo industrial y en la leche de la tina para queso inoculada con un cultivo contaminado. (53)

Los medios de control y supresión de los bacteriófagos comprenden:

● Sanitización

Cualquier planta que utiliza cultivos lácticos debe seguir un estricto programa de limpieza. Todo el equipo debe ser lavado perfectamente y antes de usarse debe ser enjuagado con un bactericida.

Los fagocitos (bacteriófagos) de los estreptococos productores de ácido láctico presentan por lo menos el mismo grado de resistencia a las condiciones del medio que los envuelve y a los agentes esterilizadores, que las bacterias que sufren lisis. En algunos casos la resistencia de los virus es superior. (53)

Entre varios agentes que atacan a los virus, los hipocloritos, los cuaternarios de amonio y las radiaciones ultravioleta, son por orden descendente, los más efectivos en la destrucción de bacteriófagos (32) (la investigación de la destrucción de los fagos por cuaternarios de amonio indica que no son tan efectivos como los hipocloritos; 53).

Si una planta está experimentando dificultades con fagos, no solamente el equipo, sino también las paredes, techos y pisos deben ser lavados y sanitizados el mismo día. Preferentemente toda la planta debería ser limpiada y sanitizada en el mismo día. (53)

Los niveles de cloro en baños de agua para mantener el equipo deben ser de 200 a 300 ppm y mucho más altos para la desinfección del lugar de trabajo (500 a 1000 ppm).

Los bacteriófagos siempre están presentes en cualquier fábrica de quesos y en sus instalaciones. Al final de la elaboración de los quesos, los fagocitos han contaminado la leche, el suero y el queso. Si los fagocitos son específicos, encontrarán en los cultivos lácticos magníficos substratos en los cuales multiplicarse. (32)

Sin embargo, si la contaminación inicial de fagocitos es escasa, las bacterias lácticas pueden tener tiempo para crecer y producir ácido láctico suficiente para la elaboración de los quesos. El extremo más importante es reducir al mínimo la concentración inicial de fagocitos. (32)

Destrucción de los bacteriófagos por el calor. Los bacteriófagos en la leche no son completamente destruidos por las temperaturas de pasteurización usuales (...). Este hecho indica las considerables precauciones que deben tenerse para prevenir su contaminación. La alta temperatura nece

saría para la destrucción de los fagos enfatiza el deseo de destruirlos del equipo empleando bactericidas clorados mejor que el calor. (53)

El tratamiento térmico a 75°C durante 30 minutos u 80°C durante 20 segundos destruye a la mayoría de los bacteriófagos. (31)

La separación de la grasa del suero de quesería realizada lejos de la tina de cuajada es otra práctica preventiva que merece citarse, debido a que el suero contiene una gran cantidad de partículas de bacteriófagos.

- Mucha asepsia en la preparación de los cultivos

El manejo aséptico de los cultivos no siempre se consigue en las fábricas o en los laboratorios.

Usando equipos esterilizados e instrumental de cristal con buenos tapones de algodón en el laboratorio y utilizando el mechero y los cultivos con una correcta técnica bacteriológica, los peligros de la infección se reducen al mínimo.

En las fábricas en que se preparan grandes cantidades de fermento industrial, deben considerarse medidas de control adicionales (lugar de trabajo independiente, utilización de cubas especiales, educación del personal, etc.).

- Selección de fermentos y cultivos

Esto se basa en la relativa especificidad de los bacteriófagos a determinadas cepas de fermentos lácticos.

La actividad de los bacteriófagos contra una cepa de Str. lactis o Str. cremoris puede no ser activa contra otra cepa. Este hecho es reconocido por los proveedores de cultivos y por ello se preparan cultivos que contienen varias cepas de bacterias productoras de ácido láctico. Las cepas de este cultivo múltiple se seleccionan en base a su compatibilidad y su sensibilidad a los fagos. Cepas sensibles al mismo tipo de fago no están contenidas en el mismo cultivo. Si un cultivo láctico se compone de varias cepas y únicamente una de ellas es lisada, el desarrollo de la acidez por el cultivo no se detiene, únicamente experimenta una ligera reducción. Por ello, un cultivo con muchas cepas ofrece mayor protección contra los fagos que un cultivo de una sola cepa. (53)

(...) Si la especie dominante de un cultivo mixto su

cumbe a un ataque, el heredero presuntivo o la siguiente cepa dominante mantiene una fermentación acidoláctica satisfactoria. (31)

(...) Cuando los problemas con bacteriófagos aparecen, el cambio a otro distribuidor de cultivos es de dudoso valor para el fabricante de quesos, si la cepa iniciadora proviene del original de la compañía de cultivos, pero distribuida bajo otra filial. Los fabricantes deben estar prevenidos de esta posibilidad y deben checar la fuente básica del cultivo para ahorrar tiempo y resolver el problema cuando aparecen los cultivos lentos. Las compañías comerciales elaboradoras de fermentos ofrecen muchos servicios, generalmente sin cargo extra. En la actualidad, la mayoría de los fermentos están probados frente a fagos y se preparan bajo condiciones normalizadas. (31)

- Rotación de cultivos

Muchas plantas emplean un sistema de rotación de cultivos para ayudar al control de los fagos. Un plan de rotación consiste en alternar los cultivos de un día a otro. Para que ese plan resultase exitoso, los cultivos de rotación deben ser seleccionados en base a su sensibilidad a los fagos. Un cultivo empleado un día no debe utilizarse nuevamente en la planta por varios días. La planta y el equipo son limpiados y sanitizados varias veces antes de que el cultivo sea empleado. Con este procedimiento, una alta concentración de fagos que son activos contra un cultivo no se desarrollan.

La renovación frecuente de los fermentos y el empleo de cultivos de uso directo da más protección contra los fagos; la renovación está indicada especialmente cuando se emplean cultivos de cepas múltiples.

- Confirmación

Cuando se sospeche la presencia de bacteriófagos en los fermentos, en el suero o en la leche de quesería, debe confirmarse recurriendo a métodos analíticos.

La detección de bacteriófagos en un cultivo requiere equipo especial de laboratorio y depende del número de cepas sensibles a los fagos, disponibles para la prueba.

Se recomienda nuevamente acudir a los manuales de virología para el estudio y comprensión de los métodos de detección.

Evaluación

Únicamente mencionaremos dos elementos de interés general:

A. Grado de acidez desarrollada

Algunas veces es deseable hacer comparaciones entre los cultivos en cuanto al grado de acidez desarrollada. El procedimiento usual es medir el cambio de pH o el incremento de la acidez titulable bajo condiciones normalizadas. Debe tenerse presente que factores tales como el aprovisionamiento de la leche y el tratamiento térmico de la misma, influyen en la proporción de acidez desarrollada. Las variaciones causadas por el abastecimiento de la leche pueden eliminarse empleando leche descremada en polvo preparada con el mismo lote de polvo durante un tiempo considerable. La leche debe ser calentada exactamente del mismo modo en cada prueba. (53)

Un procedimiento satisfactorio para determinar el grado de acidez desarrollada, es rehidratar leche descremada en polvo disolviendo 100 g de polvo en 900 ml de agua destilada. La leche descremada rehidratada se distribuye en botellas (100 ml por botella) y se calienta con vapor de agua durante media hora. Después del calentamiento, la leche se enfría a 30°C y se inocula con 1 ml del cultivo que va a probarse. La leche inoculada se mezcla y una porción de ella (usualmente 9 g) se titula con hidróxido de sodio 0.1 N hasta el punto final con fenolftaleína (ver 2.8.4). Este valor de la titulación es la acidez original y se resta al valor de la titulación obtenida posteriormente para calcular el desarrollo de acidez. La porción restante se incuba a 30°C. Las titulaciones siguientes se realizan después de tiempos de incubación de 2, 4 y 6 horas. Un cultivo activo debe mostrar acidez desarrollada de 0.04, 0.22 y 0.55 g después de 2, 4 y 6 horas respectivamente. Se emplea la temperatura de 30°C, porque es la temperatura generalmente usada para la maduración de la leche en la elaboración de queso y se considera que es la temperatura óptima de crecimiento para el Str. lactis y Str. cremoris. (53)

B. Producción de gas

Bajo condiciones normales la mayoría de los cultivos son estables en la cantidad de gas producida. No obstante, cantidades anormales de gas son producidas algunas veces debido a cambios metabólicos resultantes de mutaciones, ligera

infección bacteriana, cambios en las proporciones entre las cepas o especies del cultivo y por contaminantes. En tales casos, las cantidades anormales se detectan por burbujas de gas en un coágulo uniforme. Sin embargo, la producción de gas durante los primeros estadios de incubación no puede observarse, por lo que deben emplearse otros métodos. (53)

En los laboratorios donde los cultivos lácticos se analizan rutinariamente para la producción de gas, cualquier cultivo que muestre un incremento repentino no debe usarse en las operaciones comerciales.

3.1.7.5 Adición de fermentos lácticos a la leche de quesería

La leche que ha llegado a la tina de cuajar, debe asegurarse, por su calidad química y microbiológica, la obtención del producto deseado. Para ello, todas las consideraciones anotadas hasta aquí deben encontrarse en condiciones óptimas para que la adición de fermentos lácticos cumpla su cometido.

La aptitud de la leche para permitir el desarrollo de las bacterias lácticas es una característica muy importante en quesería, dado el papel capital que tienen en la fermentación láctica. Si las bacterias lácticas no pueden desarrollarse a una velocidad suficiente en la cuajada, se hace imposible la fabricación de queso de buena calidad, e incluso llega a hacerse imposible toda fabricación. (1)

Los fermentos, en el caso del queso tipo Oaxaca se añaden con bastante anticipación al cuajo para dar lugar a su multiplicación y consecuente producción de ácido; es decir, se logra una ambientación de los microorganismos del cultivo a las nuevas condiciones del medio (temperatura, acidez, agentes químicos, etc.).

Con el empleo de un fermento que no tiene muy elevada acidez (60-65°D), las bacterias se encuentran aun en la fase de multiplicación máxima en lugar de estar parcialmente paralizados por un exceso de acidez.

La acidez titulable de la leche en la tina de cuajado debe alcanzar 22°D.

La cantidad de inóculo a sembrar depende de la temperatura de la leche y del tiempo en que se desee acidificar; en general es pequeña (0.5, 1 a 2%).

Según la variedad de queso es el tipo de inoculación que se practica. A manera de ejemplo, citemos la siembra en dos etapas para que los quesos Gruyère y Emmental y las siembras diversas o especiales (cuando se trata de siembras de microorganismos que se hacen en la leche antes de la coagulación o bien más tarde en la cuajada misma o sobre el queso; ejemplo: propionibacterias, hongos, etc.).

Debe insistirse en la evaluación de la leche que se destina a la fabricación de queso, debido a que las anomalías se van recrudeciendo conforme avanza el proceso de elaboración.

Los inhibidores naturales de la leche de vaca no se destruyen por la pasteurización clásica (72°/15 seg) según las temperaturas de destrucción que anotamos en el inciso correspondiente. Tanto las bacterias que contaminan la leche pasteurizada como las bacterias que componen los fermentos, pueden encontrar problemas para su desarrollo; sin embargo, pocas de las cepas mesofílicas utilizadas en quesería son sensibles a la peroxidasa; por el contrario, muchas son sensibles a las aglutininas.

Debe recordarse que no existe siempre una relación entre la actividad de las bacterias cultivadas bajo forma de fermento y la evolución de la acidez en la cuba de quesería. Las condiciones no son las mismas.

Los distintos tipos de antagonismos que operan entre las bacterias (resistencia a pH bajos, producción de sustancias tóxicas, producción de antibióticos, etc.) pueden modificarse de forma inesperada si no se tiene un buen control de la leche de quesería.

Los fagocitos están tan comunmente difundidos en la naturaleza, que las grandes superficies de contacto con el exterior que ofrece la leche en la cuba de cuajar, facilita dicha contaminación por medio del aire, especialmente si hay polvo o humedad en el ambiente. (32) Sabemos que puede elaborarse un medio resistente a los fagos utilizando componentes exentos de calcio o añadiendo al medio (a la leche, por ejemplo) fosfatos o citratos que precipitan o asocian el calcio. Esta práctica no puede llevarse a cabo en las tinas de cuajada debido a que la leche es una fuente extremadamente rica en calcio. Su remoción resulta, económica, técnica y nutricionalmente impráctica.

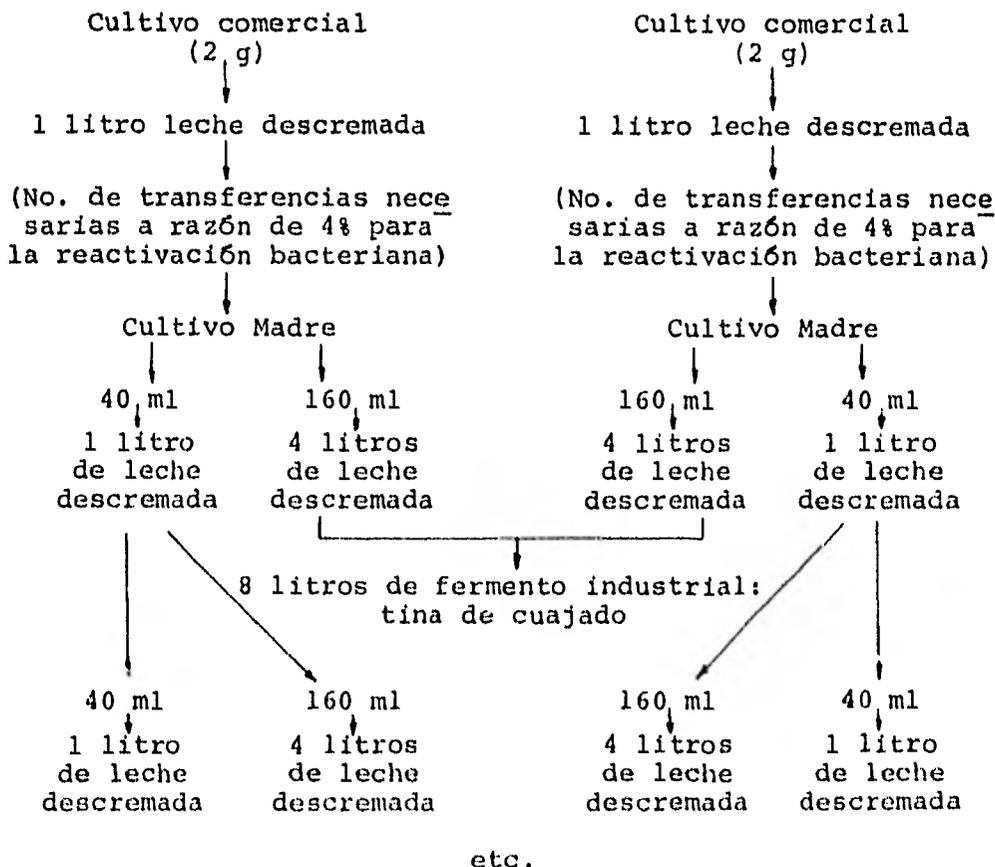
Para finalizar, retomemos rápidamente el ejemplo anterior (3.1.2.4) en el que se trabajan 400 litros de leche al día, los cuales, una vez estandarizados se reducen a 395.5 litros de leche para quesería. La adición de un 2% de cultivos lácticos a la leche de quesería significa que deben separarse diariamente 7.91 litros, de los 337 litros de leche descremada, para la elaboración del fermento industrial, más 2 litros que se utilizan en la preservación del fermento madre. (En consideración a la reducción de volumen que resulte por el calentamiento de la leche en autoclave, se deberá separar mayor o menor cantidad de leche, conforme a la experiencia). Para tener un margen de seguridad, se separan 10 litros y un poco más.

Debe contarse con 320 ml (como mínimo) de fermento madre para la inoculación de estos 8 litros de leche para preparar el fermento industrial (inoculando 40 ml por litro, es decir, 4%).

Es muy recomendable trabajar con dos cultivos diferentes en prevención de cualquier accidente. En el caso de nuestro ejemplo, deben sembrarse entonces 5 litros con un cultivo y 5 litros con el otro.

Dos días antes aproximadamente, se preparan los 2 litros de cultivo a partir de dos sobres comerciales (uno para cada litro), siguiendo las indicaciones anotadas anteriormente. Un litro de leche para un sobre que contiene 2 g de cultivo, proporciona un amplio margen de tiempo para obtener los 2 litros de cultivo. A partir de estos cultivos, si se desea, pueden hacerse transferencias a razón de 4%, hasta que se considere que las bacterias están suficientemente activadas para preparar el fermento industrial. Entonces deberán separarse del cultivo madre 160 y 40 ml para inocular 4 y 1 litros de leche descremada respectivamente de cada cultivo.

Después de la incubación, se tendrán 4 litros de cada cultivo para ser agregados a la leche de quesería (fermento industrial) y un litro de cultivo madre; de este último se separan nuevamente 40 ml para su propagación y 160 ml para preparar los 4 litros del fermento industrial del día siguiente, y así sucesivamente. El siguiente esquema permite aclarar lo anterior:



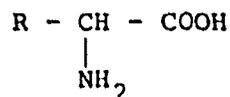
3.1.8 Proteínas y Coagulación de la Leche

Este título encierra uno de los aspectos más amplios y complejos del estudio de la leche y sus derivados. Existen muchísimas publicaciones al respecto y con el grado de complejidad que el tema requiere. Para los fines de este trabajo, es prácticamente imposible presentar otra cosa que no sea una visión general resumida en extremo, a manera de conocimiento básico.

3.1.8.1 Proteínas

De los ácidos grasos monobásicos, es decir, aquellos que solamente tienen un agrupamiento funcional carboxilo (-COOH), descritos en 2.3.1.2.1, se derivan muchos grupos de compuestos: halogenuros de ácidos, anhídridos, amidas, ésteres, ácidos alogenados, hidroxiaácidos o ácidos alcoholes, ácidos aminados o aminoácidos. (37)

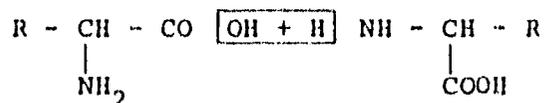
Los aminoácidos o ácidos aminados, como su nombre lo indica, poseen en el mismo compuesto, el radical llamado amina (-NH₂) y el radical ácido o carboxilo (-COOH):



Estos radicales se encuentran en la relación 1:1, en los llamados monoaminoácidos, o bien, en relación 2:1, formando los monoaminodiacidos y diaminomonoácidos.

Existen otras formas de agrupar a los aminoácidos: ureoaminoácidos, guanidino-aminoácidos, aminoácidos alcoholes, aminoácidos sulfurados, aminoácidos cíclicos (serie aromática, heterocíclica, aminoácidos yodados), etc., dependiendo del o de los compuestos que se encuentren en asociación.

Los distintos aminoácidos se unen entre sí (con desprendimiento de agua), a través de sus agrupamientos carboxilo y amina:



El enlace que los caracteriza (CO·NH) se llama peptídico.

La unión de aminoácidos da lugar a los péptidos, y la unión de péptidos forma las proteínas.

Los aminoácidos pueden unirse también a expensas de otros radicales.

Comunmente, 20 aminoácidos diferentes forman parte

de las proteínas. Destacan, entre ellos, los siguientes: glicina, alanina, valina, leucina, arginina, metionina, cistina, triptófano, prolina, isoleucina, serina, treonina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, tirosina, fenilalanina, histidina. (13)

La secuencia y ordenamiento de los aminoácidos, ofrece incontables posibilidades de asociación, constituyéndose como un verdadero alfabeto de materia orgánica.

Las proteínas son entonces sustancias de peso molecular muy elevado y de naturaleza coloidal (ver más adelante), cuyas soluciones son electrolitos anfóteros o anfólitos, por estar constituidos por radicales de aminoácidos que se disocian en medio ácido dándonos un radical electronegativo y un radical electropositivo; en medio alcalino, se obtiene por disociación iónica del protido, un radical electronegativo (el protídico) y iones de hidrógeno).

Este comportamiento de los protidos es de gran importancia biológica, en virtud de que por estas dos maneras de ionizarse, hacen el papel de reguladores del pH de los líquidos orgánicos. (37)

Atendiendo a su configuración, las proteínas pueden presentar una estructura primaria, secundaria terciaria o cuaternaria, cuya complejidad varía debido a las diferentes fuerzas y tipos de enlace que unen a las partes de la proteína; lo que finalmente determina su configuración espacial.

Debido a la importancia que revisten en la vida orgánica, las proteínas han sido objeto de amplios estudios, que se describen detalladamente en libros y revistas de Bioquímica, a los cuales recomendamos acudir directamente; pero particularmente, a los libros de McKenzie: Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology. Tomos I y II. (36)

3.1.8.2 Dispersión coloidal y micelas

Cuando distintas partículas de materia se mezclan, resultan componentes que se distinguen por el número y tamaño de las partículas. En primer lugar están las soluciones (una solución es una mezcla uniforme y estable de partículas sumamente pequeñas -átomos, iones, moléculas- de dos o más sustancias; 26).

En el nivel siguiente de tamaño, se consideran gru-

pos de varios centenares a unos cuantos miles de partículas, con diámetros promedio que van de 10 a 1000 Å (1 unidad angstrom = 1×10^{-9} mm). Aunque es difícil que se puedan ver estas partículas con un microscopio óptico, se pueden fotografiar con la ayuda de un microscopio electrónico. La materia que consta de partículas dispersas que tienen diámetros promedio de 10 a 1000 Å, se dice que se encuentran en estado coloidal. "Coloidal" procede de una palabra griega que significa "cola" o "pegamento". (26)

Aunque en estas descripciones pueden usarse diámetros promedio, una partícula de tamaño coloidal no es necesariamente esférica. Puede tener cualquier forma y clasificarse como coloidal a condición de que una de las dimensiones sea de 10 a 1000 Å. (26)

Quando se dispersan en agua partículas de este tamaño, el producto no es una solución verdadera, sino una dispersión coloidal. No es filtrable y, habitualmente, no es transparente; aunque, cuanto más diluida se encuentre la dispersión, es mayor la probabilidad de parecer transparente. (26)

A las partículas coloidales de fosfocaseinato de calcio (gránulos esféricos observados en el microscopio electrónico), presentes en la leche, se les llama micelas.

Las partículas coloidales son suficientemente grandes para reflejar y dispersar la luz, y las dispersiones coloidales, en el agua, muestran un fenómeno conocido como efecto de Tyndall (un haz luminoso que atraviesa la dispersión coloidal es visible gracias a que la luz se refleja en las partículas).

Si se examina con un microscopio una dispersión coloidal de un sólido en un gas (humo) o un líquido, pueden verse centelleos, que son los reflejos de la luz sobre las partículas que se mueven al azar. Este hecho fue señalado por primera vez en 1827 por un botánico inglés, Robert Brown, que observó con un microscopio los movimientos caóticos y al azar de granos de polen en el agua. Los choques al azar y desiguales de las partículas coloidales, debidos a los movimientos de las moléculas de la fase de dispersión, originan ese fenómeno, conocido en la actualidad como movimiento browniano. La acción de los choques explica en parte la estabilidad de las dispersiones coloidales. Esta evita que las partículas coloidales mayores se depositen. (26)

En las dispersiones coloidales más estables, todas sus partículas llevan el mismo tipo de carga eléctrica. Debido a esto se repelen entre sí y no pueden unirse para for-

mar partículas lo suficientemente grandes para que se puedan depositar. (26)

Algunos sistemas coloidales logran su estabilidad a través de la mediación de una tercera sustancia, un agente estabilizador o coloide protector. Por ejemplo, el aceite puede dispersarse coloidalmente en agua jabonosa, ya que las moléculas de jabón forman una "piel" cargada negativamente alrededor de cada gotita de aceite y evita que se aglutinen. En la leche se presenta también este fenómeno (ver más adelante).

3.1.8.3 Materias nitrogenadas en la leche. Caseína

La importancia de la parte protídica de la leche es muy importante por varias razones: (1)

- a) Las sustancias nitrogenadas se encuentran entre las más abundantes y aunque en la leche de los rumiantes los lípidos se hallan aproximadamente en la misma proporción, en las otras leches constituyen la fracción dominante.
- b) Las propiedades fisicoquímicas más importantes de la leche, especialmente las relacionadas con su estabilidad, derivan de la presencia de prótidos.
- c) Desde el punto de vista nutritivo, los prótidos constituyen la parte más importante de la leche.
- d) Algunas proteínas del lactosuero tienen actividades biológicas: enzimas, inhibidores, anticuerpos. Las proteínas de la leche, como las de la sangre, son características de cada especie por sus propiedades inmunológicas.

Las materias nitrogenadas contenidas en un litro de leche se reparten, en término medio, de la manera siguiente: (89)

Prótidos (aprox.: 33.5 g)	Proteidos	Caseína entera	27.0 g										
		Proteínas del lactosuero	<table border="0"> <tr> <td>Betalactoglobulina</td> <td>3.0</td> </tr> <tr> <td>Alfalactalbúmina</td> <td>1.2</td> </tr> <tr> <td>Suero albuminado</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>Globulinas inmunes</td> <td>0.7</td> </tr> <tr> <td>Proteosas-peptonas</td> <td>0.6</td> </tr> <tr> <td>Proteínas menores</td> <td>0.3</td> </tr> </table>	Betalactoglobulina	3.0	Alfalactalbúmina	1.2	Suero albuminado	0.4	Globulinas inmunes	0.7	Proteosas-peptonas	0.6
Betalactoglobulina	3.0												
Alfalactalbúmina	1.2												
Suero albuminado	0.4												
Globulinas inmunes	0.7												
Proteosas-peptonas	0.6												
Proteínas menores	0.3												
		Acidos aminados oligopéptidos	Nitrógeno no proteico										
		Materias nitrogenadas no proteídicas (urea, nucleótidos, creatina)		1.6 g									

La "caseína entera", es un complejo de proteínas fosforadas y constituye la parte nitrogenada más característica de la leche; no existe ninguna sustancia parecida, ni en la sangre ni en los tejidos. (1)

La caseína abunda considerablemente en la parte proteídica de la leche de los ruminantes. Su contenido medio es de 27 g/lit en la leche de vaca. Puede variar en valor absoluto (mucho menos que la materia grasa), pero se admite generalmente que la proporción de caseína del total nitrogenado varía muy poco; en las leches normales suele ser alrededor del 78%. Se ha establecido un "índice de caseína", cuyo valor desciende por debajo del 77% en las leches anormales, especialmente en las leches mamíferas (1) (ver 2.1.4).

Las "proteínas del lactosuero" o proteínas solubles. Se trata de una mezcla de holoproteínas (que no tienen más que aminoácidos) y de glicoproteínas (que contienen también glúcidos). Las más abundantes tienen las propiedades de albúminas y de las globulinas. Se insolubilizan por el calor, antes de los 100°C. Una parte de estas proteínas no se sintetiza en la glándula mamaria; normalmente se encuentran en muy pequeñas cantidades (0.5 a 0.8 g/lit, en la leche de vaca) (ver: Desuerado).

Las "proteosas-peptonas", son sustancias con un volumen molecular intermedio entre el de las proteínas y el de los péptidos. (1)

Substancias nitrogenadas no proteicas. Constituyen una parte escasa, pero que comprende un gran número de subs-

tancias con peso molecular inferior a 500. Estas sustancias son dializables y permanecen en solución en las condiciones en que se produce la precipitación de las proteínas. Su estructura química es muy variada; junto a los aminoácidos libres, se encuentran urea, creatinina, nucleótidos, etc. (1)

La caseína nativa, es el sedimento blanquecino viscoso que se obtiene por ultracentrifugación, netamente separado de un líquido verdusco y límpido (lactosuero).

La caseína isoeléctrica, es la que se obtiene por la precipitación ácida de la leche a pH 4.6 (punto isoeléctrico de la caseína).

El coágulo de caseína-cuajo, se forma tras la adición de la renina o cuajo a la leche.

Estas caseínas "enteras" obtenidas por diversos procedimientos no son idénticas y se diferencian especialmente por su contenido en elementos minerales. (89)

La caseína no es una sustancia homogénea. La técnica de electroforesis permite la separación de tres fracciones que en orden decreciente de su movilidad electroforética son:

- a) Caseína alfa
- b) Caseína beta
- c) Caseína gamma

La caseína alfa es, en sí misma, heterogénea. Se divide al menos en dos componentes que se distinguen por su solubilidad en las sales de calcio:

- Caseína alfa-s. A una concentración de calcio de 0.3 a 0.4 M, diez veces más la concentración observada en la leche, esta fracción precipita a pH 7 a cualquier temperatura. (89) (No contiene glúcidos y posee 0.2% del aminoácido sulfurado cistina; 1).
- Caseína kappa (x), que permanece en solución a la concentración anterior (insensible al calcio). (89)

Estas dos fracciones son también heterogéneas. La electroforesis y la cromatografía en presencia de urea (agente de disociación de complejos proteicos) muestran que la caseína alfa-s, se forma de:

- . Caseína alfa-s₁ (constituyente mayor).
- . Otros constituyentes menores (sin duda de menor importancia en el plan tecnológico).

La caseína kappa comprende:

- . Una fracción mayor, llamada la caseína kappa
- . Una fracción menor, llamada la caseína gamma (esta caseína proviene de la sangre. Ver más adelante)

De aquí que la caseína entera comprende tres constituyentes: caseína alfa-s₁, caseína kappa y caseína beta.

Los aminoácidos que forman las proteínas de la leche pueden agruparse, entre otras características, atendiendo a su estructura química. Algunos de ellos son monoaminodiácidos (ácido aspártico, ácido glutámico), otros diaminomonocidos (lisina) y el resto, monoaminomonocidos o con otras características de grupo.

Algunos de ellos tienen el carácter de esenciales, descrito para los ácidos grasos en 2.3.1.2.2 y confieren a la proteína láctea su alto valor biológico; ellos son: lisina, leucina, treonina, triptófano, valina, isoleucina, histidina, arginina y metionina. (13, 51)

Individualmente, muchos de ellos tienen un sabor amargo: leucina, triptófano, isoleucina, lisina, ácido aspártico e histidina. (13)

Las caseínas (alfa-s y beta) se han clasificado como fosfoproteínas por contener ácido fosfórico (parte prostética), ligado a un hidroxiaminoácido.

En la leche, las proteínas tienen una estructura definida, que puede modificarse bajo la acción de diversos tratamientos aplicados en el laboratorio o en la industria. La desnaturalización, es una modificación limitada, sin ruptura de enlaces covalentes (estructura primaria), ni separación de fragmentos; consiste en una ruptura de los enlaces que aseguran las estructuras secundarias y terciarias, seguida de un reagrupamiento que conduce a una nueva conformación. Las proteínas del lactosuero se desnaturalizan fácilmente por el calor y se insolubilizan. (1)

Por otro lado, si se hace actuar a los agentes desnaturalizantes de una manera más intensa o prolongada, pueden provocar la hidrólisis de las proteínas (ruptura de los enlaces peptídicos o disulfurados, con la liberación de fragmentos moleculares más o menos grandes). El calentamiento a al

ta temperatura, así como los ácidos y bases suficientemente concentrados, ejercen una acción hidrolítica.

Las proteasas (enzimas orgánicas que desdoblan las proteínas), especialmente las del sistema digestivo: pepsina, tripsina y quimotripsina, tienen, cada una, preferencias por la ruptura de determinados enlaces peptídicos. El cuajo es una proteasa de gran especificidad (ver más adelante).

3.1.8.3.1 Composición y estructura de las caseínas

Todas las caseínas son grandes moléculas que contienen fósforo y un gran número de ácidos aminados, entre los cuales dominan el ácido glutámico y en menor grado, la leucina y prolina. El fósforo está incorporado en las moléculas bajo la forma de éster monofosfórico de los hidroxiaácidos serina y treonina. (89) Las caseínas presentan un polimorfismo genético que se traduce en la posibilidad, para cada una de ellas, de existir bajo diversas formas que derivan de una forma original por mutación.

La caseína alfa-s₁, constituyente mayor, sensible al calcio, presenta las variantes genéticas A, B, C y D. Esta caseína es relativamente rica en fósforo (aproximadamente 1%: 8 átomos de fósforo por molécula), no contiene glúcidos y su estructura primaria se compone de una cadena peptídica integrada por 199 residuos de ácidos aminados cuyo ordenamiento varía ligeramente según las variantes genéticas.

Si tomamos como referencia la variante B de la caseína alfa-s₁ bovina, con peso molecular aproximado de 23,600, podemos establecer las diferencias que presentan las otras variedades en cuanto a la secuencia de aminoácidos. La variante A posee una supresión de los aminoácidos 14 al 26 de la cadena; la variante C difiere únicamente en el aminoácido 192 (glicina en lugar de ácido glutámico); y la variante D cambia el aminoácido número 53 (alanina) por la treonina fosfato (consultar 89).

La caseína beta es soluble en presencia de calcio (0.03 M) a baja temperatura (4°C). Contiene menos fósforo que la caseína alfa-s₁ (0.5%, es decir, 5 átomos de fósforo por molécula) pero mucha más prolina. Está constituida por una sola cadena peptídica formada por 209 residuos de ácidos aminados de peso molecular aproximado de 24,000 (Ribadeau-Dumas y col., 1972, citados por 89). Se conocen siete va-

riantes genéticas. Las diferencias entre la caseína beta A bovina y las demás, son muy pequeñas.

La caseína kappa es, como las precedentes, una fosfo proteína de carácter ácido, pero difiere mucho en su composición y propiedades. Las características más sobresalientes de esta proteína son: (1)

- . Una gran solubilidad, aún en presencia de calcio a concentración relativamente elevada.
- . Poder estabilizante, frente al calcio, para las otras caseínas, a las que incluye en un complejo soluble.
- . Substrato específico del cuajo.

La caseína kappa es una glicoproteína que contiene en proporciones sensiblemente equimoleculares tres tipos de glúcidos:

- . Un azúcar reductor neutro, la galactosa.
- . Un azúcar aminado, la galactosamina.
- . Un glúcido ácido complejo, el ácido siálico (sacáridos que contienen ácido neuramínico o lactamínico, bajo formas acetiladas sobre el nitrógeno o sobre el oxígeno).

Estos glúcidos se encuentran en las proporciones medias de 1.3, 1.4 y 2.3 respectivamente. Por este motivo, el contenido en nitrógeno de la caseína kappa (14.3%) es netamente inferior al de las otras caseínas (alrededor de 15.6%). (1)

La determinación de los aminoácidos pone de manifiesto la presencia de cistina y una proporción elevada de hidroxiaminoácidos (12.3%). Por lo tanto, en la caseína kappa existe una acumulación de grupos -OH hidrófilos, lo que explica su gran solubilidad. (1)

La caseína kappa contiene bastante menos fósforo que las caseínas sensibles al calcio; sin embargo, su punto isoeléctrico es del mismo orden, en razón de la presencia de varios residuos de ácido siálico en la molécula (...). La estructura de la caseína kappa se conoce con mayor exactitud que la de las otras caseínas, gracias al estudio de la acción de diferentes enzimas, como el cuajo y al uso de reactivos específicos como el hidrobórato de litio.

En lo que se refiere al O a los grupos prostéticos glucídicos, el ácido siálico se encuentra en posición terminal, delante de la galactosamina y la galactosa. (1)

La proporción de caseína kappa en la caseína entera, procedente de mezclas de leche de vaca, se acerca al 15%. Según el contenido de ácido siálico, parece que la proporción de caseína kappa puede variar bastante ampliamente en las caseínas individuales. (1)

La caseína kappa consta de una sola cadena peptídica, de peso molecular igual a 19,000 y constituida por 169 residuos de aminoácidos. (89)

La unión de las secuencias glucídicas por intermedio de la galactosamina, se opera a nivel de los hidroxilos de la treonina que forma parte de la constitución de la cadena. (89)

Se conocen dos variantes de la caseína kappa; cada una puede presentarse bajo siete formas dependiendo de su contenido en glúcidos, (89) pero presentan las mismas propiedades frente al cuajo.

La caseína gamma, contiene 1% de fósforo (13) y a diferencia de las caseínas alfa y beta, no coagula por el cuajo.

Aunque pequeñas, las modificaciones que presentan la estructura química de las diferentes variantes de caseínas designadas por las letras A, B, C., etc., pueden significar importantes cambios en las propiedades. (89)

El reemplazo de un aminoácido puede provocar un cambio de las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas. De este modo se ha mostrado que las leches que contienen únicamente la variante alfa-s₁ A, tienen una débil velocidad de acidificación y producen un coágulo suave en relación con el que se observa con las leches que sólo contienen caseína alfa-s₁ B o la caseína alfa-s₁ BC. La noción de variante genética puede, pues, presentar secuelas prácticas interesantes.

La caseína de la leche de vaca está compuesta de aproximadamente 30 a 33.7% de caseína beta, 60 a 58.9% de caseína alfa y de 5 a 7.4% de caseína gamma. (8, 13) Sin embargo, repetimos, la riqueza en estas tres fracciones varía con la raza, la alimentación, el período de lactación, etc.

La leche que se emplea en la elaboración de queso de

be contener al menos un 90% de caseínas alfa y beta, pues cuando más alta sea su riqueza en estos dos tipos de caseína, más queso se obtiene a partir de igual cantidad de leche.

Caseína soluble

El sedimento blanquecino obtenido por ultracentrifugación de la leche no agrupa a toda la caseína, es decir, las proteínas precipitables por acidificación a pH 4.6. Permanece en el líquido de dispersión (lactosuero), 2 a 10% de caseína llamada caseína soluble que no se encuentra en estado de micelas de fosfocaseinato de calcio, sino bajo la forma de monómeros o pequeños polímeros. Esta caseína soluble parece contener una proporción más grande de caseína kappa y de caseína beta que la caseína total. El equilibrio entre la forma micelar y la forma soluble es muy variable, especialmente en función de la temperatura y del contenido de la leche en calcio ionizado. De este modo, una disminución de temperatura aumenta la proporción de caseína soluble. Leche a 20°C que contiene 5 a 7% de caseína soluble, podrá contener, a 4°C, más de 10%. Por otra parte, si se modifica en más o en menos, el contenido de la leche en calcio ionizado, se disminuye o se aumenta el contenido de caseína soluble. De este modo, diluyendo la leche o insolubilizando el calcio con ayuda de una sal apropiada, el oxalato por ejemplo, se provoca una cierta disociación de las micelas con la disminución del tamaño. Paralelamente puede constatarse aumento en el contenido de caseína soluble. Contrariamente, si se concentra la leche y se agrega una solución de calcio soluble, por ejemplo, cloruro de calcio, se observa un crecimiento de las micelas lo que se traduce principalmente, en una mineralización. Al mismo tiempo, la cantidad de caseína soluble disminuye hasta llegar a ser nula si la cantidad de calcio ionizado se aproxima a 0.1 M. (89)

3.1.8.3.2 Síntesis de proteínas. Resumen

La seroalbúmina, las inmunoglobulinas y la caseína gamma no se sintetizan en la glándula mamaria, se absorben a partir de la sangre. (51, 35) La betalactoglobulina, la alfa lactalbúmina y las demás proteínas se sintetizan en la mama.

Los péptidos del plasma suministran menos del 10% de

los aminoácidos de la proteína de la leche.

Las proteínas del plasma pueden suministrar una pequeña proporción de los aminoácidos esenciales para la síntesis de los componentes proteicos formados en la ubre; de las proteínas del plasma procede menos del 10% de las proteínas sintetizadas en la mama.

La mayor parte de las proteínas que se sintetizan en las células epiteliales, se forman a partir de aminoácidos absorbidos del torrente sanguíneo. Los aminoácidos esenciales de la leche, leucina, lisina, treonina, valina, isoleucina, histidina y arginina, se absorben en cantidades suficientes para dar cuenta de todas las moléculas de los mismos presentes en las proteínas sintetizadas en la mama. (51)

Algunos de los aminoácidos dispensables se absorben como aminoácidos libres dentro del torrente sanguíneo; el resto se sintetizan o se forman a partir de otros en la glándula. Por lo menos el 50% de los aminoácidos no esenciales de la caseína y la betalactoglobulina proceden directamente de la sangre, sin sufrir intercambio de átomos con otros metabolitos. La glándula mamaria absorbe ornitina de la sangre y la transforma en prolina. A partir de la glucosa sanguínea se sintetizan menos del 20% de los restos de glutamina, ácido glutámico y asparagina. Otros aminoácidos no esenciales pueden sintetizarse también a partir de los ácidos grasos volátiles y ácido acético.

La síntesis proteica es controlada por el DNA de los genes. El mecanismo es comparable al observado en la mayor parte de las células e incluye la replicación del DNA, la transcripción del RNA a partir del DNA y la traducción, que es la formación de la proteína de acuerdo con la información contenida en el RNA.

Este último proceso ocurre en los ribosomas y requiere el acoplamiento de un aminoácido a una molécula de RNA de transferencia, una enzima activadora del aminoácido y la energía procedente del ATP para que el aminoácido eleve su nivel energético y participe en la reacción.

Ciertos antibióticos como la actinomicina y la puromicina inhiben la síntesis proteica. La actinomicina inhibe la síntesis del RNA dependiente del DNA y la puromicina inhibe la incorporación de los aminoácidos a nivel de los ribosomas. (51)

Dos mecanismos de control de la síntesis proteica

son la inhibición retroalimentaria y la inhibición por represión. En ambos casos es el conjunto de los productos finales el causante de la inhibición de la actividad enzimática y el freno de la síntesis proteica.

3.1.8.4 Estructura de las micelas en la leche

El conocimiento de la estructura íntima de las micelas de caseína nativa constituye probablemente el fundamento de toda la tecnología lechera que busca, según los casos, es tabilizar o desestabilizar la fase micelar de la leche. (89)

El color blanco de la leche es el signo inmediatamente visible de la presencia de partículas de caseína nativa dispersa en el líquido. Estas partículas groseramente esféricas tienen un tamaño variable, entre 30 y 300 milimicras. La media más frecuente se sitúa entre 80 y 100 milimicras. Por separación a ultracentrifugación, se obtiene un sedimento que contiene, por término medio 70% de agua y 30% de materias secas entre las cuales el 94% es caseína y el 6% son materias salinas. De hecho, estas cifras no reflejan la composición de todas las micelas. Las más voluminosas tienen un contenido en sales más elevado. Por otro lado, se observa en la leche un desequilibrio entre el contenido en sales disueltas y el contenido en sales de las micelas. Cualquier modificación de las primeras implica una modificación de las segundas y por consecuencia, un cambio en el tamaño de las micelas de caseína nativa. (89)

Estas micelas, aún cuando son de pequeño tamaño, representan un gran número de moléculas de caseína asociadas íntimamente en el seno de una estructura cuya naturaleza es aun difícil de precisar. Bajo este punto de vista, muchas hipótesis se debaten actualmente. (89)

Una de ellas, emitida por Waugh y Noble (1965) se funda sobre el contenido mayor en caseína kappa detectado en las pequeñas micelas. Según estos autores, la micela está constituida de una capa periférica de caseínas alfa-s₁ y kappa y de un núcleo central de caseínas alfa-s₁ y beta. Esta estructura, considerada como bastante rígida, se justifica por el hecho de que el cuajo ataca únicamente a la caseína kappa que debe encontrarse en la superficie para ser modificada por la enzima. Por otra parte, la betalactoglobulina, proteína soluble de la leche, reacciona con la caseína kappa en el momento del calentamiento y se fija sobre las micelas. Nuevamente es difícil imaginar que una molécula de gran tama

ño como la betalactoglobulina pueda penetrar al interior de una micela rígida y compacta. La unión con la caseína kappa hace suponer que ésta ocupa una posición periférica. (89)

Otra hipótesis referente a la estructura de la micela se formuló desde 1969 por Ribadeau-Dumas y Garnier. Estos autores demostraron que todas las moléculas de caseína alfa-s₁, beta y kappa presentes en las micelas, son accesibles a la carboxipeptidasa A cuyo peso molecular (34,000) es vecino al del cuajo (30,700). En estas condiciones, ya no se puede atribuir a la micela una estructura compacta y rígida, sino una estructura alveolar y esponjosa que explica la penetración de moléculas de gran tamaño al interior de la micela. Por otra parte, la hidratación muy elevada de la micela (75% de agua en volumen) es un factor que viene a corroborar esta hipótesis. A fin de cuentas, según estos autores, las caseínas alfa-s₁, beta y kappa se reparten más o menos uniformemente en el seno de la micela. Sin embargo, la caseína kappa conserva una posición clave. En efecto, esta caseína se encuentra bajo la forma de un trímero, en donde cada uno de los tres vértices están unidos a una cadena de copolímeros alfa-s₁-beta. En suma, la caseína kappa representa los nudos de un conjunto tridimensional cuya forma general tiende a ser esférica a medida que la micela aumenta de tamaño. (89)

Finalmente, una última hipótesis propuesta en 1969 por Rose, atribuye también a la caseína kappa una posición preferencial en la periferia de la molécula sin que por ello esta posición sea la única. Ciertas moléculas de caseína kappa situadas en el interior de la micela, serían el origen de las dificultades de acceso para el cuajo, traducándose por una liberación incompleta del ácido siálico. (89)

Pero las caseínas no son las únicas constituyentes de las micelas y se sabe que las sales minerales, especialmente las sales de calcio juegan un papel mayor en la identificación de la estructura interna de las partículas nativas. De este modo los iones Ca⁺⁺ pueden constituir uniones cruzadas entre las moléculas de caseína y favorecer de esta manera su aglomeración. Pueden también fijarse sobre una u otra de las cadenas proteicas e inducir un cambio de conformación en las cadenas proteicas de donde resultan aptitudes particulares en la formación de polímeros. (89)

El estado y la función de otras sales minerales son menos conocidas aunque ciertamente muy importantes. De este modo, las micelas contienen fosfato de calcio inorgánico.

Es el que hace que usualmente se diga que la caseína se encuentra, en la leche, bajo la forma de fosfocaseinato de calcio. (89)

(La naturaleza de la unión que asocia el fosfato con las caseínas no es aún perfectamente conocida).

(...) Inicialmente se pensaba en una adsorción mecánica del fosfato sobre las micelas. Actualmente se piensa en una unión química. El fosfato inorgánico estaría como HPO_4^{--} ligado al calcio y éste a su vez a los grupos carboxilos de la caseína. (89) (Contribuyendo así a mantener la estructura de las micelas).

Las partículas de caseína nativa contienen principalmente fosfato de calcio. Se encuentra igualmente citrato de calcio que confiere a la fracción mineral de la caseína el carácter de fosfocitrato coloidal ligado a las caseínas (Pyne, citado por 89).

El magnesio también forma parte de la micela de caseína nativa.

3.1.8.5 Coagulación

Las micelas de caseína que persisten en la leche tras una larga conservación y los tratamientos térmicos habituales (pasteurización, esterilización) pueden destruirse fácilmente por tratarse de una estructura frágil. Las principales causas de inestabilidad son: (1)

- a) Calentamiento bajo presión a temperatura elevada.
- b) La presencia de iones minerales a una concentración crítica que puede ser relativamente baja.
- c) El descenso de la temperatura disminuye la estabilidad de las micelas; el enlace de la caseína beta es el más frágil.
- d) Descenso del pH. Acción de los ácidos
- e) Acción de enzimas proteolíticas.

El fenómeno de la coagulación corresponde a la gelificación de la suspensión coloidal. Las micelas separadas y libres en la suspensión se asocian, se agregan entre ellas y tienden a formar una trama continua. Si el medio es mantenido en reposo, se forma un gel, es decir, un estado que presen

ta las características mecánicas de un sólido, un estado en el seno del cual las micelas asociadas aprisionan el líquido de dispersión, el lactosuero. (34)

En quesería se utilizan dos procedimientos para provocar la formación del gel: la acidificación y la acción de una enzima coagulante, generalmente, el cuajo. (34) Cada uno de estos modos de floculación no se utiliza nunca solo. Todas las cuajadas en quesería resultan, de hecho, de la acción simultánea del cuajo y del ácido láctico proveniente de la transformación de la lactosa por las bacterias lácticas. (89)

(Actualmente, la fabricación de algunos quesos recurre a técnicas muy modernas para separar las proteínas de la leche; ejemplo de ello son la centrifugación de la leche y la ultrafiltración).

3.1.8.5.1 Consideraciones previas. Propiedades de las caseínas

Destacan tres propiedades, escogidas en función de su importancia tecnológica particular:

A. Propiedades eléctricas

El balance de los agrupamientos ionizables de las diversas caseínas conduce a constatar un exceso notable de agrupamientos ácidos sobre agrupamientos básicos. Este exceso se explica por la importancia de los ácidos diácidos (ácidos glutámico y aspártico) (abundancia de grupos carboxílicos libres en los grupos aminados; 1); por la presencia de fosfoserina y, en el caso de la caseína kappa, por la presencia del ácido siálico (radical fuertemente ácido); la presencia del radical fosfórico contribuye también al carácter ácido de la caseína.

La acidez de las caseínas interviene especialmente en la medida de la acidez titulable de la leche fresca (89) (ver 2.8).

Las caseínas son pues, electronegativas, lo que significa que sus moléculas migran hacia el ánodo en las condiciones habituales de la electroforesis en solución tampón a pH 8.6. (89)

Por otro lado, como todos los anfólitos (electrolí-

tos que poseen en su molécula grupos ácidos cargados positivamente), las caseínas se disocian, según el valor más o menos elevado del pH del medio, como un ácido o como una base. En el primer caso, pueden formar caseinatos y en el segundo, sales de caseína. A un cierto pH, función del balance de los grupos ionizables de cada molécula, el número de cargas positivas es rigurosamente igual al número de cargas negativas. De ello se sigue una anulación de la carga eléctrica total de la proteína cuyas moléculas no se desplazan más mientras están sometidas a la acción de un campo eléctrico. Este valor particular de pH constituye el punto isoelectrico (pHi) de la proteína. (89)

Las diversas caseínas tienen, claro está, pHi diferentes: 4.4 para la caseína alfa-s₁, 4.9 para la caseína beta, 3.7 para la caseína kappa, que es la más cargada en glúcidos. Se admite que el pHi de la caseína entera en la leche es igual a 4.6. Esta noción es, por otra parte, el origen de la definición de la caseína entera: grupo de proteínas fosforadas precipitables en la leche a pH 4.6 y a temperatura de 20°C.

B. Solubilidad y propiedades asociativas

En el agua pura, al pH de la leche, las caseínas tienden a formar polímeros, es decir, asociaciones de moléculas idénticas. Sin embargo, permanecen completamente solubles. Por otro lado, en presencia de calcio ionizado su comportamiento es diferente. (89)

Si el contenido de iones de calcio es comparable al que se observa en la leche (0.03 M), únicamente la caseína kappa es soluble a temperatura ambiente (25°C) o más. La caseína beta solamente es soluble a baja temperatura, inferior a 5°C, y la caseína alfa-s₁ es insoluble a cualquier temperatura. De cualquier modo, estos caracteres interesan únicamente a las soluciones de caseína aislada. Cuando las caseínas se encuentran mezcladas, como es el caso de la leche, su comportamiento es diferente. En presencia de caseína kappa, las caseínas alfa-s₁ y beta se vuelven solubles a cualquier temperatura. La caseína kappa tiene pues, propiedades estabilizantes frente a las otras caseínas. Estas propiedades se explican por la formación espontánea de complejos entre las tres caseínas, en presencia de iones de calcio. Estas asociaciones estables entre las moléculas de diversas caseínas constituyen lo esencial de las micelas de caseína nativa dispersas en la fase hídrica de la leche. Son las caseínas alfa-s₁ y kappa quienes presentan la mayor afinidad, sus moléculas se asocian rápida y fuertemente. Sin embargo, las

caseínas beta y kappa y las caseínas alfa-s₁ y beta también pueden asociarse. (89)

C. Estabilidad de la solución micelar

Las micelas de una solución coloidal estable son agi-tadas por un movimiento permanente y espontáneo, en función, especialmente, de la temperatura y de las dimensiones de las micelas. Es el movimiento browniano (3.1.8.2) provocado por los choques de las moléculas del sistema acuoso dispersante, sobre las micelas. Al azar de ese movimiento, dos micelas que se encuentran deberían soldarse una con otra por el juego de fuerzas de cohesión que tienden a disminuir su superficie. En una leche fresca esto carece de importancia. La solución es estable porque existen, además de las fuerzas de cohesión, otras fuerzas de sentido opuesto, susceptibles de anular a las primeras y mantener de este modo la estabilidad de la solución. Estas fuerzas resultan esencialmente de dos factores (Benezech, citado por 89):

- a) La existencia de cargas eléctricas sobre las micelas
- b) La afinidad de las micelas por el líquido dispersante en presencia de agua

a) Cargas eléctricas. La electroforesis, es decir, el desplazamiento de las micelas en un campo eléctrico, muestra la existencia de tales cargas. Al pH de la leche fresca, en razón de la presencia en la caseína total, de grupos carboxílicos libres (-COOH), sobre los grupos aminados (-NH₂), los agrupamientos de ácido fosfórico y ácido siálico (caseína kappa), las micelas de fosfocaseinato son cargadas negativamente y migran hacia el ánodo. La existencia de estas cargas eléctricas explica, en gran medida, la estabilidad de la solución. En efecto, las micelas son sometidas a repulsiones electrostáticas cuya intensidad crece a medida que las partículas se acercan. La neutralización de esas cargas por cargas positivas (iones H⁺ de ácidos o cationes de sales) es suficiente para anular las fuerzas de repulsión y provocar la aglomeración de las micelas sometidas entonces solamente al movimiento browniano. Es el fenómeno de floculación. (89)

b) Hidratación de las micelas. Las fuerzas de cohesión (...) resultan de la existencia de la tensión interfacial. Cualquier reducción de esta última provoca una disminución de las fuerzas de cohesión, y de ahí, un aumento de la estabilidad de la solución coloidal. Ciertos coloides,

especialmente las proteínas, presentan la propiedad de disminuir, ellas mismas, la tensión interfacial en razón de su afinidad por el agua, elemento dominante de la fase dispersante. Las micelas de fosfocaseinato de calcio por su facultad de hidratación notable, entran en esta categoría de coloides; el mecanismo de la estabilidad es el siguiente: (89)

Sabemos que el agua tiene una estructura dipolar, lo que significa que las moléculas constituyen un conjunto de dos cargas eléctricas, iguales y de signo contrario, separadas por una cierta distancia. Esta estructura explica la aptitud de las moléculas de agua para formar alrededor de las micelas hidrofílicas, ricas en agrupamientos polares (-COOH, -OH, -NH₂, etc.) una corona en el seno de la cual los dipolos de agua son perfectamente orientados; su extremidad positiva es atraída por las cargas negativas de la micela. Esta capa de hidratación, formada por moléculas orientadas, corresponde a la del agua ligada (ver 2.2.4). Muchas otras capas compuestas por moléculas de agua, cada vez menos orientadas, rodean a la primera. Constituyen lo que se llama algunas veces la hidratación periférica. (Las micelas fijan cerca de 3.7 g de agua por gramo de proteína; 34). Parece que hay una transición progresiva entre el agua ligada, de la cual sabemos que presenta particulares propiedades probablemente como resultado de la orientación de las moléculas (resistencia a la deshidratación, dificultad de congelación, ausencia de poder disolvente frente a los cristaloides, etc.) y el agua libre presente en el líquido dispersante, es decir, el lactosuero. En estas condiciones, la interfase micelas-agua libre es prácticamente inexistente y la energía interfacial nula (...). Si se agrega a la leche un poderoso deshidratante en cantidad suficiente, alcohol o acetona por ejemplo, puede suprimirse la corona de agua ligada que separa el agua libre de las micelas. Aparece entonces una interfase micelas-lactosuero y para que la energía interfacial existente en la superficie del conjunto de micelas sea lo más débil posible, se produce la aglomeración de partículas. Nuevamente hay floculación. (89)

3.1.8.5.2 Aspectos tecnológicos

3.1.8.5.2.1 Coagulación láctica

La coagulación por acidificación láctica se observa cuando la leche se siembra con un cultivo de bacterias lácticas y se incuba a temperatura conveniente (20 a 30°C, por ejemplo).

Al principio de la acidificación, la solubilización del calcio se produce sin destrucción de las micelas. Una caída del pH de 6.7 a 6.0 corresponde a una baja del 50% aproximadamente del calcio ligado a la caseína.

3.1.8.5.2.1.1 Factores de la coagulación láctica

Deben considerarse los de mayor importancia:

a) Temperatura

A baja temperatura (0 a 5°C), el pH puede ser bajado al punto isoeléctrico de la caseína (4.6) (agregando ácido clorhídrico, por ejemplo; 1), sin que haya coagulación (únicamente se observa un aumento de la viscosidad); pero si la leche acidificada de este modo se lleva a 20°C, la coagulación es inmediata (34). Esta propiedad es la base de un nuevo procedimiento de fabricación de cuajadas ácidas, como el "queso cottage". (1)

A temperatura superior a la temperatura ambiente, la acidificación necesaria para la desestabilización de las micelas es menor.

Niveles de acidez necesarios para la coagulación de la leche en función de la temperatura: (34)

Temperatura °C.....	23	38	65
Acidez (% ácido láctico)...	0.50	0.40	0.35

Los efectos de la acidez y el calor se suman. La floculación de la caseína tiene lugar a un pH tanto más elevado cuanto más alta es la temperatura. A las temperaturas de esterilización, es suficiente un descenso del pH de algunas décimas de grado para que la leche flocule (hacia pH 6.4).

Por lo anteriormente expuesto, llegamos a un concepto muy importante que Alais llama "punto isoeléctrico aparente" de la caseína nativa, que en su medio natural varía considerablemente en función de la temperatura.

b) Condiciones de la acidificación

Si se adiciona brutalmente a la leche mantenida a la temperatura ambiente, una cantidad de ácido suficiente para

hacer descender el pH a 4.6, se observa un precipitado de flóculos de caseína pero no la formación de un gel.

Una acidificación progresiva (de tipo biológico) que se lleva a cabo en una leche mantenida en reposo, ocasiona la formación de un gel homogéneo que ocupa enteramente el volumen de la leche. (89, 34, 1)

3.1.8.5.2.1.2 Características del gel láctico

El gel láctico tiene una tensión débil, no es elástico, es friable, permeable y muy poco contráctil. (34, 89)

Sus posibilidades de deshidratación están reducidas en razón de la importante retención de agua resultante de la elevada hidratación de las pequeñas partículas, muy dispersas, de caseína desmineralizada. Por otro lado, la friabilidad se opone al trabajo mecánico intenso. (89)

3.1.8.5.2.2 Coagulación por acción del cuajo

Este modo de coagulación es la base de la fabricación de la mayoría de los quesos.

3.1.8.5.2.2.1 Cuajo

A. Origen

El cuajo, cuyo principio activo es la quimosina o renina, es una enzima proteolítica que se secreta por la mucosa del cuarto estómago o abomaso (vulgarmente llamado cuajar) de los rumiantes jóvenes alimentados exclusivamente con leche (becerros, corderos, cabritos, etc.).

Se admite por lo general, que la secreción se detiene en el momento del destete, cuando se incorporan los alimentos sólidos a la ración; entonces se reemplaza por otras enzimas. Una de ellas, semejante a la pepsina, otra, con propiedades intermedias entre la pepsina y el cuajo. Sin embargo, la iniciación de la secreción del cuajo no depende de la alimentación, ya que el estómago del feto lo contiene mucho antes del nacimiento; además, la secreción no parece estar estimulada por la alimentación láctea.

El cuajo, en tanto que enzima proteolítica, tiene una doble actividad: una actividad coagulante, específica sobre la caseína y una actividad proteolítica general sobre todas las proteínas. (34)

Las propiedades enzimáticas del cuajo hacen que se clasifique entre los endopeptidásicas, de carácter estrechamente específico, es el origen de la coagulación "por acción del cuajo" de la leche. (89) Adicionado a la leche tibia, el cuajo provoca la coagulación en una masa gelatinosa y flexible. (89)

B. Activación

(...) como otras enzimas digestivas, el cuajo es secretado en forma inactiva, el pro-cuajo. El mecanismo de conversión de éste en enzima activa no es aún enteramente conocido. Sin embargo, se sabe que se acompaña de una fragmentación de la molécula de pro-cuajo y la liberación de péptidos básicos (ricos en tirosina; 1), que provienen probablemente de la parte N-terminal de la molécula inicial. (89) Su punto isoeléctrico desciende de pH 5.0 (proenzima) a pH 4.7 (enzima). (1)

La activación del pro-cuajo tiene lugar espontáneamente a pH inferior a 5 y se acelera por debajo de este valor para llegar a ser muy rápida a pH 2 (casi instantánea; los iones H, aceleran la activación). El fenómeno es autocatalítico porque la adición de cuajo a la solución de pro-cuajo, aumenta netamente la velocidad de activación de éste. (89)

C. Obtención y presentaciones

Los procedimientos de obtención del cuajo, sea para su presentación líquida o en polvo, a partir del abomaso de los rumiantes jóvenes, se describen en los libros con algunas variaciones, dependiendo del autor, la región o el país; a manera de ejemplo y por su sencillez, escogimos la siguiente: (13)

"El cuajo se elabora en industrias especializadas que lo suministran en forma de polvo de una actividad normalizada. Los cuajares llegan a estas industrias desecados y allí se trocean finalmente y se maceran durante algunas horas en una disolución salina acidificada con ácido bórico. Durante el proceso de maceración va saliendo la enzima de los cuajares triturados incorporándose a la disolución del macerado. Para purificar la enzima se añade luego repetidas

veces sal común o sulfato aluminico y ácido clorhídrico (hasta pH 5.0). Después se procede a neutralizar a pH 5.5 con fosfato bisódico, y se centrifuga para eliminar las sustancias mucosas precipitadas; la disolución enzimática, así purificada, se normaliza con una solución salina a determinada fuerza o título (1:10,000 o 1:20,000). La enzima puede purificarse precipitándolo por acidificación a pH 5.0 con ácido clorhídrico y saturación con sal. Después se deshidrata al vacío a 30-37°C y se pulveriza en un molino de martillos".

El cuajo también puede obtenerse a partir de terneros vivos (alimentados únicamente con leche), a los que se introduce quirúrgicamente una sonda por donde se administra suero desalbuminado que posteriormente se extrae por aspiración para obtener la enzima.

El cuajo en estado cristalizado puede separarse por cromatografía en tres constituyentes: A, B y C (Foltmann, citado por 89), cuya actividad coagulante es diferente. Son los constituyentes A y B los que forman lo esencial del cuajo total. Se trata de holoproteínas cuya composición en aminoácidos es muy semejante. Su peso molecular es de aproximadamente 30,700 mientras que el del pro-cuajo es de 36,200. La diferencia representa el peso molecular de los péptidos separados en el momento de la activación. (89)

D. Mecanismo de la coagulación de la leche por el cuajo

Se admite, desde los trabajos del sueco Hammarsten, publicados en 1873, que el cuajo actúa sobre el fosfocaseinato de calcio de la leche, provocando un fraccionamiento de la substancia en dos partes, una soluble llamada proteasa de Hammarsten, que representa aproximadamente 5 a 6% del substrato y la otra insoluble en presencia de calcio ionizado, el fosfoparacaseinato de calcio. (89, 1)

Linderstrom-Lang y Holter desarrollaron hacia 1930 una teoría según la cual el complejo caseína de la leche es estable gracias a la presencia de un componente que hace el papel de un coloide protector. El cuajo, en un primer tiempo, degrada específicamente este compuesto y, en una segunda fase, el complejo caseína floclula. (34)

Los trabajos de Nitschmann, Alais, Garnier, confirman desde entonces que la coagulación de la leche comprende dos fases. (34)

- Una fase enzimática en el curso de la cual el cuajo ataca al componente que hace el papel de estabilizante.
- Una fase secundaria que corresponde a la formación del coágulo por disociación de las micelas.

Cuando se agrega cuajo a la leche, se observa, antes de cualquier modificación de la estructura física del líquido, una proteólisis limitada que puede seguirse sometiendo periódicamente la leche con cuajo a la acción precipitante del ácido tricloroacético a concentración conveniente (12%) y midiendo la cantidad de nitrógeno presente en el filtrado. Esta reacción, llamada reacción primaria es rápida al principio, más lenta después y finalmente nula cuando la cantidad de nitrógeno liberado alcanza 1.5 a 2% (5%; 34), del contenido de nitrógeno de la caseína nativa. Debe decirse que la reacción primaria puede desarrollarse aún a baja temperatura, cercana a 0°C (...). Al pH de la leche fresca (6.7), la reacción es rápida. A pH 3.5, está claramente retardada, y a pH 2, cesa la reacción. (89) (Esta reacción no exige la presencia de calcio; 13, 1).

Cuando la reacción primaria termina, es decir, cuando la cantidad de nitrógeno liberado no aumenta más, se observa la coagulación de la leche que se traduce por la formación de un gel homogéneo (Alais et al., citado por 89). Es la reacción secundaria que solamente se desarrolla a una velocidad conveniente a una temperatura superior a 15°C. Por debajo de esta temperatura la coagulación es lenta y cerca de 0°C, exige varias decenas de horas. (...89, 1) La coagulación no se produce nunca sin la previa reacción enzimática primaria. (1) La sucesión de las dos reacciones, primaria y secundaria, ha sido interpretada desde hace mucho de la manera siguiente: el cuajo, al hidrolizar uno o varios constituyentes de la caseína nativa dotados de propiedades protectoras frente a los otros constituyentes, altera estas propiedades y provoca, en presencia de calcio ionizado, la desestabilización de las micelas de caseína. Los trabajos recientes se han avocado a precisar el o los constituyentes involucrados en la reacción primaria, las condiciones en que ésta se lleva a cabo y el mecanismo de desestabilización de las micelas que de ello resulta. (89)

De este modo, se sabe actualmente que sólo la caseína kappa es hidrolizada por el cuajo (Garnier, citado por 89), las otras caseínas no son afectadas. Esta proteólisis limitada (primera reacción), solamente se lleva a cabo en una ligadura fenil-alanin-metionina de la cadena peptídica

de la caseína kappa. Es por ello que es muy rápida y exige poca enzima. La ruptura de la cadena da lugar a dos fracciones muy distintas, producto de la hidrólisis:

Paracaseína kappa (105 aminoácidos)

PiroGlu-Glu-Gln-Asn ... His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-----
(105)

----- Met-Ala--ile-Pro-Pro-Lis-Lis....Treo-Ala-Val-OH
ligadura (106) (110) (169)

hidrolizada

por el cuajo Caseino-macropéptido kappa
(64 aminoácidos)

La primera fracción se compone de 64 aminoácidos, aproximadamente un tercio de los aminoácidos de la molécula total. Es soluble en el ácido tricloroacético a pesar de su peso molecular elevado, principalmente debido a la presencia de numerosos hidroxiaminoácidos y de las secuencias glucídicas (Alais y Jolles, citados por 89) que se encuentran concentrados sobre su cadena. La cadena, que corresponde a la parte C-terminal de la caseína kappa, es llamada caseinomacropéptido. El término de caseinoglicopéptido, mucho tiempo utilizado, tiende actualmente a dejar de usarse en la medida en que ciertas cadenas de caseína kappa están desprovistas de glúcidos y dan pues, nacimiento a macropéptidos sin azúcar. (89) El caseinopéptido se libera de la micela y pasa al suero; tiene un carácter hidrófilo y ácido. (34)

Los 64 aminoácidos que contiene el caseinomacropéptido de la caseína kappa B₁ bovina, son: Asparagina, 4; Treonina, 11; Serina, 6; Glutamina, 10; Prolina, 8; Glicina, 1; Alanina, 6; Valina, 6; Metionina, 1; Isoleucina, 7; Leucina, 1; Lisina, 3.

La segunda fracción proveniente de la ruptura de la caseína kappa por el cuajo, se compone de 105 aminoácidos, es decir, dos tercios de los 169 aminoácidos de la molécula kappa entera (esta fracción permanece unida a la micela y tiene un carácter hidrófobo y básico; 34). Constituye la paracaseína kappa que forma, cuando está sola y en ausencia de calcio, un gel retráctil que se vuelve fibroso rápidamente. La adición de caseínas alfa-s₁ y beta, aun en pequeña cantidad, inhibe el fenómeno. (89)

Todas las moléculas de caseína kappa son hidrolizadas de este modo, contengan o no glúcidos. (34)

En la leche, las caseínas están en presencia de calcio. Las fracciones alfa-s₁ y beta están únicamente en solución micelar estable en razón de la presencia de la caseína kappa, cuyas propiedades estabilizantes fueron señaladas anteriormente. El fraccionamiento de la caseína kappa por el cuajo, que se traduce en la pérdida de la fracción más hidrófila de la cadena, disminuye considerablemente su hidratación, por ende su solubilidad pero también su carga eléctrica. En efecto, el caseinomacropéptido, separado de la caseína kappa, es portador de una carga particularmente elevada. La caseína kappa parcialmente descargada es entonces la sede de un desequilibrio iónico que provoca un cambio de la estructura molecular y modifica de este modo las posibilidades de unión. (89)

Estos fenómenos, ligados todos a la liberación del caseinomacropéptido, hacen perder a la caseína kappa sus propiedades estabilizantes iniciales. La fracción restante de paracaseína kappa ya no está en posibilidades de asegurar la estabilidad de los complejos formados con las caseínas alfa-s₁ y beta (89) en presencia de calcio. Las micelas de caseína modificadas, una vez inestables en medio cálcico, se sueldan entre ellas y forman un gel homogéneo, si el medio es mantenido en reposo (reacción secundaria). En el gel formado de este modo, la caseína se presenta al estado de un complejo de fosfoparacaseinato de calcio, es decir, bajo una forma muy mineralizada y este grado elevado de mineralización, confiere al gel obtenido por cuajo, características y comportamiento muy diferentes de los del gel láctico; (34) precisamente, la rigidez del gel está asegurada especialmente por el fosfato de calcio coloidal que constituye una verdadera armadura. (1)

La segunda fase, entonces, es la formación de la cuajada como consecuencia de la interacción entre la paracaseína y los iones de calcio. (13)

(...) hay que insistir sobre el hecho de que la formación del gel está ligada a la presencia de fosfato de calcio en las micelas de caseína nativa. Un caseinato de calcio preparado en el laboratorio a partir de la caseína entera, floclula en presencia de cuajo pero no da lugar a la formación de un gel. Este último aparece únicamente en presencia de fosfato de calcio para los contenidos de caseinato de terminados en la leche. Por otro lado, el tiempo de coagulación disminuye a medida que aumenta el fosfato de calcio coloidal, para una misma concentración de calcio ionizado. El fosfato interviene probablemente en la creación de ligaduras a nivel de las micelas. Confiere un verdadero armazón al

coágulo, cuya consistencia es tanto más cerrada cuanto más elevado es el contenido de fosfato de calcio coloidal de la leche. (89)

Los grupos funcionales -OH producidos por la acción del cuajo, fijan los iones cálcicos, estableciendo "puentes de calcio" entre las moléculas de paracaseína; de ahí la necesidad de calcio iónico para formar agregados de paracaseína. (13)

De este modo (...) el complejo fosfoparacaseinato de calcio (insoluble) difiere químicamente del fosfocaseinato de calcio ("soluble") en que lleva una carga mineral más fuerte que el complejo original (calcio y fósforo solubles se fijan en el curso de la coagulación). (1) Naturalmente, la composición en aminoácidos de la cadena también se ha modificado.

(...) El examen al microscopio electrónico muestra que en la primera fase de la coagulación no hay deformación o disolución de las micelas esféricas de caseína nativa. Las micelas se reúnen mediante fibrillas de una manera irregular; en seguida se forman cadenas y masas con vacuolas que contienen suero, para constituir finalmente una red o retícula de tres dimensiones. (1)

Dadas las características proteolíticas del cuajo, existe finalmente, una reacción terciaria que se produce más allá de la coagulación de la leche. El substrato lo forman diversas proteínas y se rompen varios enlaces peptídicos; la velocidad de reacción es lenta, pero de suma importancia en la fabricación de quesos que se someten a procesos de maduración.

Durante el afinado del queso, la enzima permanece activa debido a que ningún tipo de fabricación requiere elevar la temperatura de la cuajada a temperaturas cercanas a 70°C.

E. Actividad del cuajo (fuerza)

Está representada por una relación cuantitativa entre un determinado volumen de cuajo y otro de leche, realizándose la coagulación en unas condiciones fijadas arbitrariamente.

La "fuerza" del cuajo, representa el número de volúmenes de leche fresca procedente de mezcla, coagulados por un volumen de cuajo en 40 minutos (2,400 segundos) a 35°C. Si se toma un volumen (v) de cuajo y un volumen (V) de leche

y se mide el tiempo de coagulación (t) en segundos:

$$F = \frac{2,400 \text{ (V de leche empleado)}}{\text{tiempo que tarda en coagular en segundos}} \times \frac{\text{volumen de cuajo empleado}}{\text{volumen de leche}} ;$$

$$F = \frac{2,400 V}{t v}$$

EJEMPLO: Si se toma un volumen de 500 lt de leche (500,000 ml) y se agregan 0.01% de cuajo líquido comercial, es decir, 50 ml:

$$\begin{aligned} 0.01 \text{ vol} & \dots 100 \text{ lt de leche} \\ x & = 0.05 \text{ lt} \\ x \text{ vol} & \dots 500 \text{ lt de leche} \end{aligned}$$

Y posteriormente se observa el tiempo que la leche tarda en coagular (35 minutos = 2100 seg, por ejemplo), entonces la fuerza del cuajo empleado será de 11,428:

$$F = \frac{2,400 \times 500 \text{ litros}}{2,100 \times 0.05 \text{ litros}} ; \frac{1'200,000}{105} ; F = 11,428$$

Si se observa que la coagulación tarda más tiempo, 46 minutos = 2,760 seg, por ejemplo, la fuerza del cuajo será menor:

$$F = \frac{2,400 \times 500 \text{ litros}}{2,760 \times 0.05 \text{ litros}} ; \frac{1'200,000}{138} ; F = 8,695$$

En el primer caso, un volumen de cuajo coagula 11,428 volúmenes de leche y en el segundo únicamente 8,695.

El cuajo líquido comercial generalmente posee una fuerza de 1:10,000.

La definición anterior de la fuerza del cuajo no es del todo real, porque considera una base indefinible: la leche normal.

Existen otros procedimientos para determinar la acción del cuajo, y desde luego la mejor definición de la actividad estaría representada por el contenido en enzima pura, pero estos procedimientos no se aplican en la práctica.

En gran parte de los países en que se produce cuajo y que por lo tanto, es fácil adquirir cuajo fresco de título garantizado, la prueba de fuerza se hace más bien para verificar la "disposición" de la leche a la coagulación, que para determinar el título activo del cuajo. (28)

En muchas regiones alejadas de los centros de producción, las plantas deben estar preparadas para determinar la fuerza de cada partida de cuajo para evitar inconvenientes técnicos y económicos que pueden ser de cierta gravedad. (28)

Medida del tiempo de coagulación

En general, ya sea para el ensayo de los cuajos, ya sea para el estudio de las aptitudes de las leches para la coagulación, se mide el tiempo que media entre el momento de la adición del cuajo y la aparición de los primeros flóculos, que corresponde a la ruptura de la suspensión coloidal. (1)

En el laboratorio, se opera a baño maría a una temperatura constante, habitualmente a 35°; la aparición de flóculos se observa sobre las paredes del tubo de vidrio inclinado, que se hace girar lentamente o sobre una lámina de vidrio que se introduce y retira de la leche adicionada de cuajo.

En general, se expresa el poder coagulante de un cuajo (x) que se quiere valorar, en relación con un cuajo elegido como patrón (e). Se calcula por la fórmula: (1)

$$F_x = F_e \frac{E_e \cdot T_e}{E_x \cdot T_x}$$

en donde:

F = fuerza de las soluciones del cuajo
E = las cantidades utilizadas en el ensayo

EJEMPLO: Si sustituimos los valores conocidos del cuajo del ejemplo anterior y los valores en tiempo y cantidad utilizados de un cuajo a prueba, tenemos:

F_e = fuerza del cuajo conocido: 11,428
E_e = cantidad utilizada del cuajo conocido: 50 ml
T_e = tiempo empleado por el cuajo conocido: 35 min
E_x = cantidad utilizada del cuajo a prueba: 50 ml
T_x = tiempo empleado por el cuajo a prueba: 40 min

$$F_x = 11,428 \frac{50 \text{ ml} \times 35 \text{ min}}{50 \text{ ml} \times 40 \text{ min}}$$

$$F_x = \frac{399,980}{40} ; F_x = 9,999.5$$

F. Almacenamiento

El cuajo sólido (aunque de menor uso actualmente en la industria), se conserva mejor que el cuajo líquido. El cuajo debe ser almacenado a temperaturas relativamente bajas para poder conservar durante el tiempo suficiente su poder coagulante sin pérdidas apreciables; para esto es conveniente que el ambiente sea seco y la temperatura alrededor de 4°C. Si se almacena a esta temperatura el cuajo debe sacarse unos días antes de usarlo, para obtener un mejor poder coagulante y también para que la temperatura del cuajo, al abrir el recipiente que lo contiene, sea la misma que la temperatura ambiente y evitar condensación de humedad en el producto.

Si la temperatura ambiente es relativamente alta, el cuajo sólido puede perder cerca del 3% de su fuerza por mes, mientras que si el ambiente es fresco, la pérdida será alrededor de 1% por mes. Además, debe preservarse en todo momento de la luz, del aire y de la humedad. (28)

G. Suscedáneos del cuajo

Las enzimas proteolíticas que tienen la propiedad de coagular el complejo de caseína, pueden agruparse atendiendo a su origen:

- a) Enzimas de origen animal: cuajo, pepsina, quimotripsina.
- b) Enzimas de origen vegetal: papaína, bromelina, ficina.
- c) Enzimas de origen microbiano: de ciertos hongos (Endotia parasítica, Mucor pusillus, Mucor miehei), o de bacterias (diversas especies del género Bacillus).

La utilización de enzimas diferentes al cuajo se ha promovido mucho en razón de la escasez y carencia de cuajo animal. (...) es difícil, en la práctica quesera reemplazar al cuajo por una de estas enzimas; 89); sus condiciones de acción y su actividad proteolítica no específica constituyen

a menudo obstáculos para su utilización). Sin embargo, se emplean con cierta frecuencia la pepsina y enzimas de hongos.

a) Enzimas de origen animal

Únicamente las enzimas secretadas por el estómago son interesantes en quesería. Las enzimas digestivas importantes producidas por el páncreas, tripsina y quimotripsina, no convienen; su actividad proteolítica no específica es muy grande y, además, su pH óptimo de acción se sitúa en la zona alcalina. (1)

El estómago de animales monogástricos aún jóvenes, no parece secretar cuajo sino únicamente pepsina. La del cerdo se produce industrialmente.

La pepsina es la enzima más próxima al cuajo, salvo en lo que se refiere a los valores de pH; es una proteasa muy ácida; el óptimo de su actividad proteolítica es cercano a 2.0, se inhibe con valores de pH superiores a 6.6; por lo tanto, coagula mal las leches frescas o no las coagula en absoluto. Para no utilizar dosis excesivas, que podrían conducir a defectos del gusto, el empleo racional de la pepsina exige un descenso del pH hacia 6.3, es decir, una leche ligeramente acidificada. (...1)

Existen preparados comerciales llamados "50-50", que se componen de una mezcla de cuajo y de pepsina. Tanto la proporción de mezcla como el producto final, han sido ampliamente probados.

Dan (1968) señaló en ocasión de una reunión organizada por la FAO de las Naciones Unidas, que diferentes tipos de queso habían sido fabricados utilizando "50-50" por instituciones de investigación en los países siguientes: Bélgica, Dinamarca, Inglaterra, Holanda, Suiza y Estados Unidos de Norteamérica. Todas estas investigaciones, probaron que no había ninguna diferencia importante entre los lotes de queso fabricados con el cuajo y con "50-50". (4)

b) Enzimas de origen vegetal

Los vegetales, antes que los microorganismos, fueron el objeto de investigaciones para aislar las enzimas coagulantes. ...el líquido substancial que se extrae de numerosas especies puede coagular la leche, pero las enzimas que de ahí se extraen tienen una actividad proteolítica muy intensa en relación a su actividad coagulante. La ficina, extraída del higo, la bromelina, extraída del eje central del ananá,

son próximas a la papaína, que por sí misma puede romper las ligaduras peptídicas que la tripsina o la pepsina rompen separadamente.

A pesar del optimismo de ciertas publicaciones, ninguna de estas enzimas ha rebasado el estado de pequeños coágulos, la mayoría de las veces con malos resultados en lo que se refiere al rendimiento y a las cualidades organolépticas de los quesos fabricados de esta manera: defectos de textura y sabor amargo pronunciados. (1)

c) Enzimas de origen microbiano

Las bacterias esporuladas aerobias del género Bacillus, fueron las primeras en ser objeto de investigaciones. Estas bacterias, sobre todo B. subtilis y B. cereus o especies vecinas, son cultivadas industrialmente para la preparación de diversas enzimas: amilasa, proteasa, sacarasa, etc. Puede extraerse del medio de cultivo una enzima que coagula la leche (...). Su aptitud en quesería es mayor que las de origen vegetal, pero sensiblemente menos buena que las enzimas producidas por los hongos. (89)

En la actualidad se funda mayor esperanza en las enzimas fúngicas. Tres especies de hongos se utilizan en la producción de enzimas coagulantes:

- Endotia parasitica (hongo parásito del castaño)
- Mucor pussillus (hongo banal mesófilo del suelo)
- Mucor meihei (hongo banal termófilo del suelo)

3.1.8.5.2.2.2 Factores que influyen en la coagulación de la leche por el cuajo

Los factores susceptibles de influir en cualquiera de las dos etapas de la coagulación o sobre las dos a la vez, son numerosos y complejos.

Probablemente la coagulación sea el fenómeno donde mejor se manifiesten las acciones mutuas y las dependencias internas que tienen lugar en la leche. Mencionaremos brevemente los siguientes factores, por considerarse los más importantes en la coagulación:

- . Leche
- . Acidez

- . Concentración de calcio en disolución y de fosfato de calcio coloidal
- . Cuajo
- . Temperatura

A. Leche

La aptitud de la leche para coagular bajo la acción del cuajo o fermento lab, constituye en quesería una de sus características fundamentales. (13)

La interacción entre fenómenos físicos, químicos, biológicos (fermentos lácticos), producidos por los distintos elementos que se encuentran en la leche que se va a cuajar (orgánicos e inorgánicos, solubles e insolubles, etc.), determinan en gran medida la aptitud coagulante.

Especialmente importantes, como factores que influyen en la coagulación de la leche por el cuajo, son el contenido en caseína sensible a la enzima y las dimensiones de las micelas.

La concentración de caseína influye poco sobre el tiempo de coagulación, pero por otro lado, es uno de los factores más importantes en la firmeza del gel.

Un enriquecimiento de la leche con fosfato de calcio, aumenta claramente la tensión del coágulo.

El tiempo de coagulación es más largo cuando el diámetro de las micelas es más pequeño. Este efecto podría estar ligado al contenido de fosfato de calcio coloidal, más pobre en las micelas pequeñas (ver más adelante) y el grado de hidratación más elevado en las micelas pequeñas que en las grandes. (34)

La presencia de proteínas solubles en proporción importante, siendo insensibles a la acción coagulante del cuajo, se acompaña siempre de una disminución del contenido de caseína, lo que se traduce por dificultades en la coagulación. (89)

Otro factor interviene para explicar las dificultades de coagulación encontrados con ciertas leches ricas en proteínas solubles. Se trata del pH, que se encuentra a menudo anormalmente elevado. Estas leches provienen habitualmente de glándulas enfermas (ver 2.1.4) y presentan la característica de ser alcalinas. (89)

Los tiempos de coagulación de leches de distintas vacas son menos uniformes que los tiempos de coagulación de leche de mezcla, pero también varían. (13)

Las leches de coagulación defectuosa pertenecen a dos tipos:

- a) Leches producidas por animales cuya mama es la sede de una infección microbiana. Su contenido en caseína es bajo y su contenido en proteínas del lactosuero elevado; su pH es a menudo de 6.8 o mayor, etc. (ver: mastitis).
- b) Leches producidas por animales sanos. Se caracterizan principalmente por deficiencias minerales y por un diámetro medio pequeño de las partículas, (1) o una baja proporción de las caseínas susceptibles al cuajo.

El tiempo y la temperatura de almacenamiento de la leche (antes o después de pasteurizada) influyen sobre la coagulación por el cuajo. En Recepción y Almacenamiento de la Leche nos referimos a ello (inciso 1.6.1 A), diciendo simplemente que la refrigeración produce un incremento de la estabilidad coloidal.

Se trata de un fenómeno bien conocido por los queseros, porque se traduce, en particular, por una reacción más lenta en presencia de cuajo. (89)

El enfriamiento de la leche y su mantenimiento de 48 a 72 horas entre 3-5°C es el origen de modificaciones en los equilibrios salinos (disolución del fosfato de calcio coloidal) y en la estructura micelar (aumento de la tasa de caseína soluble y de la hidratación de las micelas). Estas modificaciones producen un alargamiento del tiempo de coagulación; el coágulo obtenido es menos firme, su desuerado más difícil. (34)

Se sabe, desde hace mucho, que una adición de cloruro de calcio puede suprimir en parte el fenómeno, (89) al restablecerse el equilibrio salino.

Las dosis de cloruro de calcio necesarias para restablecer los valores iniciales alterados por efectos de la conservación de la leche a baja temperatura sobre la aptitud para la coagulación son: (1)

	mg de cloruro de Ca/litro leche	
	Para restablecer el tiempo normal de coagulación	Para restablecer la tensión normal de la cuajada
Leche fresca.....	0	0
Leche conservada		
24 h a 3°C.....	75	80
Leche conservada		
48 h a 3°C.....	80	
Leche congelada.....	0	165

Además de la adición de cloruro de calcio, el fenómeno no puede corregirse, manteniendo la leche a 30°C por algunas horas o ligera acidificación de la leche. (34)

Finalmente, el incremento de la estabilidad de la solución coloidal está esencialmente ligado al aumento del grado de dispersión de las micelas, en el curso del enfriamiento. El fenómeno puede explicarse por la salida de la micela de una parte de la caseína beta, soluble a baja temperatura, como de una fracción del fosfato de calcio coloidal (...). El análisis muestra que en una leche mantenida a 4°C durante 24 horas, el contenido de caseína soluble, no micelar, puede pasar de 10 a 20%. Este incremento del grado de dispersión se acompaña de un aumento del espesor de la capa de agua de hidratación de las micelas, fenómeno que refuerza aún más la estabilidad de la solución coloidal enfriada, impidiendo la unión entre las micelas, que caracteriza la coagulación. (89)

Efecto del calentamiento. Desde el punto de vista de la coagulabilidad por el cuajo, los efectos del calentamiento utilizado para la pasteurización en quesería son similares a los efectos de la conservación por el frío; el tiempo de coagulación aumenta y la tensión de la cuajada disminuye.

En el curso del calentamiento, el calcio y el fósforo pasan del estado soluble al coloidal (6 mg de Ca y 4 mg de P por 100 cc de leche desnatada, a 35°C durante 30 minutos). Cuando la leche pasteurizada se conserva a una temperatura media, el calcio y los fosfatos tienden a volver al estado inicial y, sin embargo, el tiempo de coagulación aumenta todavía (fenómeno conocido como "histéresis"). Se ha demostrado que el efecto de histéresis no se produce en los sistemas desprovistos de betalactoglobulina, lo mismo que el efecto primario

(alargamiento del tiempo de coagulación consecutivo al calentamiento); por lo tanto, esta proteína está implicada en estos fenómenos y sabemos que puede formar un complejo con la caseína (trabajos de A. Kannan y R. Jenness, citados por 1).

Otro tipo de tratamientos que se aplican a la leche, anteriores a la adición de cuajo, pueden constituirse como factores que afectan la coagulación.

La homogeneización de la leche ha sido preconizada para ciertas fabricaciones, quesos frescos, quesos italianos (...). La textura del queso es más firme, las pérdidas de materia grasa en el suero se reducen (ver 3.1.2.4). Hay efectos favorables a nivel de la coagulación. La firmeza del coágulo es menor y la cuajada es más húmeda. (34)

La concentración de la leche por evaporación es el origen de un aumento de la carga mineral de la micela y de un incremento de sus dimensiones. El pH disminuye, la concentración en caseína nativa aumenta.

Estos cambios llevan consigo: una reducción del tiempo de coagulación y un aumento de la firmeza del gel que está más mineralizado, más coherente y más apto para experimentar un desuerado rápido. (34)

B. Acidez

El cuajo se inactiva en medio alcalino y no puede, por lo tanto, provocar la coagulación. (89)

El tiempo de coagulación es más corto y el gel formado es más firme a medida que el pH desciende por debajo del pH de la leche; (34) aunque un descenso más acentuado del pH puede provocar por sí solo la coagulación (pH 4.6-4.7).

El pH óptimo señalado por distintos autores para la acción del cuajo sobre la leche varía mucho, para algunos es 5.2, otros, 5.5, (89, 34) mientras que para otros es entre 6.0 y 6.4. (13)

Por debajo de pH 7 se observa una aceleración de la gelificación por dos razones. Primero, la aproximación al pH óptimo de acción de la enzima que se sitúa a pH 5.5. Por otro lado, se reducen las cargas eléctricas de las micelas de caseína y se disminuye su estabilidad. Estos fenómenos explican la sensibilidad al pH de la fase de coagulación. De este modo, a pH 6.7, ésta es más larga que la fase enzimática. A pH 6.3, las dos fases se desarrollan sensiblemente

al mismo tiempo. Por debajo de pH 6.3 la coagulación es acelerada e interviene antes de que termine la fase enzimática. (89)

Sin embargo, a pH bajo, el resultado obtenido finalmente es sensiblemente diferente del que se observa al pH original de la leche. El gel ya no tiene los mismos caracteres. Se trata de hecho, de un coágulo mixto, mitad láctico, mitad por acción del cuajo, cuyo comportamiento es muy diferente del de un coágulo típicamente obtenido por el cuajo. (89)

La acidez, conforme aumenta, transforma el calcio bajo la forma ionizada. Sin embargo, cuando el pH tiende al punto isoeléctrico, la leche no coagula normalmente por el cuajo debido a la degradación del fosfato tricálcico ligado a la caseína en el estado coloidal. Este compuesto es necesario para la formación del gel característico. (1) Es decir que el ácido láctico producido por los fermentos tiene la propiedad de solubilizar (ionizar) parte del calcio coloidal presente en la leche bajo la forma de fosfato tricálcico unido al fosfocaseinato. El calcio soluble (iones de calcio libres) es indispensable para la formación del coágulo, pero también lo es el calcio insoluble en estado coloidal, por ello, la acción solubilizante del ácido láctico no debe prolongarse hasta la completa desmineralización del fosfocaseinato, puesto que, de ocurrir así, el coágulo que se obtenga será friable, poco firme y quebradizo, tal y como sucede con un coágulo obtenido por acidificación de la leche.

Por otro lado, debemos recordar que la pasteurización insolubiliza los iones de Ca libres de la leche fresca.

Para Guerault (23) y Compairé Fernández (8), la mayor velocidad de coagulación que experimenta una leche ácida es debida a que el ácido láctico liberado por los fermentos se fija sobre una parte del fosfocaseinato y el resto de la proteína necesita entonces menor cantidad de cuajo para que el conjunto alcance el punto en el que se produce la coagulación.

Al fijarse el ácido láctico sobre la caseína, la precipitación ocurre por despolimerización de las micelas por eliminación de calcio.

Al pasar de pH 6.7 a pH 5.6, la velocidad de reacción de coagulación se multiplica 30 veces. (34)

Es interesante notar que una leche acidificada duran

te algunas horas a pH 5.0-5.5, y llevada nuevamente al pH original, coagulará más rápidamente que antes de este tratamiento. Inversamente, una leche alcalinizada por debajo de pH 9.0 y llevada nuevamente al pH inicial, coagulará más lentamente. Sin embargo, del lado alcalino, el contenido en calcio coloidal no cambia de una manera sensible; la causa del efecto observado no reside entonces en una modificación no completamente reversible del equilibrio salino, sino probablemente en una modificación de las proteínas que altera las interacciones micelares. (89)

C. Concentración de calcio en disolución y de fosfato de calcio coloidal

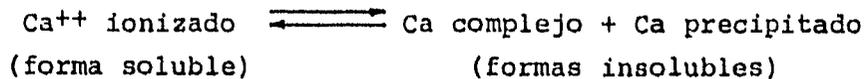
La presencia de iones de Ca^{++} es necesaria para la existencia misma de las micelas de caseína. (89) Por otra parte, es necesaria para que se lleve a cabo la coagulación propiamente dicha (2a. reacción) debido a la gran sensibilidad que experimentan las micelas a los iones de Ca^{++} cuando se someten a la acción del cuajo. Es decir, que cualquier causa de disminución de la concentración de la leche en iones de calcio debe evitarse, porque afectan sensiblemente la coagulación.

El calcio y el fósforo no se encuentran en la leche exclusivamente en forma de sales solubles; una parte importante se encuentra en fase coloidal insoluble: (1)

FOSFORO	Orgánico	-Fosfoserina de la caseína	Insoluble (coloidal)	19%		
			-Esteres fosfóricos	-Fosfolípidos	Soluble	17%
		Inorgánico	-Fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Insoluble (coloidal)	30%	
-Fosfatos en solución	Solubles		34%			
CALCIO	Orgánico:	-Calcio ligado a la caseína	Insoluble (coloidal)	21%		
		Inorgánico	-Fosfato tricálcico (del fosfocaseinato)	Insoluble (coloidal)	46%	
	-Sales de calcio no ionizadas (citrato, fosfato)		Soluble	21.5%		
	- Ca^{++} (ionizado)		Soluble	11.5%		

El fósforo y el calcio forman lo esencial de la parte "mineralocoloidal" que es una de las características de la leche; el magnesio contribuye en pequeña proporción. Asociado a estos elementos se encuentra un ácido orgánico, el cítrico. Dos tercios del fósforo y calcio escapan a la solución y forman parte, principalmente, del complejo fosfocaseinato de calcio. (...1)

La modificación del equilibrio entre las tres formas:



tienen un papel determinante en la estabilidad de la leche. (...1)

El aumento de la forma iónica corresponde a una mayor inestabilidad, que se pone de manifiesto en el curso del calentamiento (coagulación de leches esterilizadas, concentradas, etc.) o durante la acción del cuajo (tiempo de coagulación abreviado). (1)

Las leches naturalmente pobres en calcio o cuyo contenido en calcio iónico se disminuyó por efectos del tratamiento térmico o cualquier otro, coagulan con dificultad o no lo hacen.

La adición de una sal de calcio soluble (CaCl_2), se traduce por un aumento de la tasa de calcio coloidal y, paralelamente, por un aumento de la talla de las micelas, por lo tanto, de una disminución de su estabilidad. Inversamente, el descenso de la cantidad de calcio disuelta por acción de un agente secuestrante (EDTA) se traduce por una reducción del contenido en fosfato de calcio coloidal y una dispersión de las micelas. (34)

La disminución de la concentración salina por dilución de la leche, provoca una reducción del tamaño de las micelas. La concentración de la leche por evaporación, es, al contrario, el origen de un aumento de las dimensiones micelares. (34)

La adición de cloruro de calcio a la leche reduce el tiempo de coagulación en razón de: (34)

- El incremento de las tasas de calcio disuelto y ionizado

- El incremento del contenido en fosfato de calcio coloidal
- El descenso del pH provocado por la transformación de fosfatos solubles en fosfato de calcio coloidal:



El contenido en fosfato de calcio coloidal influye claramente sobre el tiempo de coagulación y la firmeza del gel obtenido. La presencia de fosfato coloidal es necesaria para la formación del coágulo y las diferencias observadas en la tensión de los geles podrían deberse en parte a las variaciones en las concentraciones de fosfato de calcio de la micela, (34) puesto que la adición de calcio aumenta el grosor de las micelas. (1)

Debe recordarse que si se excede la cantidad de cloruro de calcio añadida a la leche pueden producirse accidentes de fabricación (inactivación de la enzima, sabor amargo, textura indeseable, etc.).

El cloruro de calcio favorece el endurecimiento de la cuajada y el proceso de desuerado (ver: 3.1.5 y 3.1.8.3.2.2.2 C; 13), sobre todo en los primeros 45 minutos su efecto sobre el endurecimiento es más manifiesto, después disminuye la dureza de la cuajada.

El cloruro cálcico facilita además la retención de la grasa en la cuajada. (28)

D. Cuajo

a) Concentración de la enzima

La leche no coagula en cuanto entra en contacto con el cuajo, sino pasado algún tiempo.

La concentración de la enzima es un factor que influye sobre la primera etapa. (34)

Si el resto de los factores (acidez, sales cálcicas, temperatura, etc.) permanecen invariables, se da una relación inversa entre la dosis de cuajo utilizada y el tiempo que la coagulación tarda en producirse; cuanto más alta sea la dosis, menos tiempo tarda un volumen de leche en coagular, si la acidez y temperatura se mantienen constantes y próxi-

mas al óptimo (...). Aunque se empleen diluciones muy concentradas, dosis muy altas de cuajo, la coagulación no comienza hasta pasado cierto tiempo. Si la cantidad de cuajo añadida es muy baja, la leche no llega a coagular. (13)

La concentración de cuajo influye también sobre los caracteres mecánicos del gel, su elasticidad y su firmeza. (34)

Debe tenerse presente que los distintos preparados de cuajo suelen ofrecer distinta actividad por no haber sido debidamente conservados (13) o porque fueron preparados de distinta forma.

Las cantidades de cuajo varían, según los tipos de fabricación, dentro de límites bastante amplios: 15 a 30 ml de cuajo de fuerza 1/10,000 por cada 100 litros de leche, (34) lo que equivale a 0.015 y 0.03% respectivamente.

b) Estabilidad de la enzima

La estabilidad de la enzima está estrechamente relacionada con el pH. Se observa una sensibilidad máxima a pH 5.5-6 y a pH 2. Entre estos dos valores, el cuajo se autolisa y pierde más o menos su actividad. A pH superiores a 7 se observa una cierta desnaturalización que termina hacia pH 8 con una inactivación irreversible de la enzima. Una leche alcalina ya no coagula en su presencia. La temperatura regula igualmente la actividad coagulante de la enzima que es máxima a 40°C. Por debajo de 20°C la actividad es muy débil. (89, 34)

E. Temperatura

a) Leche, modificaciones de temperatura

Por enfriamiento (0-5°C) hay paso, en solución, de una parte del fosfato de calcio coloidal y disolución de una parte de la caseína beta. Las dimensiones de las micelas son entonces reducidas y la proporción de caseína soluble aumenta. (34)

Una elevación moderada de la temperatura (50°C) se acompaña de un incremento del contenido en fosfato de calcio coloidal y de un aumento del diámetro medio de las micelas. (34)

Un calentamiento brutal a temperatura elevada (85-100°C) provoca una insolubilización importante de calcio y de fósforo inorgánico (reducción del calcio disuelto por in-

solubilización de fosfatos), así como la formación de un complejo entre la caseína kappa y la betalactoglobulina (con asociación de ésta a las micelas). (34)

b) Temperatura de coagulación

Debe recordarse que la reacción primaria de la coagulación por el cuajo puede tener lugar a bajas temperaturas (a 0°C se produce aun a velocidad apreciable), pero no así la reacción secundaria que requiere un mínimo de 15°C para que el gel se forme adecuadamente. Por ello, a temperaturas inferiores a 10° la coagulación de la leche no se produce. Entre 10 y 20°C el tiempo de coagulación es largo. Por encima de 20°C el tiempo disminuye y es mínimo a 40-42°C. A temperaturas más altas la enzima se inactiva parcialmente, necesitando entonces más tiempo para que su acción se manifieste. Por arriba de 65°C la enzima se inactiva totalmente. (89, 34)

Por otro lado, aunque la temperatura de coagulación sea máxima a 40-42°C, debe adaptarse a las condiciones óptimas del desarrollo de los fermentos lácticos, que requieren mucho menor temperatura.

Para la elaboración de quesos blandos se utilizan temperaturas de coagulación bajas y para la de los duros altas. (13)

Dilanjan, (13) recomienda coagular a temperaturas ligeramente más altas si la leche es rica en grasa o es poco ácida; y en las de mucha acidez, debe descenderse la temperatura; por cada °SH (2.25°D) deberá descenderse la temperatura de coagulación de 0.5 a 1.5°C. Estas relaciones imponen un rango de temperaturas de coagulación para cada tipo de queso.

En la práctica, la coagulación por cuajo suele tener lugar en 20 a 60 minutos y en la mayoría de los casos en 30 a 40 minutos. (13) Naturalmente, esto no depende aisladamente de la cantidad y concentración del cuajo empleado, sino de la interacción de cada uno de los factores involucrados.

Los tiempos de coagulación largos prolongan en exceso el proceso tecnológico global y aumentan el riesgo de pérdidas de grasa con el suero, porque sube a la superficie en el curso de la coagulación y forma nata. (13)

Recientes estudios han mostrado que la "velocidad de coagulación" es un carácter que se encuentra bajo la dependencia de factores genéticos; presenta una gran variabilidad

y puede ser objeto de mejora mediante la selección del ganado (raza e individuo).

Como ejemplo de los caracteres de tipo hereditario, ligados especialmente a la constitución de la caseína y a las micelas, son las variantes genéticas de las diferentes fracciones de las caseínas. (Se sabe que las leches que con tienen caseína alfa-s₁ A, coagulan más lentamente que las que contienen alfa-s₁ B. El gel obtenido es claramente menos firme; 89).

Otros factores, tal vez menos importantes, influyen en la coagulación:

- La lipólisis (ver 2.3.3). Los ácidos grasos libe rados pueden ser absorbidos en la superficie de las micelas de caseína y modificar de este modo sus propiedades superficiales. Pueden también participar con cierta insolubilización del calcio. (89)
- Etc.

3.1.8.5.2.2.3 Características de las cuajadas enzimáticas

Las características de las cuajadas enzimáticas dependen de las propiedades fisicoquímicas de la leche de partida y deben controlarse a lo largo de su manipulación (...). En la práctica, en las industrias productoras de grandes can tidades de queso, resulta importante adoptar tratamientos particulares, adaptados a las condiciones de cada partida de leche, al objeto de obtener una cuajada que ofrezca siempre la calidad pretendida, con lo que se logra un producto final uniforme, pese a que las partidas de leche utilizadas ofrezcan características distintas. (13)

El gel producido por el cuajo es suave, elástico, de una gran cohesión, impermeable y contráctil.

Debido a su impermeabilidad no puede experimentar un desuerado espontáneo, pero en razón de su cohesión y de su contractibilidad, puede soportar un trabajo mecánico intenso y de este modo permitir una fuerte expulsión del lactosuero. (34, 89)

La firmeza del gel tiene gran importancia en queso-

ría, pero también es interesante apreciar este carácter tan objetivamente como sea posible. Algunos aparatos permiten seguir el endurecimiento del gel después de la coagulación; su empleo es aún muy limitado.

Existe una relación inversa entre el tiempo de coagulación y la firmeza del gel, los factores que disminuyen el tiempo de coagulación, aumentan la rigidez del coágulo; la medida del tiempo de coagulación puede ser considerada como un buen método de apreciación de la aptitud de la leche para la coagulación por el cuajo. (13) Bajo este título algunos autores recomiendan la determinación de la aptitud coagulante, poniendo 10 ml de leche en tubos de ensayo y calentar a 35°C, adicionar 2 ml de una solución de cuajo de dilución conocida y mantener la mezcla a 35°C hasta que al invertir un tubo de ensayo no caiga la cuajada. Con un cronómetro de reloj se mide el tiempo transcurrido desde la adición del cuajo, hasta la coagulación de la leche. De acuerdo con el tiempo transcurrido (inferior a 10 minutos y mayor de 20, por ejemplo), la leche se clasifica en tres tipos, buena, normal y de capacidad débil de coagulación: leche lenta o pe rezosa.

El endurecimiento progresivo de la cuajada se detiene, aunque por poco tiempo, cuando procede de leche de coagulación lenta. Sin embargo, la velocidad de endurecimiento tras la coagulación es mayor en estas leches que en las de coagulación rápida, pero la cuajada de las leches lentas no llega a adquirir el suficiente grado de firmeza hasta pasados 45 minutos. (13)

Finalmente, debe aclararse que la relación inversa tiempo de coagulación-rigidez del coágulo no se observa siempre. (34) De este modo, una acidificación de la leche conduce a un aumento progresivo de la tensión del gel hasta pH igual a 5.8 (pH óptimo de la acción de la enzima). (89) A pH inferiores a 5.8 la rigidez del gel y el tiempo de coagulación disminuyen con la acidificación. (34) Es la consecuencia de la desmineralización de las micelas que priva al gel de una parte de su armadura fosfocálcica. (89)

Una elevación de la temperatura de la leche hasta 42°C, mejora la firmeza del gel en la medida en que se aproxima a la temperatura óptima de acción del cuajo. Más allá, el gel se vuelve menos firme y más elástico. (89)

Un aumento de la concentración de fosfocaseinato de calcio por evaporación de la leche o adición de leche en polvo descremada, modifica poco la velocidad de coagulación, pe

ro aumenta sensiblemente la firmeza del gel. Contrariamente, la dilución de la leche con lactosuero, reduce la firmeza del coágulo sin que por ello disminuya claramente el tiempo de formación del gel. (34) Este caso puede presentarse con leches adulteradas por adición de suero.

3.1.8.5.2.3 Coagulación mixta

La coagulación mixta resulta de la acción conjugada del cuajo y de la acidificación láctica. Es el origen de la fabricación de numerosos quesos, (89) entre ellos el queso tipo Oaxaca.

En la práctica industrial, un gel mixto puede ser obtenido según dos técnicas: la acción del cuajo sobre la leche ácida o la acidificación de un gel obtenido por acción del cuajo. (89)

A. Acción del cuajo sobre una leche ácida

Se sabe que en medio ácido, la acción del cuajo se favorece. Por otro lado, la estabilidad de las micelas se disminuye. El tiempo de coagulación se acorta sensiblemente, Al pasar de pH 6.7 a pH 5.7 puede multiplicarse por 6 o 7 la velocidad de gelificación. (89)

El coágulo obtenido presenta características intermedias entre las de los geles láctico y el obtenido por el cuajo: suavidad y contractibilidad menores, firmeza y friabilidad más acentuados que las del gel obtenido por cuajo. (89)

B. Acidificación de un gel obtenido por acción del cuajo

El fenómeno se observa cuando se mantiene a 25-30°C un gel obtenido por acción del cuajo y poblado de bacterias lácticas. El coágulo es sede de una fermentación láctica y por lo tanto de una acidificación que provoca la solubilización progresiva de la armadura fosfocálcica del gel. Este pierde su cohesión original, se vuelve menos elástico y menos contráctil y se aproxima de este modo a los caracteres de la coagulación láctica. (89)

Los geles mixtos obtenidos según las técnicas indicadas, aunque presentan ciertas características semejantes, no son del todo idénticos porque su estructura no es probable-

mente la misma. En el primer caso, la formación de la red tridimensional es perturbada desde el principio de la acción del cuajo, mientras que en el segundo caso, la estructura reticular inicial del gel persiste bastante tiempo, a pesar de la solubilización de una fracción del esqueleto fosfocálcico. Estas diferencias de estructura determinan las diferencias de comportamiento que se registran en el curso del desuerado, las cuales deben tenerse en cuenta por el productor de quesos en la práctica industrial. (89)

3.1.8.5.2.4 Coagulación de la leche de quesería

La finalidad de seguir el procedimiento industrial de elaboración del queso tipo Oaxaca a través de un ejemplo (3.1.2.4) obedece a una necesidad objetiva; desde la Recepción y Almacenamiento, la leche de nuestro ejemplo (400 litros) se ha sometido a Evaluación, Depuración (3.1.1 con una pérdida de volumen despreciable), Estandarización, o bien, Descremado y Normalización (3.1.2.5) substracción de 10 litros para la elaboración de los fermentos (3.1.7.5), Pasteurización (3.1.3), Adición de Cloruro de Calcio (3.1.5), Adición de Colorante (3.1.6) y Adición de Fermentos Lácticos (3.1.7), con el objeto de disponer de una leche que se encuentra en óptimas condiciones para continuar el delicado proceso de su transformación en queso.

El comportamiento de la leche durante la pasteurización (especialmente cuando se pasteuriza a 63°C/30 min) debe seguirse atentamente, pues es el factor técnico más revelador del comportamiento de la leche durante la coagulación y manipulaciones siguientes (la leche de mala calidad sube mucho de acidez). Una ligera elevación de la acidez titulable no es perjudicial en la elaboración de queso tipo Oaxaca y similares, pero en otros casos (quesos que deben coagularse entre 15-16°D aproximadamente), la acidez en exceso debe neutralizarse e inclusive modificar el procedimiento de elaboración.

De acuerdo con nuestro ejemplo, en la tina de cuajado se disponen aproximadamente de 395.5 litros de leche, dependiendo, entre otros factores, del volumen extraído de leche descremada o estandarizada para la elaboración de los fermentos que servirán para la próxima elaboración y del volumen de leche vuelto a adicionar como fermentos lácticos.

La acidez y la temperatura deben continuar bajo vigilancia desde que la leche abandona el pasteurizador y durante el tiempo que permanezca en la tina de cuajado.

La leche que ha alcanzado la temperatura y tiempo de pasteurización debe enfriarse por medio de placas u otro procedimiento hasta la temperatura de coagulación ($\pm 30^{\circ}\text{C}$). Dependiendo del tipo de instalaciones, es posible que la leche se enfríe varios grados por debajo de la temperatura de coagulación; en este caso, la leche deberá calentarse nuevamente por inyección de vapor en la chaqueta de la tina de cuajado.

Los 395.5 litros de leche deben mantenerse en agitación constante en la tina mientras se adicionan los aditivos alimentarios: colorante (0.006% = 23 ml), cloruro de calcio (0.01% = 39.5 g; las especificaciones comerciales de los productos utilizados en este trabajo se describen en el apéndice A al final de este inciso), fermentos lácticos (2-1% = 8-4 litros); finalmente, la adición de cuajo, cuya cantidad depende de la fuerza de la preparación comercial o de la aptitud de la leche para coagular.

El empleo de un cuajo con fuerza 1:10,000 significa que puede emplearse al 0.01%, lo que para la cantidad de leche de nuestro ejemplo son 39.5 ml; sin embargo, en la práctica puede requerirse una dosificación de 0.02 a 0.025%, dependiendo de las características de la leche.

La acidez titulable de la leche después de la adición de cultivos lácticos debe alcanzar 20 a 22°D para proceder a la adición del cuajo.

Preparación y adición del cuajo

La dilución del cuajo a emplear, permite evitar graves accidentes de fabricación, tales como hinchamientos, etc. a condición de que lo sea con agua pura (hervida y enfriada), tanto desde el punto de vista bacteriológico como del químico. Lo más corriente es utilizar agua destilada, fácil de obtener por condensación del vapor que escapa de los aparatos de quesería. La dilución del cuajo, en cantidad igual de agua estéril, favorece su medición más exacta (al manipular más volumen en probeta) y el mejor reparto en la masa de leche a cuajar. (8)

Si el reparto del cuajo no es uniforme se suelen obtener quesos con nódulos extremadamente duros en su pasta, defecto que se denomina "quemado" (...). Cuando el volumen de leche a cuajar es muy grande da buen resultado (...) el diluir el cuajo en cuatro o cinco veces su volumen en agua y

utilizar una regadera que, a través de su alcachofa, permite dispersar perfectamente la solución de cuajo en la leche.

(8)

Después de agregar el cuajo, la leche debe continuar en agitación durante 30 a 60 segundos o más, hasta que se considere que se ha distribuido uniformemente. Entonces, de be detenerse el movimiento o simplemente dejar de agitar has ta completo reposo.

No hay que olvidar que si el líquido parece inmóvil en la superficie, su parte inferior, cerca del fondo de la tina, menos sujeta a frotamientos, a menudo se encuentra todavía en movimiento (23) y puede causar defectos de coagulación (coágulo quebradizo, liberación de suero antes de tiempo, etc.), con lo que se disminuye el rendimiento y la calidad del queso.

Cuando se dan valores de pH, rangos de temperatura y dosis de cuajo, se parte siempre de una leche "ideal" que día tras día presenta una calidad uniforme; en el capítulo de Evaluación de la leche dejamos constancia de todos los factores que hacen que la materia prima de elaboración cambie de un día a otro, de una partida a la siguiente, entre vacas y entre ordeños. Cuando se trabaja con leches de mezcla y procedentes de distintos establos que se encuentran en condiciones diferentes, la variabilidad de la materia prima puede encontrarse en límites un poco más estrechos, es decir, puede tener una uniformidad que varía sólo dentro de ciertos rangos. (Esta variabilidad puede verse incrementada con la mezcla de leches fraudulentas).

Para la fabricación de cada tipo de queso existen valores óptimos que ha fijado la experiencia, pero de cualquier modo, las condiciones de coagulación determinadas por el pH, la temperatura, la dosis de cuajo y demás factores, deben manejarse y ajustarse a las necesidades de coagulación diarias, teniendo presente que se influyen mutuamente; así, una leche que presente una acidez ligeramente mayor, podrá requerir menor cantidad de cuajo a una temperatura constante o podrá disminuirse la temperatura para frenar un poco la actividad de los fermentos; con una leche poco acidificada puede procederse a la inversa: elevar ligeramente la temperatura para favorecer la producción de ácido o aumentar la cantidad de cuajo manteniendo la temperatura constante; etc.

La coagulación de la leche (con todos los factores que la modifican) no es un fin en sí mismo, sino exclusivamente un medio para lograr el desuerado o pérdida de agua de

la leche; es entonces el desuerado el que de acuerdo al tipo de queso y las condiciones de trabajo, el que impone definitivamente el resultado que debe obtenerse al cuajar la leche manejando los factores que influyen en la coagulación.

Signos de la coagulación

En condiciones normales de trabajo, los primeros signos de la coagulación pueden verificarse entre 5 a 8 minutos después de adicionar el cuajo. (28)

Esto puede comprobarse dejando caer unas gotas de agua en la superficie de la leche desde una altura mínima. En el momento en que ha empezado la coagulación, el agua deja de mezclarse con la leche y aparece como una gota individualizada transparente en la superficie. (28)

Antes de empezar la coagulación, las burbujas de aire causadas por el movimiento rápido de un dedo dentro de la leche, se mantienen en la superficie durante algún tiempo, mientras que después de empezada la coagulación, las burbujas desaparecen muy rápidamente. (28)

Los signos del final de la coagulación son sencillos pero requieren cierta práctica para seguir una interpretación idéntica y constante.

El momento en que la coagulación está completa y la cuajada está lista para cortar, puede ser verificado por la forma y por el aspecto que presentan las superficies de un corte en V (o en T), practicado con una espátula metálica con que se levanta el trozo de la cuajada cortada. El corte debe ser nítido y las superficies brillantes, dejando salir un suero límpido.

El punto final de la coagulación también puede determinarse introduciendo verticalmente un dedo en la cuajada y levantando la punta del mismo con cuidado hacia adelante y observar la forma como la cuajada se abre delante del dedo, el corte debe ser nítido y las superficies brillantes. (28)

Otra prueba consiste en observar la forma y el aspecto de la cuajada que se hace al despegar de la pared de la tina por presión de la mano con un ligero desplazamiento horizontal hacia el centro. La cuajada debe despegarse con cierta facilidad en una extensión ligeramente superior a la superficie de contacto de la mano sin romperse y sin dejar

partículas pegadas a la pared de la tina, (28) ni en la superficie de contacto de la mano.

Apéndice A

A 1. Fermentos lácticos: Dri-Vac. Lactic Culture. Concentrated, Selected Strains of Lactic Acid Producing Dairy Bacteria Chr. Hansen's Laboratory Inc. Representante en México: Industrias Cuamex, S. A. de C. V.

A 2. Cuajo: Cuajo XXX de Industrias Cuamex, S. A. de C. V. o Micropep M-P (Mezcla de enzimas coagulantes microbianas y pepsina para elaborar quesos) Industrias Cuamex, S. A. de C. V.

A 3. Colorante Natural para Alimentos. Para colorear quesos. Hansen's MS 100 Soluble en agua. Materia colorante (bixina) de achiote (annato) en solución acuosa alcalina. Hecho en México. Fabricado con autorización de Chr. Hansen's Lab. Inc. Milwaukee USA por Industrias Cuamex, S. A. de C. V.

A 4. Cloruro de calcio en polvo. Aditivo para alimentos o CAL-SOL. Cuamex. Solución de Cloruro de Calcio en agua al 50% para la elaboración de quesos. Aditivo para alimentos.

(Cuando se emplea en polvo, los 39.5 g -0.01%- deben diluirse en agua pura y tibia previamente pasteurizada; si se utiliza la solución al 50%, deben adicionarse 79 ml: si 50 g de CaCl_2 se encuentran en 100 ml de solución, 39.5 g se encuentran en X ml de solución).

3.1.8.5.2.5 Funciones y ventajas de la producción de ácido láctico

Resulta conveniente mencionar en este apartado los efectos del ácido láctico producido puesto que, como integrante esencial de la Coagulación Mixta, son de suma importancia en la elaboración de queso tipo Oaxaca; algunas funciones encuentran su aplicación en etapas posteriores.

- a) El ácido láctico presente en el cultivo que se adiciona a la leche, así como el que se produce durante el tiempo que transcurre entre la adi-

ción del cultivo y la del coagulante, ayuda a lograr una rápida coagulación de la leche por la renina, la mezcla de renina y pepsina u otro coagulante de la leche. El tiempo de coagulación de todos los coagulantes usados actualmente disminuye por el incremento de la acidez en la leche.

- b) La producción de ácido por los cultivos lácticos después de que la cuajada ha sido cortada, ayuda a la expulsión del suero. Cuando el cultivo láctico fracasa en la producción de ácido durante la producción del queso, el producto generalmente tendrá un alto contenido de humedad.
- c) Un rápido desarrollo de ácido por el cultivo durante toda la producción del queso, restringe el crecimiento de microorganismos contaminantes. Si el cultivo láctico no produce ácido, el producto puede resultar gaseoso, amargo o de sabor indefinido. Las bacterias lácticas evitan el desarrollo de los gérmenes indeseables por competencia biológica y por la producción de ácido láctico.
 El ácido láctico no es activo contra los mohos que utilizan este compuesto como fuente de energía para producir anhídrido carbónico y agua. Pero el ácido láctico aumenta la concentración de iones de hidrógeno en el queso para establecer una barrera contra los organismos de la putrefacción, incluido el *Cl. sporógenes*, actuando así como substancia inhibidora.
- d) Afecta a la naturaleza y extensión de los cambios enzimáticos y ayuda así a determinar las características del queso. (8)
- e) Afecta a la elasticidad del coágulo terminado y promueve la fusión del mismo en una masa sólida (8) (ver: Malaxado).

La cantidad de ácido formado y el momento de su producción en la operación de fabricación, contribuye a determinar el tipo de queso resultante y su calidad, pudiéndose controlar mediante la clase y cantidad de cultivo iniciales usados y por la forma de manipulación de la cuajada. (8)

3.1.9 Tratamiento y Manipulación de la Cuajada

El objetivo perseguido por el tratamiento que recibe la cuajada en la cuba es fundamentalmente el de crear, mediante el desuerado y el trabajo, condiciones favorables al desarrollo de los procesos microbiológicos y enzimáticos implicados en la elaboración del queso. Al término de la manipulación o trabajo de la cuajada, ésta debe retener determinada cantidad de suero. (13)

Las propiedades de la cuajada varían con el tiempo; desde el momento de adicionar el cuajo se producen, sucesivamente, fenómenos muy complejos:

a) La formación del gel o coagulación propiamente dicha. Desde el comienzo de la acción de las enzimas coagulantes se produce una disminución de la hidratación de las micelas (...) Esta fase invisible de la deshidratación se pone en evidencia por una pérdida de viscosidad. La reducción de la envoltura acuosa protectora que rodea a las micelas favorece el establecimiento de uniones entre agregados de micelas. (1)

(...) la parte visible de la separación de la cuajada y el suero comienza con la aparición de una capa líquida en la superficie del coágulo. (1)

b) La sinéresis, es decir, la contracción de la malla reticular formada por las proteínas coaguladas que encierran los glóbulos grasos y el suero, con expulsión progresiva de este último. (1)

Dejados en reposo, los geles evolucionan más o menos según su modo de formación. Expulsan el suero espontáneamente seguido de una contracción de la red inicial. Es el fenómeno de la sinéresis cuyo mecanismo íntimo es todavía mal conocido. Puede pensarse primero en una disminución, con el tiempo, del grado de hidratación de las micelas. Después de cierto tiempo, una fracción del líquido intersticial escapa espontáneamente de las mallas de la red. (89)

También puede pensarse en una compactación progresiva de las mallas del gel por la creación de nuevas ligaduras o por el reforzamiento de las uniones existentes con el tiempo. Ya no se trataría entonces de un fenómeno meramente pasivo, como en el caso expuesto anteriormente, sino de un fenómeno dinámico que permite suponer las posibilidades de aceleración por la intervención de medios mecánicos.

La contracción resulta de la creación de ligaduras de tipo variado, cada vez más numerosas; (1)

- . Ligaduras entre el hidrógeno y los grupos -NH y -CO de moléculas diferentes.
- . Ligaduras salinas entre grupos activos descubiertos por los reajustes moleculares consecutivos a la coagulación, especialmente aquellos que pueden ser reunidos por cationes divalentes, sobre todo el calcio.
- . Puentes disulfuros que se establecen más tardíamente entre los residuos de cistina.

En realidad las dos hipótesis deben considerarse. La reducción del grado de hidratación de las micelas y la compactación de las mallas del gel se producen simultáneamente, pero la parte que conviene atribuir a cada uno de estos fenómenos varía con el tipo de coágulo (89) (gel láctico, gel obtenido por acción del cuajo o gel mixto).

c) El desuerado, es la consecuencia de la sinéresis, cuya acción es acelerada por diversas influencias: acidificación láctica, acciones mecánicas, etc. (En quesería, al fenómeno de la sinéresis se le llama desuerado; 34).

Para concretizar la amplitud del desuerado, recordemos que representa, en término medio, más del 95% del agua original de la leche.

En fisicoquímica, la porosidad del gel, cualquiera que sea su naturaleza, se explica por la existencia de finos canalículos más o menos estrechamente anastomosados (Benezech, 1958, citado por 89), recordando lo que se observa en una esponja.

Los geles (...) pueden considerarse como mallas reticulares formadas por conjuntos de filamentos moleculares, más o menos importantes, entrelazados de manera diferente según el tipo de gel. Igualmente puede imaginarse que las moléculas de fosfocaseinato de calcio forman los nudos de una red, resultante de ligaduras de diversos tipos que se establecen entre las micelas. (89)

Un gel láctico libera rápida y espontáneamente una cantidad importante de suero. Se trata probablemente, en lo esencial, de una disminución del grado de hidratación de las micelas. La contracción de las micelas, es decir, la sinéresis propiamente dicha, es débil o nula. Contrariamente, un

gel obtenido por acción del cuajo, poco después de su formación es casi impermeable. No hay deshidratación rápida de las micelas pero con el tiempo éstas se contraen y expulsan el suero más fácilmente cuando un corte apropiado del gel multiplica las aberturas de evacuación. (89)

Puede intentarse relacionar este comportamiento con la estructura de los diferentes geles.

En un gel láctico, la estructura micelar original de la leche es modificada en razón de la eliminación del calcio y del fosfato de calcio coloidal seguida de la acidificación. Por otra parte, esta carga mineral vuelve a encontrarse en el suero bajo la forma de lactato de calcio soluble. La desmineralización de las micelas disminuye su dimensión y aumenta su dispersión, incluso antes de la formación del gel. Este último está constituido entonces por una red de mallas extremadamente finas en el seno de la cual la superficie de contacto entre las micelas y el lactosuero es muy extensa. Consecuentemente, la proporción de agua ligada, retenida energicamente por la fase sólida, es elevada y se opone a una acentuada deshidratación, realizada por los procedimientos clásicos de desuerado. (89)

Por otro lado, las consideraciones anteriores pueden explicar las propiedades reológicas del coágulo láctico. Las mallas del gel, muy desmineralizadas, son de naturaleza casi exclusivamente orgánica. Se trata esencialmente de cadenas proteicas más o menos polimerizadas estrechamente entrelazadas para formar la malla reticular, la cual carece de rigidez y compactación. Es por ello que cuando se le somete a un trabajo mecánico, cortes regulares o agitación prolongada, se desmenuza rápidamente y se descompone en una multitud de pequeñas partículas de cuajada constituyendo una especie de polvo que nada en un suero turbio. Bajo esta forma el coágulo se recupera difícilmente sin pérdida. Además, el coágulo permanece muy húmedo. (89, 34)

En un gel obtenido por la acción del cuajo, la situación es totalmente diferente. La estructura original de la leche se conserva, los nudos de la malla reticular están constituidos por las micelas de fosfoparacaseinato de calcio, estructuras mucho más voluminosas que las moléculas de caseína, incluso al estado de polímeros o de complejos constituyentes del gel láctico. El resultado es que las mallas del gel por acción del cuajo son mucho más grandes. Una fracción notable del lactosuero se encuentra retenida mecánicamente y puede escaparse cuando la red es seccionada. Por otra parte, la elevada carga mineral de las micelas confiere

rigidez y compactación al gel obtenido por acción del cuajo. Se ha comparado esta carga a una especie de esqueleto óseo que asegura la cohesión del coágulo. Se ha señalado también el carácter hidrofobo muy marcado de la paracaseína kappa que puede explicar el establecimiento de ligaduras muy sólidas de tipo hidrófobo entre las micelas del fosfoparacaseinato. Tales uniones pueden contribuir a conferir al gel su rigidez. Al reforzarse con el tiempo pueden también ser el origen de la sinéresis. (89, 34)

En conclusión, la sinéresis es un fenómeno importante que depende de numerosos factores, de los cuales, el principal es la estructura del gel y sus propiedades reológicas. Es por ello que las condiciones del desuerado son muy diferentes según se trate de coágulo láctico, coágulo obtenido por acción del cuajo o coágulo mixto. (89)

3.1.9.1 Desuerado

A. Desuerado del coágulo láctico

En razón de la dispersión muy elevada de los agregados moleculares de caseína, de la casi nula contractibilidad del gel (dada su fineza reticular; 34), de la ausencia de carga mineral, el desuerado de un coágulo láctico es siempre difícil y conduce necesariamente a un coágulo muy húmedo, de escaso desuerado. Es la razón por la cual, la coagulación estrictamente láctica no se utiliza en la práctica quesera corriente. (89)

Los geles esencialmente lácticos pueden someterse a acciones mecánicas (corte, agitación), pero a condición de observar las precauciones que reduzcan las pérdidas de cuajada en el suero. Puede igualmente ajustarse juiciosamente la temperatura para controlar el fenómeno. Por debajo de 10°C el desuerado se vuelve nulo. Entre 10 y 20°C se acelera, pero aún es lento. Hacia 30°C es rápido. Puede pensarse que la elevación de la temperatura disminuye el grado de hidratación de las partículas de caseína del gel y disminuye la viscosidad del lactosuero. Dos fenómenos que facilitan el desuerado. (89)

Anteriormente, el desuerado de un gel láctico se realizaba en sacos o con telas filtrantes; actualmente puede realizarse también por centrifugación pero la cuajada permanece también muy húmeda por estar incompletamente desuerada.

B. Desuerado de un coágulo obtenido por el cuajo

Un coágulo obtenido por el cuajo no contiene bacterias lácticas y al no acidificarse no presenta ningún desuerado cuando se deja en reposo. Para permitir la salida del lactosuero que impregna el gel, se requieren las intervenciones mecánicas cuyo papel es el de destruir la cohesión y la compactación del coágulo. El lactosuero expulsado de las mallas de la red seguido de la sinéresis puede entonces escapar del gel. Asistimos así, en el curso del desuerado, a la contracción del coágulo que conduce al acercamiento de las micelas y a la compactación de las mallas de la red. Es un fenómeno comparable al que se produce al ejercer presión sobre una esponja.

La leche que coagula mal bajo la acción del cuajo produce una cuajada blanda que desuera mal, alargándose así el tiempo total de elaboración del queso. (13)

C. Desuerado de un coágulo mixto

Cualquiera que haya sido el procedimiento para obtener el coágulo mixto, sus caracteres son muy semejantes, sin que ello quiera decir que sean idénticos en su comportamiento.

Un gel originalmente obtenido por acción del cuajo y sometido a la acidificación, conserva facultades de desuerado mayores que el gel de leche ácida. Puede pensarse que esta diferencia de comportamiento refleja diferencias de estructura. En el primer caso, la estructura reticular inicial del coágulo obtenido por cuajo persiste bastante tiempo a pesar de la solubilización progresiva, en el curso de la acidificación, del fosfato de calcio coloidal. (89)

En el segundo caso, la formación de la estructura reticular es verdaderamente perturbada desde el inicio de la acción del cuajo debido a la desmineralización de las micelas de caseína.

(...) la expresión "coágulo mixto" no se aplica a un conjunto homogéneo de fenómenos. Un coágulo de este tipo puede presentar en mayor o menor grado los caracteres de un gel láctico o de un gel obtenido por el cuajo. (89)

3.1.9.1.1 Factores que intervienen en el desuerado y en los procesos microbiológicos que se desarrollan en la cuajada

Los medios mecánicos de desuerado utilizados por el quesero son el corte de la cuajada en trozos regulares y la agitación prolongada. Su acción es completada o simplemente controlada por intervención de la temperatura y la acidificación. (89)

3.1.9.1.1.1 Corte de la cuajada

(...) Sabemos que el gel de paracaseinato de calcio se encuentra en un estado físico inestable y que la sinéresis se produce espontáneamente. Esta debe controlarse e incluso favorecerse por acciones mecánicas. En el momento de iniciarse la coagulación la cuajada es blanda y progresivamente va haciéndose más firme. (1)

En la cuajada prosigue la fermentación láctica y la proliferación bacteriana. A medida que va ganando en firmeza, los elementos estructurales de la cuajada se aproximan más, se va reduciendo la capacidad de los espacios capilares y va disminuyendo el suero que contienen. Al principio, la cuajada contiene tanta agua como la propia leche, es decir, una proporción excesiva para el queso. De ahí la necesidad de expulsar parte de ella, lo que se logra destruyendo la estructura cerrada y la impermeabilidad de la cuajada rompiéndola en granos de un tamaño que depende del tipo de queso a elaborar (desde 2 a 3 mm hasta 2 a 3 cm). (13)

Cuando se emplea exclusivamente esta forma resulta la menos brutal. Constituye la "rotura", cuyo primer objeto es fraccionar la integridad de la película casi impermeable que se forma en la superficie de las tinajas de coagulación por la unión de ciertos constituyentes de la leche que pertenecen especialmente a la fase grasa.

El corte uniforme del gel tiene igualmente por función, multiplicar la superficie de exudación del suero y por lo tanto, de facilitar su evacuación. (89)

Las dimensiones del grano pueden variar según los métodos de fabricación.

El tamaño del grano en que es cortada la cuajada tiene una influencia definida en la velocidad de salida del suero y por lo tanto, para cada método consecuente de trabajo de cuajada dentro de tiempos y temperaturas siempre iguales, la humedad final de la cuajada y del grano dependerá en forma directa del tamaño del grano al corte. (28)

Los granos grandes retienen más humedad que los pequeños y por esto conservan más lactosa y consecuentemente la acidez del queso será también más alta.

El grano más pequeño desuera más rápidamente no sólo porque la distancia entre el centro y la periferia es más corta, sino también porque cuanto más pequeño sea el grano, más grande será la superficie en relación a su volumen. (28)

De este modo es posible con un corte de 0.5 cm producir un queso menos ácido, más blando y más plástico que con un corte de 1 cm dentro de los mismos tiempos de trabajo.

La superficie de exudación aumenta linealmente con la intensidad del corte (...) considerando un volumen de coágulo igual a 1 m^3 , el corte en fragmentos cúbicos de 10 cm de arista corresponden a una superficie de exudación de $600,000 \text{ cm}^2$, mientras que un corte de fragmentos de 1 cm de arista, aumenta esta superficie a $6,000,000 \text{ cm}^2$. En este caso, las posibilidades de desuerado son entonces teóricamente multiplicadas por 10 (Davis, 1965, citado por 89).

Sin embargo, otros parámetros imponen ciertos límites a la acción del corte en fragmentos uniformes (...) la multiplicación excesiva de las superficies favorece la elevada hidratación de las partículas (...89).

Para ciertos tipos de queso tradicionales, el éxito de la fabricación depende de la buena apreciación de las propiedades de la cuajada en el momento de la rotura y también en el momento en que deben intervenir otras operaciones (1) que a su vez, determinan el grado de desuerado y por ende el contenido de agua de la cuajada.

En el momento de la "rotura" la cuajada debe tener una firmeza suficiente y resistencia al corte (que corresponde a la "tensión" de la cuajada). Las cuajadas muy blandas se desmenuzan durante el trabajo, formándose el "polvo" de cuajada, que hace disminuir el rendimiento. (1)

Las cuajadas muy duras son difíciles de trabajar y se forma una capa seca sobre la superficie de los trozos.

En los dos casos, el desuerado es imperfecto. El quesero aprecia estas propiedades con la mano, aunque también puede guiarse por otras observaciones. (1)

Existe pues, para cada tipo de queso, una dimensión óptima de los granos, que permite realizar finalmente su desuerado correcto. Algunas veces es ventajoso limitar el desuerado en la tina practicando un corte poco pronunciado con el fin de facilitar el desuerado en la prensa por la presencia de granos suficientemente voluminosos para permitir un drenado del suero que es más fácil entre granos gruesos que entre granos demasiado finos. (89)

Cuando el tamaño de los granos no es uniforme, parte de ellos, los de menores dimensiones, quedan con menos humedad, más elásticos y con menor acidez final, mientras que los de mayor tamaño quedan más blandos, más llenos de suero y presentarán al final una acidez más alta. Esto determinaría la formación de una masa de textura poco uniforme con una distribución desigual de humedad y de acidez. (28)

El momento en el que interviene el corte después de la formación del gel, no es indiferente en cuanto al futuro del coágulo. La experiencia muestra que si las acciones mecánicas que lo afectan en el curso de la fabricación son importantes, es deseable realizar el corte de la cuajada en un gel aún suave y no muy firme como es el caso cuando la acción del cuajo se prolonga antes de la rotura. De cualquier modo, el corte no debe realizarse prematuramente, sobre un gel muy suave, porque se corre el riesgo de pulverizar el coágulo y de provocar, en consecuencia, pérdidas de materia grasa y de caseína. (89, 28)

En conclusión, según los tipos de fabricación, el desuerado no comienza en el mismo momento, sino que para una fabricación dada, la consistencia del coágulo debe ser sensiblemente constante. El tiempo que transcurre desde la coagulación y el desuerado es, pues, un parámetro muy importante en el diagrama tecnológico de la fabricación de un queso. (89)

Las liras son unos rectángulos de metal que se utilizan para cortar la cuajada; están cruzados por una serie de alambres de acero inoxidable colocados a espacios regulares a la distancia más conveniente para el tipo de trabajo y variedad de queso a producir. Por lo general se usan dos liras, una de alambres verticales y otra de alambres horizontales (...); aplicando la lira horizontal una vez y en seguida la vertical en los dos sentidos, longitudinal y transversal,

se obtiene la división de la cuajada en cubitos cuyo tamaño depende de la distancia entre los alambres de la lira. (28)

Las liras deben introducirse y retirarse de la cuajada oblicuamente y describiendo un arco de círculo para que el borde del aro presente siempre la arista a la cuajada, cortándola, pues de otro modo la fase lateral de la lámina del arco quebrará la cuajada.

Las liras deben moverse de tal forma que aseguren un corte uniforme.

Es evidente que las liras deben encontrarse en perfecto estado de higiene, sin alambres flojos o rotos y sin estar oxidadas. (28)

A menudo, con el fin de evitar en lo posible deshacer la cuajada, algunos técnicos introducen las liras vertical y horizontal en la leche inmediatamente después de la operación de agregar el cuajo.

Las liras deben ser conservadas verticalmente durante el corte, y al llegar al extremo opuesto, inclinar las liras hacia atrás cerca de 5 cm rozando el borde horizontal inferior contra la pared del extremo recto de la tina (las tinas rectangulares son de uso muy común). Invertir la posición de las liras y repetir la operación en sentido contrario.

La lira vertical debe aplicarse transversalmente sin cortar dos veces la misma zona, a menos que se deseen granos demasiado pequeños, es preferible dejar cintas de cuajada sin cortar.

3.1.9.1.1.2 Agitación

En seguida del fraccionamiento de la cuajada el grano empieza a presentar cada vez más la tendencia a sumergirse en el suero (...) si en seguida del corte se deja reposar el grano largo tiempo en el fondo de la tina, éste se adhiere y vuelve a formar una masa blanda y compacta.

Para conservar el grano individualizado y evitar que se apelmace formando grumos y se pierda el ritmo del desuerado, es necesario mantener el grano en constante movimiento por medio de agitación que debe ser lenta al principio; va aumentando de velocidad a medida que la densidad y consistencia del grano aumenta. (28)

La agitación es una operación que debe conducirse con delicadeza para no romper el coágulo y para conservar la integridad de los granos. De ello depende el rendimiento en queso.

3.1.9.1.1.3 Intervención de la temperatura

La temperatura desempeña un papel esencial en el desuerado de un gel obtenido por acción del cuajo. La elevación de la temperatura permite disminuir la hidratación de los granos de cuajada y favorece la sinéresis. La temperatura constituye así un factor de desuerado que conviene utilizar juiciosamente en cada tipo de fabricación. (89)

La elevación de la temperatura en la elaboración del queso tipo Oaxaca es prescindible, por ello no insistiremos mucho al respecto.

3.1.9.1.1.4 Intervención de la acidificación

El corte, la agitación e incluso el cocimiento, cuando se emplean aisladamente, no permiten, en la práctica, obtener una cuajada satisfactoria para la elaboración de queso a partir de un gel obtenido por el cuajo. Es necesario hacer intervenir un proceso biológico, la acidificación. La acidificación confiere la textura y la plasticidad convenientes al queso. En su ausencia se obtiene una materia plástica y no una cuajada para elaborar queso.

La acción de la acidificación es compleja y resulta sobre todo de sus consecuencias sobre el acondicionamiento mineral de la cuajada.

En primer lugar, la acidificación favorece el drenado del suero aumentando la permeabilidad del gel seguido de una cierta disolución de su estructura cálcica. Posteriormente, regula el contenido final de materias minerales en la cuajada, parámetro que regula el futuro y las características definitivas del queso.

La acidificación favorece la sinéresis; puede adelantarse una doble explicación. Por una parte, el descenso del pH disminuye el agua de hidratación de las micelas y, por otra, la solubilización de una parte del calcio ligado a las proteínas favorece el establecimiento de ligaduras al dejar

libre el sitio de unión. (1)

Los principales factores que regulan la acidificación son los siguientes:

- La población de bacterias lácticas acidificantes en el coágulo, asegurada por la inoculación de la leche con cultivos o por maduración previa de la leche.

La formación de ácido láctico, que comenzó antes de que la leche coagulara, prosigue durante el trabajo de la cuajada, a lo largo del cual la temperatura es favorable al desarrollo de las bacterias acidolácticas. (13)

Al practicar la "rotura", parte del suero abandona la cuajada y la carga microbiana se reparte entre ambas fases, la mayor parte permanece en los granos y con el suero se va entre 1/7 y 1/9 de la carga total. Más tarde el valor (6:1 a 8:1) del cociente: gérmenes de la cuajada/gérmenes del suero aumenta más, ya que los microorganismos se multiplican mucho más rápidamente en los granos de cuajada que en el suero, porque los primeros contienen más proteína cuyo poder tampón la protege frente al ácido láctico. El cociente microorganismos de los granos de cuajada/microorganismos del suero resulta especialmente alto en el momento de proceder a la extracción de la cuajada de la cuba. (...13)

- La capacidad del coágulo para permitir el desarrollo de esa población. La presencia de antibióticos conduce a la obtención de quesos insuficientemente desuerados. (89)
- La temperatura, que debe ser próxima a la temperatura del desarrollo óptimo de las bacterias. Un desuerado a temperatura demasiado baja bloquea la acidificación y contribuye a detener el desuerado. (89)
- La velocidad de desuerado, que regula el tiempo durante el cual el suero ácido permanece en contacto con los constituyentes de la cuajada. Esta velocidad es función del momento, de la importancia y de la intensidad de las intervenciones mecánicas, de la temperatura y de la acidificación. (89)

En resumen, la acidificación regula el tipo de cuajada obtenida en quesería, tipo definido por su composición,

su textura y sus caracteres reológicos. El éxito de una fabricación depende esencialmente de la combinación juiciosa de las intervenciones mecánicas, de la temperatura y de la acidificación. (89)

Otro tipo de intervenciones tienen la finalidad de acentuar o disminuir el efecto de alguno de los factores que regulan el desuerado y, por ende, el tipo de queso. Tal es el caso del lavado de los granos con agua o con salmuera, después de cortar la cuajada y haber eliminado parte del suero exudado, con ello se diluyen los constituyentes solubles del coágulo y en primera instancia, la capa de suero que recubre los granos de cuajada; además, permite extraer, por difusión, una parte del suero retenido en el interior de los granos y disminuye el contenido de lactosa en el coágulo, con lo que se limita la acidificación posterior.

3.1.9.1.2 Comportamiento y función de los constituyentes mayores de la materia seca del coágulo en el curso del desuerado

El comportamiento y papel de la materia grasa, de las proteínas y los constituyentes minerales deben ser contemplados.

Materia grasa

En el curso de la coagulación, la materia grasa no tiene un papel activo. Los glóbulos de grasa son aprisionados en las mallas de la red de caseína. Sin embargo, el contenido de la leche en materia grasa puede influir sobre las condiciones de coagulación. Una cantidad elevada parece perturbar la formación de la red proteica. Este fenómeno puede explicar el hecho que una leche rica en grasa habitualmente exige un poco más de cuajo que una leche pobre, para coagular en un tiempo dado.

Puesto que la materia grasa es simplemente retenida mecánicamente en el gel, se concibe que cualquier acción que tienda a fraccionar las mallas de la red puede provocar su salida. Esta es más significativa cuanto más elevada sea la proporción de materia grasa en el gel, más intenso sea el trabajo mecánico y más suave sea el coágulo. Las pérdidas de materia grasa en el suero varían pues, con los tipos de fabricación. (89)

Proteínas

La presencia de la materia grasa interviene directamente sobre las condiciones del desuerado. Este constituye una cantidad muy poca agua, mientras que las proteínas fijan una cantidad notable bajo la forma de agua ligada. Consecuentemente, la humedad de un coágulo desuerado varía en el mismo sentido de la proporción de proteínas que contiene, permaneciendo constantes las demás condiciones de fabricación. Un queso magro es entonces más difícil de desuerar que un queso graso. (89)

(...) la fase grasa fija una cantidad de agua sensiblemente idéntica, cualquiera que sea el tipo de queso, igual a 20 o 30% de su peso. Esta agua corresponde al fenómeno de hidratación de las proteínas membranarias. (Ver 2.3.2.2) Por otro lado, las proteínas mayores del coágulo retienen agua en cantidades no solamente mucho más importantes sino también muy variadas en los tipos de fabricación, es decir, dependiendo de las condiciones de la coagulación y del desuerado. De este modo, en una cuajada principalmente láctica, la cantidad de agua fijada por las proteínas mayores es cuatro a cinco veces más elevada que la retenida por las mismas proteínas en un queso de pasta cocida obtenida con predominio de la acción del cuajo. (89)

Hasta ahora, se ha contemplado únicamente el agua fijada por el conjunto de las proteínas mayores de la cuajada, constituidas, de manera muy irregular, por el caseinato y las proteínas solubles. Si se consideran las cantidades de agua retenidas respectivamente por estas dos fracciones, se observa que la segunda tiene una capacidad de hidratación mucho más importante que la primera. Resulta de ello que un coágulo anormalmente rico en proteínas del suero se desuera lento y difícilmente. Todos los factores que provocan un aumento de las proteínas solubles (presencia de leches fisiológicas o patológicas, pasteurización de la leche a alta temperatura...), modifican entonces las condiciones de fabricación.

La estructura de la fase micelar puede igualmente modificar la marcha del desuerado. En las leches que presentan micelas del fosfocaseinato de calcio muy pequeñas, el desprendimiento del suero es lento, mientras que es más rápido cuando las micelas son grandes (Mocquot y col., 1954, citado por 89). Se sabe que estos hechos están en relación con el grado de mineralización de las micelas y que regulan igualmente la velocidad de coagulación. El fenómeno se ha

puesto en evidencia comparando la humedad de los sedimentos obtenidos por ultracentrifugación de leches "lentas" y de leches "rápidas". La humedad es siempre más elevada en el caso de las leches lentas que se desueran mal. (89)

Constituyentes minerales

Las consecuencias de la acidificación sobre la mineralización de la cuajada fueron estudiadas anteriormente. Es en el curso del desuerado que una fracción más o menos importante de los constituyentes minerales se escapa del coágulo bajo la forma de lactatos. El grado de desmineralización de un queso depende entonces estrechamente de la intensidad de la acidificación y de las condiciones en las cuales ésta haya intervenido. De este modo, después del desuerado, una cuajada obtenida por acción del cuajo presenta una mineralización más elevada que la de una cuajada de tipo láctico. Un coágulo mixto, cuyo desuerado es más lento, está más desmineralizado que un coágulo del mismo tipo cuyo desuerado es más rápido. (89)

El acondicionamiento mineral de la cuajada es uno de los parámetros más importantes de la tecnología quesera. A su vez, regula la textura de las cuajadas y su evolución posterior.

3.1.9.1.3 Características y composición del suero

El suero es la parte líquida que queda después de separarse la cuajada y elaborar el queso. Su composición varía según la de la leche y también según el tipo de queso elaborado. (15)

La cantidad de lactosuero disponible en el mundo es considerable; representa más del 80% de la leche de quesería, (1) y corresponde en término medio a nueve veces el volumen de quesos fabricados. (89)

El agua es el componente más abundante, 95.3% aproximadamente, 10 g de proteína por litro, 12-15% de extracto seco; el resto es lactosa, 70%, y un residuo mineral importante, aproximadamente 10%.

El lactosuero de quesería es un líquido pobre en extracto seco (6 a 6.5%) que se altera rápidamente bajo la ac-

ción de diversos microorganismos. Debe utilizarse y tratarse sin demora. En cualquier caso hay que tener en cuenta su origen (1):

- a) Lactosuero dulce, proveniente de la coagulación por acción del cuajo de leches no ácidas y conservado siempre en buenas condiciones; (...) su acidez varía, según las fabricaciones, de 15 a 22°D.

El suero dulce es el más empleado en la industria. Contiene cerca de 63 a 67 g de materias nitrogenadas, 6 a 8 g de materias salina, 1 a 2 g de materia grasa. (89)

- b) Lactosuero ácido (...) tiene un reducido contenido de lactosa. La acidez puede elevarse hasta 120°D (contiene mayor cantidad de sales minerales que los sueros dulces). (1)

Los sueros ácidos tienen una composición demasiado variable para que los contenidos medios de sus diversos constituyentes tengan significación.

(89) No obstante, se han mencionado algunos componentes de interés, por ejemplo, el contenido graso (ver 3.1.2.4) que al igual que la lactosa, sales minerales y proteínas son componentes originales de la leche.

Las proteínas del suero, como parte del contenido nitrogenado de la leche, no coagulables por acción del cuajo durante la fabricación, merecen una ligera revisión.

3.1.9.1.3.1 Proteínas del suero

La distribución de las principales sustancias nitrogenadas de la leche de vaca aparece en la página siguiente. (1)

La caseína y las distintas fracciones que la integran, fueron analizadas en 3.1.8.3.

Las proteínas del suero corresponden al conjunto de materias nitrogenadas que no precipitan cuando se ajusta el pH de la leche a 4.6, punto isoeléctrico de la caseína entera. Es por ello que se les llama proteínas solubles. Se encuentran en el suero que se separa del coágulo obtenido por la adición de cuajo. Representan aproximadamente el 20% de las proteínas totales de la leche. (1)

	PROPORCIONES	
	Relativas	Gramos por lt
Prótidos totales	100	32
Caseína entera	78 100	25
Caseína alfa-s	40	10.0
Caseína beta	30	7.5
Caseína kappa	15	3.8
Diversos	15	3.7
Proteínas del suero	17 100	5.4
Betalactoglobulina	50	2.70
Alfalactalbúmina	22	1.20
Globulinas (inmunes)	12	0.65
Seroalbúmina	5	0.25
Proteosas-peptonas	10	0.60
Substancias nitrogenadas no proteicas	5	1.6

Los diversos métodos de fraccionamiento (...) permiten distinguir cuatro grandes fracciones:

- A. Albúminas
- B. Globulinas
- C. Proteosas-peptonas
- D. Proteínas menores

A. Albúminas

Cuantitativamente, es la fracción más importante por que representa el 75% de las proteínas del lactosuero y 15% de las proteínas totales de la leche. (89)

Se compone esencialmente de tres constituyentes:

- . Alfalactalbúmina
- . Betalactoglobulina
- . Seroalbúmina

a) Alfalactalbúmina. Proteína de peso molecular

igual a 16,300, muy soluble en el agua a pH 6 pero mucho menos soluble en la zona de pH 4-4.6. Representa aproximadamente 25% de la fracción "albúminas".

La composición en aminoácidos, así como la secuencia de la molécula de alfa lactalbúmina se conocen en la actualidad. La cadena peptídica única está constituida por 123 aminoácidos y contiene cuatro puentes disulfuro (89) (se caracteriza por su elevado contenido en triptófano: 7.2%; 1). La estructura ha sido asociada a la de la lisozima, aunque las dos proteínas presentan diferente especificidad.

Se sabe, en efecto, que la alfa lactalbúmina existe únicamente en los mamíferos, mientras que la lisozima parece muy difundida en las especies animales.

El papel biológico de la alfa lactalbúmina ha sido descubierto recientemente. La proteína interviene en la síntesis de la lactosa, la cual, se sabe que está bajo la dependencia de tres enzimas. Una de ellas, la lactosa sintetasa, está constituida por dos subunidades proteínicas A y B. La proteína B no es otra que la alfa lactalbúmina. (89, 51)

Mientras que los bovinos pertenecientes a la especie Bos taurus no presentan variantes genéticas de la alfa lactalbúmina (tipo A), algunos bovinos de la especie Bos indicus (cebús) presentan un tipo B.

b) Betalactoglobulina. Representa aproximadamente 70% de la fracción "albúminas". Es una proteína cuyo peso molecular es aproximadamente de 18,000 y cuya solubilidad es nula en agua pura, únicamente la presencia de materias salinas permite asegurar cierta solubilidad.

El término betalactoglobulina, resulta de circunstancias históricas. Pedersen, en 1836, fue quien utilizó por primera vez el prefijo beta para designar una proteína del diagrama de sedimentación obtenido por ultracentrifugación de la leche descremada. Este prefijo permitía igualmente distinguir esta proteína, soluble en una solución semisaturada de sulfato de amonio, de la fracción insoluble de la misma solución, llamada en la época "lactoglobulina". Es este carácter de solubilidad que explica la clasificación de la betalactoglobulina en la fracción "albúminas", mientras que su denominación evoca, de hecho, la fracción "globulinas". (89)

La betalactoglobulina ha dado lugar a numerosos estu

dios fisicoquímicos. La molécula está constituida por una sola cadena peptídica de 162 aminoácidos y comprendiendo dos puentes disulfuros y un agrupamiento tiol libre, cuya presencia tiene importantes consecuencias en tecnología lechera. (89)

En algunas regiones se conocen cuatro variantes genéticas de esta proteína (A, B, C y D).

Las diferencias son mínimas y residen en la composición de aminoácidos; principalmente el número de restos de valina, glicina y alanina. El peso molecular y los extremos de la cadena proteica son los mismos. (1)

La betalactoglobulina es una molécula muy compacta cuya cadena está fuertemente replegada. Es particularmente apta para formar polímeros cuya complejidad está en función del pH. Por debajo de pH 3.5 los polímeros se disocian reversiblemente y la unidad elementaria obtenida corresponde a la molécula de peso molecular vecino a 18,000. (89)

A la temperatura ordinaria, la betalactoglobulina de la leche no parece ligarse a otras fracciones proteicas; por el contrario, durante el calentamiento forma un complejo con la caseína kappa. Este complejo es más estable que sus componentes separados; el enlace se hace por un puente disulfurado. (1)

La betalactoglobulina es el principal portador de grupos sulfhidrilos, que se modifican o separan en el curso de la desnaturalización y que intervienen en la formación del "sabor a cocido" de la leche calentada (1) (ver 3.1.3).

c) Seroalbúmina. Proteína de peso molecular elevado, igual a 65,000, que se identifica con la seroalbúmina sanguínea (89) (posee el mismo peso molecular, la misma movilidad electroforética e iguales propiedades inmunológicas; 1). Muy soluble en el agua, posee, en su molécula, un grupo tiol y 17 puentes disulfuros intrapeptídicos. Representa aproximadamente 5 a 6% de la fracción "albúminas" (89) (0.25 g/lt; 1).

B. Globulinas

Mientras que la fracción "albúminas" permanece soluble en una solución semisaturada de sulfato de amonio, la fracción globulinas precipita. Representa 10 a 12% de las proteínas solubles. (89)

Se sabe desde hace mucho que pueden distinguirse, por diálisis, dos subfracciones: una de ellas, la euglobulina, es insoluble en el agua pura en su punto isoeléctrico, la otra, la seudoglobulina, es soluble en las mismas condiciones. (89)

Las globulinas de la leche presentan una actividad inmunológica importante. Es por ello que a menudo se les llama inmunoglobulinas. Son proteínas de peso molecular muy elevado, superior a 150,000 y cuya actividad inmunológica se puede caracterizar haciéndolas reaccionar con antígenos apropiados.

Por este método se ha determinado la presencia de aglutininas, que provocan la aglutinación de ciertas bacterias y que juegan de este modo un papel importante entre las sustancias inhibidoras del desarrollo de los gérmenes en la leche cruda. Igualmente, se ha puesto en evidencia el papel de las euglobulinas presentes en la superficie de los glóbulos grasos, en el fenómeno del descremado espontáneo.

Sin embargo, es la transmisión de cierta inmunidad de la madre al hijo durante los primeros días de vida, la que confiere a las inmunoglobulinas un papel fundamental. Al nacer, el becerro no posee ninguna inmunidad pasiva transmitida por la vaca. Su suero sanguíneo está casi desprovisto de anticuerpos, porque la placenta de la vaca, con sus siete capas de tejido, constituye una barrera que no puede ser franqueada por los anticuerpos. En estas condiciones, la transmisión de inmunoglobulinas por el calostro materno resulta vital para el becerro. En efecto, estas sustancias atraviesan el epitelio digestivo para convertirse en los anticuerpos del suero sanguíneo. Son las inmunoglobulinas presentes en gran cantidad en el calostro, y que se encuentran en dosis mucho menores en la leche normal (0.5 g/lt) (escasamente el 2% de las proteínas totales; 1). Se trata de anticuerpos del tipo IgG* constituidos por proteínas que contienen 2 a 4% de glúcidos. Se distinguen de los constituyentes homólogos de la leche humana que pertenecen al tipo IgA. Estas últimas no pueden atravesar la pared intestinal del lactante y no intervienen, pues, para reforzar el sistema inmu-

*En el seno de las inmunoglobulinas del sistema gamma, se distinguen tres tipos de anticuerpos: IgG, IgA e IgM. Según su movilidad electroforética las IgG se reparten en IgG "rápidas" e IgG "lentas". Los anticuerpos de la leche de vaca son del tipo IgG "rápidos".

nitario del joven, quien, felizmente, beneficiado desde el nacimiento de una gran inmunidad pasiva transmitida por la madre al feto en razón de una estructura suficientemente permeable de la placenta. En el niño, el papel esencial de los anticuerpos de la leche materna es el de contribuir a la eliminación de los gérmenes patógenos presentes en el tubo digestivo. (89)

C. Proteosas-peptonas

Es la fracción de las proteínas de la leche no precipitadas por calentamiento a 95°C durante 30 minutos, seguido de una acidificación a pH 4.6.

Representa aproximadamente 10% de las proteínas del lactosuero. Muy heterogénea no es aun perfectamente definida. (Ribadeau-Dumas, 1971; citados por 89).

Está constituida principalmente por cuatro componentes denominados componentes "3", "5" y "8 rápido" y "8 lento". El componente "3" se encuentra exclusivamente en el lactosuero. Es rico en hexosas (7%), en hexosaminas (6%), en ácido siálico (2%), pero pobre en fósforo (0.5%). Las otras tres, menos ricas en glúcidos y ácido siálico, pero más ricas en fósforo, se encuentran a la vez en el lactosuero y las micelas. (Rose y col., 1980, citados por 89).

D. Proteínas menores

Comprende esta fracción un cierto número de proteínas, presentes en pequeñas cantidades y difíciles de clasificar. Entre ellas hay que destacar a la lactoferrina o proteína roja, la lactolina y las proteínas membranas de los glóbulos grasos (ver 2.3.2.2). En conjunto representan menos del 5% de las proteínas del lactosuero.

Lactoferrina (ver 1.3.1 f.). Está constituida por una proteína de una sola cadena polipeptídica de peso molecular igual a 86,000. Contiene glúcidos (7%), cistina (5%) y hierro (0.1%). Se le encuentra adsorbida sobre el precipitado de caseína isoeléctrica. La lactoferrina puede fijar reversiblemente el hierro y adquirir una coloración rosa que se desarrolla con la cantidad de hierro conjugado. La fijación del hierro sobre la lactoferrina es especialmente función del pH y de la presencia de iones carbónicos. El mecanismo de intervención de la lactoferrina en la transparencia del metal hacia la célula intestinal es aún discutido. (Spik 1970, citado por 89)

Lactolina. Como la proteína precedente, se adsorbe sobre el precipitado de caseína isoeléctrica. Pobre en fósforo y en glúcidos, no contiene metales y su peso molecular es de 43,000. El calostro es diez veces más rico en lactolina que la leche. (89)

Proteínas membranarias. Pueden aislarse a partir del suero de mantequilla obtenido por batido de una crema lavada. Su complejidad refleja el carácter muy heterogéneo de la constitución proteica de la membrana del glóbulo graso (2.3.2.2). Por la presencia de glúcidos (3-4%) y de fósforo (0.6-0.7%) se trata de glicoproteínas fosforadas parcialmente solubles en el ácido tricloroacético al 2%. Estas proteínas forman complejos muy sólidos con los lípidos membranarios (Swope y col., 1968, citado por 89).

El suero contiene muchos nutrientes valiosos de la leche, pero se emplea sobre todo en forma líquida para la nutrición humana, en la preparación de queso de suero, de bebidas de suero y de bebidas fermentadas de suero (...). Los principales usos industriales del suero consisten en la manufactura de lactosa, de pasta de suero y de suero seco, así como de varios productos industriales fermentados, entre ellos el ácido láctico y el alcohol etílico. (15) La grasa del suero se recupera industrialmente para la elaboración de mantequilla.

Desde el punto de vista de la nutrición humana, son muy recomendables la recuperación de la proteína del suero haciendo queso de suero (requesón) y el uso del suero como bebida fermentada. En el mundo entero son graves las pérdidas de nutrientes que para la nutrición humana representa el suero no aprovechado. Existen dificultades en los países industrializados para librarse del suero que desperdician; y el arrojarlo en arroyos o ríos contamina las aguas y origina serios problemas ecológicos. (15)

El lactosuero es un alimento interesante no sólo por la presencia de lactosa, sino también por su contenido en proteínas solubles, ricas en ácidos aminados indispensables (lisina y triptófano) y por la presencia de numerosas vitaminas del grupo B (tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina, ácido ascórbico). (89) La riboflavina o vitamina B₂ es el pigmento amarillo-verdoso que comunica el color al suero. Se encuentra presente en cantidades de 800 a 3,000 microgramos por litro (ver 2.3.2.2, g).

3.1.9.2 Malaxado

Después de cortar la cuajada, el suero presenta una acidez titulable muy baja comparativamente con la acidez que alcanzó la leche antes de cuajarla (se debe a que la cuajada secuestra los elementos de las proteínas que contribuyen a la acidez).

La agitación se inicia entonces muy lentamente para que el grano vaya adquiriendo consistencia firme. Paralelamente, la acidez titulable del suero debe vigilarse para conocer su desarrollo y determinar el momento en que debe desuerarse.

La interpretación de los signos que marcan el momento en que se debe dar por terminado el trabajo del grano, es uno de los momentos más delicados en la fabricación de queso, por cuanto si se interrumpe el trabajo antes de que el grano adquiera la consistencia, humedad y acidez apropiadas, el queso quedará con demasiada humedad, muy blando y posiblemente con acidez exagerada y con textura futura friable; al contrario, si se tarda demasiado en empezar el desuerado, el queso quedará seco y duro. (28)

Los signos específicos (textura, consistencia, flexibilidad, densidad) del grano al final del trabajo, son características para cada tipo de queso y dependen del método de trabajo y del estado fisicoquímico resultante de la humedad y de la acidez real de la cuajada en grano.

En la elaboración del queso tipo Oaxaca, la acidez del suero debe subir lentamente hasta alcanzar 20°D, momento en el cual puede proceder a desuerarse.

Puede ocurrir que la acidez del suero comience a elevarse muy rápidamente durante la agitación y alcance 20°D o más antes de que los granos posean una consistencia firme. Para evitar que la acidez suba en esta forma, debe dejarse salir un poco de suero de la tina y controlar la acidez; se acostumbra rebajar la lactosa de la cuajada por medio de agua pasteurizada que se agrega a la tina en lugar del volumen de suero extraído, durante la fabricación.

Este tratamiento por el agua puede ser más o menos intenso y aplicarse en diferentes fases del trabajo según el efecto final que se desea y según la variedad de queso. (28)

El agua debe ser fría. El agua caliente intensifica

ría la sinéresis y el grano perdería humedad y endurecería hasta un grado en que no puede adquirir la elasticidad adecuada por falta de acidificación (los fenómenos osmóticos hacen que una parte de la lactosa y del ácido láctico salgan del grano y pasen al suero).

Al agregar agua fría la temperatura del grano y del suero bajan. Este descenso de la temperatura puede frenar la sinéresis o provocar una histéresis, o sea la descontracción de las mallas de caseína del grano de cuajada, y por efecto de esta acción el grano se hincha, se ablanda y adsorbe otra vez humedad y el queso queda más blando.

A lo largo del tratamiento de la cuajada sobre sus granos se forma una película que impide la salida del suero. Por eso es especialmente importante que al trabajar con cubas de preparación de cuajada de gran capacidad (de 2,000 a 6,000 litros), la trituración y despizque de la cuajada coincidan con la sinéresis. De otro modo se forma una película más consistente, lo que resulta en que el queso sin madurar retenga mucho suero. (13)

Cuando la consistencia de los granos ha adquirido firmeza y la acidez es la correcta, debe dejarse de agitar y permitir que la cuajada repose en el fondo de la tina para posteriormente y con ayuda de un rastrillo de madera o de acero inoxidable, se procede a "jalar" la cuajada lentamente hacia el extremo opuesto al orificio de salida del suero de la tina.

Posteriormente se abre la llave y se deja salir el suero; al principio escurrirá rápidamente, pero al final lo hará muy lentamente.

La cuajada se deja reposando en el fondo de la tina hasta el momento de iniciar el malaxado.

La acidificación es necesaria en la elaboración del queso tipo Oaxaca, pero siempre debe recordarse que la acidez continuará subiendo; la cuajada que se trabaja primero tendrá mucho menor acidez que la última porción, sobre todo cuando se trabajan grandes volúmenes de cuajada por tina y no se dispone de varias máquinas malaxadoras y suficiente mano de obra para trabajar la cuajada oportunamente. Por ello, debe ejercerse control sobre la acidificación con objeto de disponer progresivamente y de acuerdo a la capacidad de trabajo, de cuajada en óptimas condiciones para malaxarse. (En esta fase de la elaboración también puede recurrirse a la adición de agua).

El malaxado (batido brusco de la pasta), puede iniciarse teniendo como indicadores: a) la acidez del suero, y b) el pH de la cuajada.

La acidez titulable que presenta el suero que aún es curre de la cuajada en reposo, es el indicador más común pero el menos exacto; cuando el suero que se desprende lentamente tiene una acidez de 28°D como mínimo, la pasta puede llevarse a la máquina malaxadora.

Es muy importante considerar el volumen de cuajada que se encuentra acidificando en la tina; cuando es poca puede dejarse que la acidez se incremente inclusive hasta 40°D para la última porción; cuando el volumen de cuajada es muy grande, debe vigilarse atentamente la acidificación para evitar problemas de fabricación cuando la titulación indica más de 40°D.

La descomposición de la lactosa por los estreptococos termina con un contenido de ácido láctico de 1%, mientras que los lactobacilos conservan su actividad hasta alcanzar el 4% de ácido láctico (85) o más. En la titulación con NaOH 0.1 N equivalen respectivamente al empleo de 10 ml (100 décimas = 100°D) y 40 ml (400 décimas = 400°D).

El pH de la cuajada es el indicador más preciso; la acidez confiere a la cuajada, entre rangos de pH de 5.35 a 4.9, la propiedad de estirarse, requisito indispensable para la elaboración del queso tipo Oaxaca.

No existe una relación directa entre la acidez titulable y la medida del pH; una elevada acidez titulable en el suero puede ofrecer un pH aun muy por encima del rango deseable y viceversa. (13)

La acidez desarrollada por la fermentación láctica hará descender el pH; entre los valores de 4 y 5 todos los ácidos orgánicos presentes intervienen en la valoración y sobre todo el ácido cítrico. (1)

El pH se define como la inversa del logaritmo de la concentración de iones de hidrógeno H^+ (ver más adelante) y se determina con aparatos llamados potenciómetros (o "pH-metros" que se adecúan a las distintas necesidades de las soluciones a medir y permiten un control de elaboración preciso, o bien, por medición colorimétrica, mucho más rápida, simple y menos costosa que el empleo de un potenciómetro, pero sus indicaciones son solamente aproximadas.

De cualquier modo, además de conocer la acidez del suero y el pH de la cuajada, deben probarse las propiedades elásticas de la pasta:

Prueba del "estirado"

Consiste en tomar un puñado de la cuajada de la tina, exprimirlo bien con la mano y depositarlo en un recipiente (preferentemente de acero inoxidable); se adiciona una pequeña cantidad de agua caliente (85°C aproximadamente) y con un agitador para leche o similares, se comienza a amasar; se tira el agua y se agrega un poco más para continuar amasando hasta observar que con el movimiento del agitador la pasta responde y comienza a estirarse. Cuando esto sucede debe comprobarse el grado de elasticidad y que la estructura del tejido sea reticular (al separarse las hebras de cuajada se forma un red).

Esta prueba no es otra cosa que una reproducción de lo que ocurre en la máquina malaxadora, por ello, cuando la cuajada responde a esta prueba, se encuentra lista para continuar el procedimiento de elaboración.

Elasticidad del coágulo

La elasticidad del coágulo se debe a la generación de una gran cantidad de ácido láctico en el seno de la cuajada.

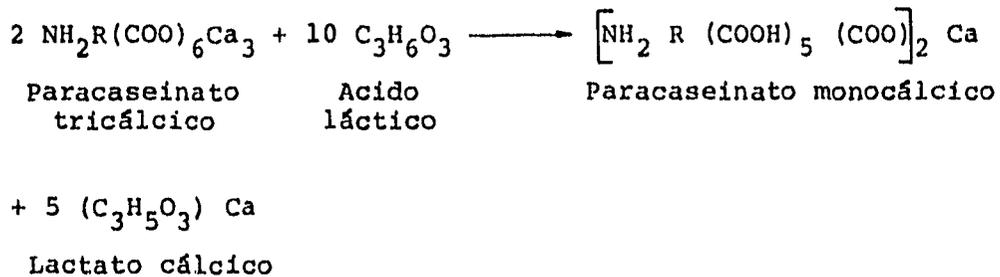
La elasticidad se hace más y más notable conforme aumenta la acidez, hasta que finalmente el coágulo puede estirarse considerablemente y al calentarse alargarse en gruesos filamentos.

Los cultivos lácticos adicionados a la leche de queso deben mantener la fermentación láctica de la cuajada todo el tiempo necesario para asegurar el pH característico en que la cuajada adquiere la propiedad de estirarse.

El ácido láctico producido transforma al paracaseinato tricálcico obtenido por el cuajo, en paracaseinato dicálcico primero, monocálcico después y finalmente paracaseína libre.

La elasticidad, en el queso tipo Oaxaca y similares, es una característica esencial; se atribuye esta cualidad de plasticidad y ductibilidad a la presencia de paracaseinato monocálcico.

La transformación del paracaseinato tricálcico en paracaseinato monocálcico se produce de acuerdo al siguiente esquema: (13)



Si la producción de ácido continúa durante mucho tiempo, la cuajada pierde mucha de su elasticidad, llegando a ponerse dura y quebradiza. Podría interpretarse por la formación de paracaseína libre ya que esta substancia no muestra las propiedades de su sal monocálcica. (8)



Malaxado. La máquina malaxadora* debe revisarse mecánicamente, lavarse muy bien y enjuagarse con agua caliente antes de llenarla con cuajada (no debe llenarse totalmente porque el movimiento encontrado de los brazos de la máquina haría caer la cuajada).

Posteriormente, se agrega agua caliente a 85°C o más (primer lavado) hasta cubrir la pasta. Se enciende la máquina y se deja en movimiento; con ayuda de una pala de madera se empuja la pasta que queda fuera de la acción mecánica. El agua se enturbia rápidamente hasta adquirir un aspecto lechoso. Se apaga la máquina y se retira el agua empleando un recipiente limpio que se introduce en la pasta varias veces. El agua no debe tirarse debido a su alto contenido graso. (El agua puede hacerse salir por el orificio que al objeto posee la máquina, pero esto retarda el proceso).

Cuando se extrae la mayor cantidad posible de la máquina, se vuelve a adicionar agua (segundo lavado) y se repi

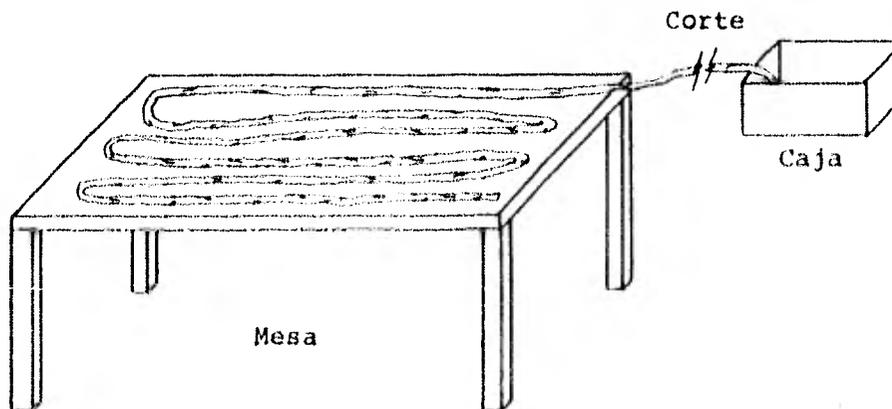
*En el presente trabajo se utilizó una máquina malaxadora marca pb. Officine fonderie pietro berto. Marano-vicensa italy, de una sola velocidad, con dos brazos móviles y tina desmontable de 35 kg.

te lo anterior separando cuidadosamente el agua para recuperar de ella la materia grasa que arrastra (ver 3.1.2.4). Conforme se lava, la pasta va adquiriendo mayor elasticidad. Después de un tercer lavado, siempre con agua a la misma temperatura, se estira la pasta para verificar su elasticidad y su aspecto (debe brillar).

Posteriormente, se extrae la pasta de la máquina y se coloca en una caja de madera rectangular perfectamente limpia y bañada o sumergida en agua hirviendo, unos segundos antes de depositar en ella la cuajada. Una vez que la pasta está en la caja, se extiende y aplana manualmente hasta lograr una superficie uniforme.

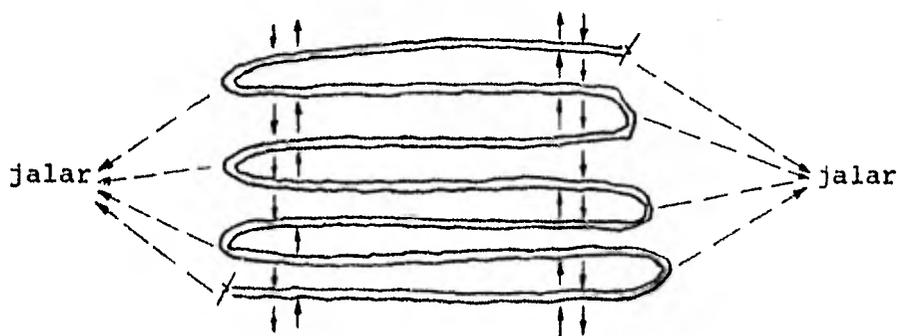
Después, con ayuda de un cuchillo, se corta longitudinalmente una porción (1/3 aproximadamente), se saca cuidadosamente de la caja y entre dos personas, cada una con un extremo de la pasta, comienzan a estirla. La longitud promedio debe ser cuatro a cinco veces la inicial como máximo. Después se deposita la cuajada en la caja y se comienza nuevamente a estirar por un extremo; la longitud puede ser tanta como gruesa se desee la tira de cuajada.

Al tiempo de estirar, la tira se va colocando longitudinalmente en la superficie de una mesa (de acero inoxidable o de madera perfectamente limpia y esterilizada con agua hirviendo), según el siguiente esquema:



Quando toda la superficie de la mesa se ha cubierto, las personas que poseen los extremos, toman también entre las manos las curvas en que la cuajada invierte el sentido y

aplican un fuerte estirón para uniformizar la longitud de los extremos y terminar de estirar.



3.1.9.3 Enfriado

Después, cada persona con los extremos, sumerge la pasta estirada en un tanque o recipiente que contenga agua pasteurizada fría, donde permanece varios minutos hasta el momento de cortar y pesar.

Este inciso puede suprimirse o realizarse al final con la refrigeración del producto; sin embargo, cuando el queso permanece en el agua fría algunos instantes mejora su consistencia al adquirir firmeza.

3.1.9.4 Pesado

Esta operación es sumamente delicada y debe realizarse cuidadosamente.

Los quesos cuya cuajada desuera abundantemente casi siempre presentan problemas para obtener un producto final con el peso adecuado y especificado en el envase.

En el caso del queso tipo Oaxaca, las tiras de cuajada que se sacan del agua han perdido ya la mayor parte de humedad. Sin embargo, el peso extra debe calcularse considerando que la sal hace salir todavía un poco de agua (suero) antes de envasarlo.

Las tiras de queso se colocan sobre la superficie de una báscula perfectamente calibrada y se ajustan al peso que debe tener el producto terminado más una pequeña cantidad adicional en gramos que corresponde al suero que aún desprenda.

Las tiras de queso se cortan con un cuchillo y pasan a salarse.

3.1.9.5 Salado

Salvo raras excepciones, prácticamente se añade cloruro de sodio a todas las variedades de queso en alguna de las etapas de su fabricación. (8)

El método de salar y la cantidad de sal dependen principalmente de la especie y tipo de queso; influyen sobre sus propiedades, aspecto, textura, etc.

Existen varias formas de salar: en seco, en salmuera (agua con sal), sobre los granos de cuajada, salado de la leche antes de su proceso de transformación, etc.

En el caso del queso Oaxaca, la salazón se realiza una sola vez y por contacto sobre la superficie de las tiras, con sal seca (cristalizada) de grano fino, justo antes de envasar el producto.

En términos generales, el salado tiene los siguientes efectos principales:

- a) Orienta y favorece el desarrollo microbiano, o bien, lo inhibe, contribuyendo a la conservación del queso

La protección contra los microorganismos indeseables es mucho más necesaria cuanto más húmedo sea el queso; (1) el cloruro de sodio protege a ciertas clases de queso contra la formación de un moho, el Geotrichum candidum, poderoso agente proteolítico y lipolítico, pero ejerce sólo una influencia moderada contra las bacterias de la putrefacción y del género Penicillia. La sal ejerce una acción selectiva, por ejemplo, el Streptococcus lactis se desarrolla a 4% de NaCl en la humedad, pero no a 6.5%, y el Streptococcus cremoris no se desarrolla en medios con 4% o más de NaCl (ver 2.8.3.1.1).

Para poder comprender la acción de la sal como elemento inhibidor del desarrollo de las bacterias, se debe relacionar el contenido de sal del queso con su humedad. (28)

En realidad, la sal en el queso se encuentra disuelta en el agua retenida en el producto.

Las bacterias necesitan agua para desarrollarse pero la afinidad de la sal por el agua actúa como agente del control microbiano, especialmente cuando ésta actúa en conjunto con la acidez.

- b) Favorece el desuerado, con lo que se regula la humedad y la acidez del queso y se influye sobre la textura final del producto

El salado complementa el desuerado debido a una contracción de la cuajada y a una disminución del grado de hidratación de las proteínas (la sal es muy higroscópica).

Durante la salazón, la sal penetra por ósmosis primero en una capa superficial de las partículas de cuajada del queso (0.5 a 1 cm de espesor) y después, poco a poco, se va difundiendo en forma homogénea en el queso. (28)

Durante la salazón del queso el producto puede perder normalmente unos 2 a 4.5% de su peso según el tamaño y formato, al mismo tiempo que también pierde algo de ácido láctico.

- c) Revela el sabor del queso

El salado le imparte cualidades de sabor que lo hacen más apetecible y están en correlación con los efectos anteriores.

- d) Contribuye a la formación de la corteza y por ende a la conservación del producto.

Quando se realiza en seco, el cloruro de sodio que recubre la superficie de los quesos absorbe una cierta cantidad de agua que proviene no solamente de las capas superficiales sino también del interior del queso, la migración se produce por capilaridad. Aunado a la evaporación atmosférica, esta absorción de agua es el origen de la formación de la corteza superficial y de la deshidratación parcial de la pasta, favorecida de cualquier modo por una cierta contrac-

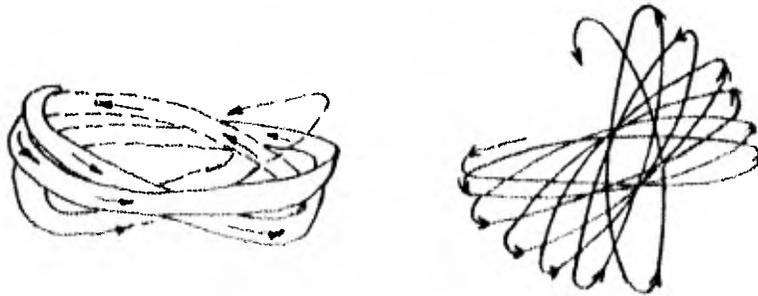
ción de las proteínas como resultado de la disminución muy marcada de su grado de hidratación. (89)

- e) Aumenta ligeramente la solubilidad de las proteínas del queso fresco. (1)

3.1.9.6 Trenzado

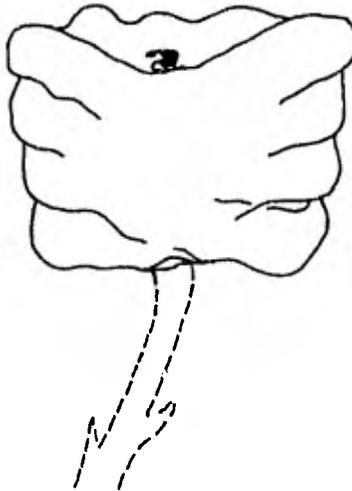
La forma de enredar o trenzar la tira de queso para su presentación comercial es la característica más conocida y artesanal del queso tipo Oaxaca; las hebras de queso pueden enredarse en forma de "rosa", que es la más común y atractiva.

Por tratarse de una forma obtenida por habilidad manual es muy difícil describirla: el extremo de una tira de queso de grosor deseado, previamente pesada y salada comienza a enredarse de tal forma que la porción que se enreda sigue a la anterior por uno de sus lados, media circunferencia, la atraviesa y la sigue por el otro lado el resto de la circunferencia. La descripción gráfica podría ser la siguiente:



Podemos decir que se completan dos rotaciones; una circunferencia que a su vez va girando sobre un mismo eje.

Conforme aumenta de volumen va tomando una forma que "semeja una rosa"; el extremo final se atora debajo de uno de los dobleces anteriores y queda listo para envasarse:



3.1.9.7 Envasado

Tan pronto se termina de enrollar, el queso se coloca en una bolsa de plástico o en una envoltura de material especial (película cry-o-vac).

Debe envasarse al vacío para evitar contaminación, pérdida de humedad, oxidación y favorecer la conservación del producto el mayor tiempo posible.* La adhesión de la envoltura se logra utilizando agua caliente en donde se sumerge unos segundos el producto envasado.

El queso Oaxaca es un queso sin corteza y las bolsas de plástico impiden que se forme.

3.1.9.8 Refrigeración

Cuando el queso no se consume de inmediato, debe refrigerarse para alargar su periodo de conservación así como

*En el presente trabajo se utilizó una empacadora al vacío marca Tipper tie Div. Rheem MFC-Co. Capacidad: 6 quesos por minuto. Consta de bomba de vacío, navajas, baja-grapas, trompilla de succión de aire, plancha para sostener el producto y complementada por un compresor de aire.

para mantener sus propiedades, en refrigeradores o bodegas destinadas a contener la producción de varios días a la temperatura de 6 a 8°C.

El cuidado y el manejo de los quesos en bodega es la última fase de la fabricación y no debe perjudicar los cuidados y el esmero de las fases anteriores.

3.1.9.9 pH (Anexo)

La ionización del agua ($H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$) a temperatura ambiente proporciona una concentración de iones de hidrógeno (H^+) de sólo 1×10^{-7} mol/litro (y la misma concentración de iones de hidróxido). Comúnmente, las concentraciones traza, tales como esa, se desdeñaban; pero los químicos y los fisiólogos han descubierto que las concentraciones de iones de hidrógeno de este nivel de magnitud e incluso menores, son extremadamente importantes debido, en parte, a que esos iones actúan como catalizadores para muchas reacciones. En los cuerpos vivos, afectan las actividades catalizadoras de las enzimas. Los catalizadores (...) pueden ejercer su influencia en concentraciones muy pequeñas. (26)

Debido a la importancia de las concentraciones traza de iones de hidrógeno e hidróxido, los químicos y los tecnólogos toman rutinariamente cientos y miles de medidas, de dichas concentraciones. Debido a la manipulación de cifras tan extrañas como los exponentes negativos (v. gr.: 10^{-7}) o sus equivalentes decimales (v. gr.: 0.0000001), resulta tedioso; los químicos adoptaron desde hace tiempo una simplificación. En lugar de la cifra entera con su exponente negativo, utilizan sólo este último sin el signo negativo. Este exponente se define como el pH de la solución. (26) Matemáticamente:

$$[H^+] = 1 \times 10^{-pH} \quad (\text{Ecuación de definición para el pH})$$

Esta ecuación que define al pH está seriamente limitada en su aplicación a situaciones para las que el número que se encuentra antes del 10 es precisamente la unidad y no otro número cualquiera. Si $H^+ = 2 \times 10^{-6}$ M no podrá utilizarse la ecuación anterior tal y como la escribimos; definitivamente, el pH de esta ecuación no es 6. Para resolver este problema común, se reconstruye la ecuación anterior para formar otra alternativa de definición del pH.

$$pH = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log [H^+]$$

Cuando H^+ sobrepasa 10^{-7} moles/litro, la solución es ácida, esto significa los valores de pH inferiores a 7 corresponden a soluciones ácidas. Las soluciones básicas tienen valores de pH mayores que 7, a la temperatura ambiente. (26)

3.2 PROCEDIMIENTO RUSTICO

3.2.1 Introducción

La descripción de la elaboración artesanal o empírica del queso tipo Oaxaca, se facilita mucho después de la descripción industrial o científica, en donde (aunque brevemente) se expusieron los conceptos básicos que permiten comprender el proceso y los mecanismos que se emplean en el control de sus distintas fases. Además, la descripción anterior nos evita ser repetitivos en muchos aspectos, pues finalmente los dos procedimientos de elaboración deben llegar al mismo producto: Queso Oaxaca.

Existen, no obstante, diferencias muy marcadas y de gran importancia entre los dos procedimientos; el empleo de leche bronca en el procedimiento rústico es tal vez la más relevante y de mayores consecuencias pues modifica o suprime algunas fases de la elaboración industrial y constituye siempre un riesgo de salud.

Debe procurarse que la leche provenga de vacas sanas y se obtenga en las mejores condiciones posibles de higiene.

La recepción de la leche se realiza en el mismo lugar de trabajo, en recipientes o botes de capacidad variable.

La evaluación depende por lo general de factores meramente subjetivos; la experiencia del quesero o de la persona que recibe la leche puede revelar características perjudiciales en cuanto a su sabor, olor, color, etc. Conocer la honestidad del proveedor y el ganado productor de la leche que llega a la recepción, son datos muy útiles para la evaluación.

La acidez desarrollada no tiene la importancia que reviste en el procedimiento industrial, pero constituye un magnífico indicador de la manipulación que se ha dado a la leche.

El material que se describe a continuación es el que se utilizó en el presente trabajo por considerarse el mínimo indispensable para obtener un producto de características muy semejantes al obtenido por el procedimiento industrial. De cualquier forma, mientras más material, reactivos, equipo, etc. se utilicen en la fabricación, la tecnología gana en eficiencia y el queso en calidad.

3.2.2 Aparatos y Equipo

- . Recipiente limpio, de paredes lisas, de fácil lavado y de volumen adecuado a la cantidad de leche que se va a trabajar
- . Mantas de algodón (para la filtración)
- . Agitador de acero inoxidable
- . Termómetro de 100°C
- . Liras o cuchillas para cortar la cuajada
- . Palas para remover y estirar la cuajada
- . Mesas de recubierta lavable de aproximadamente 2 a 3 m de largo por 1 m de ancho
- . Recipiente para contener agua fría de dimensiones variables
- . Báscula
- . Bolsas de plástico
- . Fuente de calor para calentar agua a aproximadamente 92°C

3.2.3 Materiales y Reactivos para la Determinación de Acidez

- . Bureta automática graduada en 0.1 ml
- . Pipeta volumétrica de 9 ml
- . Vaso de precipitado de aproximadamente 50 ml o cualquier frasco limpio de vidrio transparente
- . Hidróxido de sodio al 0.1 N (ver 2.8.5.2)
- . Indicador de fenolftaleína. Solución alcohólica al 2%

3.2.4 Aditivos

- . Cuajo. Fuerza 1:10,000 (véase 3.1.8.5.2.4. Apéndice A)
- . Cloruro de sodio NaCl (sal común yodatada)

3.2.5 Otros

- . Detergentes
- . Desinfectantes (yodo, hipoclorito)

3.2.6 Procedimiento

Con fines meramente prácticos y de comparación, seguiremos los incisos principales de la descripción anterior:

3.2.6.1 Depuración de la leche

Consiste en la filtración de la leche cruda a través de una manta de tela (algodón), la cual debe cambiarse con frecuencia o lavarse y sumergirse en agua hirviendo, antes, durante y después de usarse.

Esta operación se realiza en el momento de vaciar la leche del recibo, en la tina o recipiente en que se elabora el queso.

3.2.6.2 Estandarización de la leche

Para estandarizar una leche es necesario conocer su composición, principalmente su contenido graso y disponer de los medios adecuados para remover o agregar grasa y ajustar así el porcentaje necesario para elaborar queso tipo Oaxaca (leche estandarizada con 27.5 g por litro; ver 3.1.2.4). Esto no es factible en la elaboración rústica.

Cuando se recibe leche muy rica en grasa, sea por el ganado productor, la época del año, la honestidad del proveedor y el precio convenido, puede practicarse el descremado natural o espontáneo.

Desnatado espontáneo

Esta forma de desnatado, la única conocida hasta 1880, es muy imperfecta. En las mejores condiciones, es decir a una temperatura de 7 a 8°, favorable a la formación de

racimos voluminosos de glóbulos grasos y tras un reposo prolongado (24 horas) no puede separarse más del 85% de materia grasa; la leche desnatada contiene aún 5 g/litro.

Se extiende la leche en capa fina, en un recipiente de amplia superficie, y se deja en reposo completo y a temperatura fría. En verano, es difícil mantener una temperatura suficientemente baja, entonces se desarrolla la flora láctica y la leche se acidifica. El desnatado espontáneo no se practica más que en pequeñas granjas y en algunas queserías donde se desnata la leche de la tarde tras "maduración". (1)

Como se desconoce la cantidad de crema que se extrae y el porcentaje graso que queda en la leche, este procedimiento es, por demás, empírico. Lo común es que se extraiga únicamente la crema de la leche que queda en reposo durante la noche (ver más adelante).

Una leche caliente o calentada tendrá dificultades para desnatarse espontáneamente en una proporción adecuada (el calor inactiva las aglutininas de los glóbulos grasos de la leche calentada).

Dadas las exigencias en materia grasa para elaborar queso tipo Oaxaca, el desnatado espontáneo no es recomendable, primero porque se desconoce la cantidad de grasa de la leche que se recibe y por lo tanto la que es necesario sustraer, en segundo lugar, puede separarse mayor cantidad de la necesaria y además los grumos que se forman no pueden reincorporarse correctamente en la leche de elaboración.

3.2.6.3 Maduración de la leche

Después de filtrarla, la leche se agita lentamente en el recipiente de elaboración para uniformizar su composición (especialmente si el volumen se forma con partidas de leche diferentes) y cuando se considera homogénea, se determina la acidez titulable (ver 2.8.4).

La leche debe acidificarse por acción de la microflora propia de la leche hasta 22°D para proceder a cuajarla.

Se acostumbra, para acelerar la acidificación, agregarle un poco de leche o suero del día anterior mantenido a temperatura ambiente. La leche que se adiciona presenta, por lo general, grumos de coagulación.

La acidificación espontánea de la leche es el hecho más comunmente observado cuando ésta se conserva a temperatura ambiente. La acidez se eleva muy lentamente al principio, luego, tras algunas horas (según la temperatura), muy rápidamente; en general, la acidificación se frena un poco cuando el contenido en ácido láctico llega al 1%. En este momento, solamente 1/4 de la lactosa ha sido degradada; esta detención se debe al efecto inhibitor del ácido sobre las bacterias. Antes de llegar al 1% de ácido, aproximadamente hacia el 0.6% se coagula la leche, en lenguaje corriente "se corta". El ácido ha roto el equilibrio entre el estado coloidal y la solución, teniendo como consecuencia primera la insolubilización de la caseína. (1)

Como en todas las reacciones bioquímicas, se forman pequeñas cantidades de subproductos junto al producto principal de la fermentación. En general, por cada 100 partes de lactosa transformada, se obtienen 96 de ácido láctico y 5 de subproductos diversos (CO₂, ácido butírico, acetil-metil-carbinol, etc.). Algunos de estos productos presentan un olor fuerte. (1)

La leche de fabricación debe poseer una microflora láctica activa precisamente en el momento en que va a formar se la cuajada. La maduración de la leche se lleva a cabo durante el tiempo en que ésta permanece en reposo y se acidifica.

La acidez retrasa y luego detiene el crecimiento microbiano; también puede destruir gradualmente ciertos gérmenes. El Salmonella typhi no resiste habitualmente los medios ácidos, pero pueden aparecer cepas más tolerantes. En general la acción destructora de la acidez es lenta.

En el caso de los bacilos de Koch (tuberculosis) y brucelas, el grado de acidificación no tiene influencia; el número de gérmenes va disminuyendo, pero el saneamiento no es jamás completo al final de la maduración. (1) Aunque esto se obtuvo de una investigación sobre un queso de pasta blanda, el resultado puede generalizarse para todos los quesos que aunque la acidez se eleva durante la fabricación, son elaborados con leche bronca o insuficientemente pasteurizada.

Acidez de la leche

La cantidad de leche o suero del día anterior que se

adiciona a la leche del recibo, depende de varios factores, entre ellos, el volumen de leche que se va a transformar, la velocidad de acidificación deseada, la acidez que alcanza la leche o suero después de varias horas de almacenamiento, la época del año (en tiempos o lugares muy calurosos la acidificación es muy intensa), etc.

Puede añadirse un 10% o bien calcularse la cantidad dependiendo de la acidez de los líquidos de mezcla.

EJEMPLO: Se reciben 400 litros de leche para la elaboración de queso, se separan 40 litros para el día siguiente y después de filtrar y mezclar bien los 360 litros de leche restantes, se determina una acidez titulable de 18°D.

La leche ácida (40 litros guardados del día anterior) puede tener una acidez de 60°D, por ejemplo.

Si un grado Dornic equivale a 0.1 g/lt de ácido láctico (ver 2.8.4), se tiene el siguiente total:

400 lt (del recibo)	con	0.18	=	72
- 40 lt que se guardan		0.18	=	7.2
	para el siguiente día			
<hr/>				
= 360 lt con		0.18	=	64.8
+ 40 lt que se adicionan		del día anterior	0.60	= 24.0
<hr/>				
= 400 lt con			=	88.8 g ácido láctico

La leche debe cuajarse cuando alcanza 22°D, lo que quiere decir que se requieren $400 \times 0.22 = 88$ g de ácido láctico, no 88.8, por lo que no deben agregarse los 40 litros de leche (o suero), sino sólo una parte.

Si la leche del recibo proporciona 64.8 g y se requieren 88, hay un faltante de 23.2 g/lt. La cantidad de leche o suero que se debe adicionar se calcula por regla de tres;

Si 40 litros de leche ácida proporcionan 24.0 g de ácido láctico, ¿cuántos litros proporcionan 23.2 g?
 $X = 38.6$ litros.

Es recomendable que la acidez no se ajuste con exac-

titud, sino un poco abajo de lo requerido para dar tiempo a que las bacterias se activen (adaptación) y puedan contribuir a la acidificación posterior que se requiere en el malaxado.

Este procedimiento para ajustar la acidez no es del todo exacto, porque los cálculos se realizan en base a 400 litros, pero los gramos de ácido láctico pueden quedar en un volumen menor ($400 \text{ lt} \times 0.22 = 88 \text{ g}$; en este caso, los 88 g se encuentran en sólo 398.6 litros).

Otros métodos matemáticos de cálculo más precisos no son de empleo común.

La práctica de adicionar leche o suero ácido puede tener inconvenientes en el caso de que la acidez se vuelva incontrolable cuando el número de bacterias activas adicionadas comienzan una rápida proliferación. Por otro lado, la adición de una leche demasiado ácida ya no contiene muchas bacterias activas y la acidez de la leche de elaboración no es un indicador de la actividad biológica; la adición de suero puede presentar otros inconvenientes porque las características de la leche pueden modificarse y consecuentemente habrá repercusión en la calidad del queso.

3.2.6.4 Coagulación de la leche

La leche bronca puede coagular perfectamente sin adicionar cloruro de calcio; si se desea un coágulo más consistente, puede adicionarse CaCl_2 para contrarrestar los posibles efectos de la acidez, en la misma proporción indicada para el procedimiento industrial (0.01%); otro tanto ocurre con la adición de colorante.

El cuajo se adiciona en las mismas condiciones descritas para el procedimiento industrial; la leche se agita brevemente para distribuir bien la enzima y después se deja reposar hasta la coagulación (3.1.8.5.2.4).

3.2.6.5 Tratamiento y manipulación de la cuajada

Corte de la cuajada

Cuando se presentan los signos de la coagulación (ver 3.1.8.5.2.4), la cuajada se corta con ayuda de las li-

ras o cuchillas en pequeños fragmentos no menores al tamaño de un grano de maíz, pero tampoco muy grandes (ver 3.1.9.1.1.1).

La determinación de la acidez del suero mostrará un descenso muy acentuado comparativamente con la acidez de la leche antes de coagular (ver 3.1.9.2).

Después de cortar puede practicarse un desuerado de unos pocos litros de suero (10%), en prevención de la necesidad de agregar agua; si las dimensiones del recipiente permiten albergar el agua adicional, no es necesario desuerar.

La cuajada cortada debe agitarse lentamente al principio para que los granos vayan desprendiendo el suero y adquieran la consistencia deseada (ver 3.1.9.1.1.2).

Desuerado

Cuando la acidez del suero alcanza 20°D puede desuerrarse la cuajada, dejando salir el suero por el orificio inferior que debe tener el recipiente o extrayendo el suero por otro procedimiento.

La cuajada se deja reposar en el recipiente y se determina periódicamente la acidez del suero.

Malaxado (ver 3.1.9.2)

Cuando el suero que termina de escurrir lentamente de la cuajada en reposo alcanza un mínimo de 28°D, se debe realizar la prueba del estirado (ver 3.1.9.2). Si la prueba resulta positiva puede procederse a agitar bruscamente con las palas una parte de la cuajada (malaxado) en el mismo recipiente o en otro destinado para ello, adicionando agua caliente (92°C aproximadamente) en cantidad necesaria para cubrir la pasta que se agita. Debe practicarse el número de lavados necesarios conforme se indicó anteriormente para que la pasta adquiriera una elasticidad que permita estirla sin que se rompa.

Cuando se logra lo anterior, las tiras de queso se colocan sobre la mesa de recubierta lavable para uniformizar su grosor y darles un último estirón, según se indicó en 3.1.9.2. Después se sumergen en un recipiente con agua fría y limpia hasta el momento de pesarse (ver 3.1.9.3).

Las operaciones siguientes del tratamiento y manipulación de la cuajada, son prácticamente iguales a las descritas en el procedimiento industrial. El pesado (véase 3.1.9.4) debe realizarse cuidadosamente; el salado (ver 3.1.9.5), no debe ser excesivo y la sal empleada debe estar finamente molida para que pueda adherirse a las tiras de queso.

El trenzado, que es probablemente la parte insuperable del procedimiento rústico, se describe someramente en 3.1.9.6.

Después de adquirir la forma característica de presentación, el producto debe envasarse en bolsas de plástico perfectamente limpias que deben cerrarse para evitar toda posible contaminación cuando se transporta y/o expone el producto a la venta.

IV. CONTROL DE CALIDAD

Contenido

- 4.1 Especificaciones físicas y químicas
 - 4.1.1 Determinación de humedad
 - 4.1.1.1 Introducción
 - 4.1.1.2 Aparatos y equipo
 - 4.1.1.3 Procedimiento
 - 4.1.1.4 Cálculos
 - 4.1.2 Determinación de sólidos totales
 - 4.1.2.1 Aparatos y equipo
 - 4.1.2.2 Procedimiento
 - 4.1.2.3 Cálculo y resultados
 - 4.1.3 Determinación de cenizas
 - 4.1.3.1 Introducción
 - 4.1.3.2 Aparatos y equipo
 - 4.1.3.3 Procedimiento
 - 4.1.3.4 Cálculos
 - 4.1.4 Determinación de proteínas
 - 4.1.4.1 Introducción
 - 4.1.4.2 Aparatos y equipo
 - 4.1.4.3 Materiales y reactivos
 - 4.1.4.4 Procedimiento
 - 4.1.4.5 Cálculos y resultados
 - 4.1.5 Determinación de grasa
 - 4.1.5.1 Introducción
 - 4.1.5.2 Aparatos y equipo
 - 4.1.5.3 Procedimiento
 - 4.1.5.4 Cálculos y resultados
 - 4.1.6 Determinación de pH
 - 4.1.6.1 Aparatos y equipo
 - 4.1.6.2 Materiales y reactivos
 - 4.1.6.3 Procedimiento
 - 4.1.7 Determinación de fosfatasa
 - 4.1.7.1 Introducción
 - 4.1.7.2 Prueba cualitativa
 - 4.1.7.2.1 Aparatos y equipo

- 4.1.7.2.2 Materiales y reactivos
- 4.1.7.2.3 Procedimiento
- 4.1.7.2.4 Resultado

4.2 Especificaciones microbiológicas

4.2.1 Cuenta de organismos coliformes

- 4.2.1.1 Introducción
- 4.2.1.2 Aparatos y equipo
- 4.2.1.3 Materiales, reactivos y medio de cultivo
- 4.2.1.4 Procedimiento

4.2.2 Cuenta de organismos coliformes fecales

- 4.2.2.1 Introducción
- 4.2.2.2 Aparatos y equipo
- 4.2.2.3 Materiales y reactivos
- 4.2.2.4 Medios de cultivo
- 4.2.2.5 Procedimiento
- 4.2.2.6 Cálculos y resultados

4.2.3 Investigación de Salmonella

- 4.2.3.1 Introducción
- 4.2.3.2 Aparatos y equipo
- 4.2.3.3 Materiales y reactivos
- 4.2.3.4 Medios de cultivo
- 4.2.3.5 Procedimiento

4.2.4 Determinación de cuenta de estafilococo áureo coagulasa positivo. Método de Baird-Parker

- 4.2.4.1 Introducción
- 4.2.4.2 Aparatos y equipo
- 4.2.4.3 Materiales, reactivos, soluciones
- 4.2.4.4 Medios de cultivo
- 4.2.4.5 Procedimiento
- 4.2.4.6 Cálculos y resultados

4.2.5 Conteo de hongos y levaduras

- 4.2.5.1 Introducción
- 4.2.5.2 Aparatos y equipo
- 4.2.5.3 Medio de cultivo
- 4.2.5.4 Materiales y reactivos
- 4.2.5.5 Procedimiento
- 4.2.5.6 Cálculos y resultados

Obtener un producto de calidad óptima debe considerarse inherente al procedimiento de fabricación.

La calidad siempre es distinción, en cualquier caso que se considere. En los alimentos y particularmente en el queso, la oferta de calidad debe ser cada vez mejor. Cuando los consumidores la reconocen y valoran, la preferencia del producto está asegurada.

El Control de Calidad implica el conocimiento de varios aspectos de diversa complejidad, por lo que hemos preferido seguir a Compariré Fernández (8) en su exposición "Generalidades sobre Control de Calidad":

Consideraciones previas

Los factores de calidad ocupan un lugar preeminente y decisivo para la buena comercialización de cualquier producto (...). Hay que pensar que la raíz de todo mercado es la calidad, tanto más cuanto más desarrollado está el país, puesto que para abrir mercado en un país muy desarrollado, no basta conocer los mercados, los gustos y preferencias del consumidor, la relación entre la oferta y la demanda, sino que es fundamental pensar con mayor confianza en el éxito de la oferta de un producto basada en su calidad. Cuando un nuevo producto que se presenta en el mercado no hace más que mantener la calidad al nivel de otros semejantes ya existentes, tiene enfrente una competencia fuerte. Si trata de competir mediante una calidad inferior, baja o mediocre, se encuentra en contra de la exigencia del consumidor ya habituado a otro nivel de calidad superior. "Tan sólo en los países muy poco desarrollados es posible mantener coyunturalmente una calidad mediana".

Por tanto, al plantear un proceso de fabricación, la premisa fundamental a tener en cuenta es la obtención de un producto de alta calidad, igual o más elevada que la de otros productos existentes en la competencia.

Si esto es válido para cualquier fabricante de cualquier producto, es mucho más evidente cuando se trata de productos alimenticios para consumo humano y muy particularmen-

te en los productos lácteos, ya que su aceptación y consumo dependen mucho más estrechamente de la calidad final y de que la misma se mantenga homogénea y uniforme en las partidas y en el tiempo. (8)

Definición y concepto de calidad

La Real Academia de la Lengua define la calidad como "conjunto de cualidades que constituye la manera de ser de una persona o cosa".

Hablar de calidad de un alimento es siempre un problema, por tratarse de un concepto basado en apreciaciones subjetivas, tales como "el gusto del consumidor", que no se refiere sólo al sabor, sino al hábito, deseo, exigencia, moda, aprecio, etc., de las personas que van a consumirlo. No obstante, podemos intentar sistematizar este concepto, si admitimos que un producto tendrá más calidad para un consumidor, cuantas más cualidades del mismo le impresionen favorablemente. Las cualidades que pueden impresionar al consumidor pueden ser intrínsecas, debidas al producto en sí, o extrínsecas, debidas a la presentación y otros factores. (8)

La percepción por el consumidor de estos factores o cualidades del producto, tanto intrínsecos como extrínsecos, se realiza mediante el examen organoléptico del producto, es decir, por la aplicación de los órganos de los sentidos (vista, olfato, gusto, tacto e inclusive el oído), que relacionan al individuo con el mundo que le rodea. Indudablemente, algunos componentes de la razón pueden sumarse, pero no a la percepción, sino a la apreciación (composición, marca, etc.).

Es preciso tener en cuenta que esta percepción organoléptica, sobre todo de los factores intrínsecos, debe efectuarse por cata o prueba y es así enteramente subjetiva, dependiendo su apreciación y estimación de la persona que la realiza e incluso de las circunstancias que le rodean o le afectan en un momento determinado. A la dificultad del carácter subjetivo de la cata, se une la de la descripción o valoración de las impresiones recibidas y la imposibilidad o, al menos, la dificultad de la medición de un gusto, un olor, un tacto, un aspecto o color, o un sonido.

Téngase también presente el hecho de que no basta para apreciar la calidad de un producto un puro análisis químico o de otro tipo. Hay un error de conceptos, frecuente, al confundir calidad con la composición o análisis. De dos productos con idéntica composición analítica, uno puede ser

bien aceptado por el consumidor y el otro rechazado. Así, quede bien claro que la calidad no es necesariamente el reflejo de la composición, sino que es necesaria una calidad alimentaria o bromatológica que puede definirse como el "impacto" favorable que el producto causa en el consumidor. (8)

El examen de los caracteres organolépticos comprende principalmente las apreciaciones de olor, gusto, color, aspecto y textura. Siendo este examen subjetivo, como hemos dicho, se han hecho numerosos trabajos teniendo como objetivo tratar de reemplazar esta prueba sensorial por determinaciones químicas o mediciones físicas. En lo que concierne al aspecto y a la textura, el empleo de escalas de coloración y de aparatos de medida reológicas pueden permitir el juzgar los productos objetivamente. Pero el olor y el gusto o sabor, resultan de la presencia de componentes tan numerosos, complejos y varios, que a pesar de los adelantos científicos realizados, es todavía indispensable, en el estado actual de los conocimientos, servirse del examen de los caracteres organolépticos, mediante expertos degustadores, para apreciar la calidad y descubrir los defectos de los alimentos en cuanto a su calidad. (8)

No obstante, la frontera es difícil de establecer, ya que si bien en la apreciación o cata de un producto alimenticio no cuenta la técnica del análisis, puesto que los únicos instrumentos que se emplean son los órganos de los sentidos, en la realización práctica del control de calidad y de las técnicas industriales para mejorarla, las determinaciones químicas, físicas y bacteriológicas son medios de gran valor, lo que no debe ser confundido. (8)

En cualquier caso, la calidad implica ausencia de:

(8)

- . Defectos
- . Alteraciones
- . Adulteraciones y fraudes

El Control de Calidad, en nuestro caso, no abarca únicamente al producto terminado, como pudiera sugerir el orden de exposición. El Control de Calidad, según hemos deseado comunicar con insistencia, abarca la totalidad del proceso de fabricación e inclusive su alcance puede comprender áreas fuera de la planta elaboradora de quesos (ver: Evaluación de la Leche).

El control del producto final es únicamente el último eslabón, y permite, mediante el establecimiento de las es

pecificaciones y características del producto, sentar las bases para la tipificación y estandarización de las técnicas de elaboración del queso Oaxaca.

4.1 ESPECIFICACIONES FISICAS Y QUIMICAS

Las pruebas que pueden hacerse a un queso, como a la leche, son múltiples y tan variadas como se desee. Las determinaciones físicas y químicas que se enumeran a continuación se consideran satisfactorias desde el punto de vista de exigencia legal y reveladoras de la composición principal del producto que se ofrece al consumidor.

4.1.1 Determinación de Humedad

4.1.1.1 Introducción

Humedad es la pérdida en peso que sufre un alimento al calentarlo a una temperatura no más alta que la de ebullición del agua. Generalmente se considera que esta pérdida corresponde al agua, pero actualmente se sabe que ésta es la pérdida total de materia volátil, expulsada a la temperatura utilizada en el ensayo. (83)

4.1.1.2 Aparatos y equipo

- . Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- . Espátula
- . Horno o estufa con termostato que pueda regularse desde 50 hasta 100°C
- . Cápsulas de porcelana o cristalizadores de vidrio de 5 a 10 cm de diámetro
- . Desecador de vidrio con un desecante efectivo (puede emplearse sílica gel con colorante)
- . Pinzas para crisol
- . Gasa

4.1.1.3 Procedimiento

La determinación debe hacerse por duplicado.

En un cristalizador a peso constante y que contenga en el fondo una cama de gasa, pesar de 2 a 4 g de queso distribuyéndolo uniformemente. Colocar la cápsula o cristalizador en la estufa a 95°C durante cuatro horas (83) o a 80°C durante cuatro horas.

Transferir el cristalizador al interior del desecador hasta que éste alcance la temperatura ambiente (de 15 a 30 min).

Pesar el cristalizador con la materia desecada.

4.1.1.4 Cálculos (63, 83)

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P - P_1}{P_2} \times 100$$

en donde:

- p = peso de la cápsula con la muestra húmeda
- p₁ = peso de la cápsula con la muestra seca, en g
- p₂ = peso de la muestra en g

Reproducibilidad: la diferencia máxima permisible entre dos determinaciones de la misma muestra, no debe ser mayor de 0.1%; en caso contrario se debe repetir la determinación.

4.1.2 Determinación de Sólidos Totales

4.1.2.1 Aparatos y equipo

- . Balanza analítica granataria con sensibilidad de 0.1 g
- . Desecador con cloruro de calcio (CaCl₂) (72) u otro desecante efectivo
- . Estufa u horno con regulador de temperatura
- . Baño maría
- . Pinzas para crisol
- . Cápsulas de platino o porcelana de fondo plano de 5 a 10 cm de diámetro
- . Cánula o cañuela y espátula
- . Agua destilada

4.1.2.2 Procedimiento

La prueba debe hacerse por duplicado.

Por medio de la cánula se toma la muestra del centro y orillas de la pieza, de esta muestra se toman las cantidades necesarias para el análisis. (72)

En la cápsula previamente tarada se pesan 5.1 g exactamente de queso triturado; se agregan 5 ml de agua destilada, se mezclan perfectamente y se pesa nuevamente la cápsula; se evapora el agua a baño maría durante 10 a 15 minutos y se mete en la estufa a 90-93°C durante tres horas. Se saca de la estufa y se pasa al desecador y se pesa hasta obtener peso constante. (72)

4.1.2.3 Cálculos y resultados

El contenido de sólidos totales se calcula por medio de la siguiente expresión:

$$\% \text{ ST} = \frac{P_1 - P_2}{M} \times 100$$

donde:

ST = contenido de sólidos totales en porcentaje
 P₁ = peso en gramos de la cápsula más muestra y agua
 P₂ = peso en gramos de la cápsula más residuo seco
 M = peso de la muestra en gramos

La diferencia máxima permisible para la determinación efectuada por duplicado, no deberá ser mayor de 0.1%, en caso contrario se debe repetir la determinación.

Otro procedimiento es el siguiente: (44)

Poner en una cápsula aproximadamente 20 g de arena de mar purificada con ácido clorhídrico, lavada y calcinada.

Dejar enfriar y pesar.

Pesar 3 g de queso y mezclar perfectamente con la arena.

Secar en la estufa a 105° durante cuatro horas o has

ta que esté a peso constante.

Enfriar en el desecador y pesar.

Cálculos:

$$\% \text{ Sólidos} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

La desecación a 100-105°C no ejerce exclusivamente su acción sobre el agua, por lo que debe tenerse en cuenta la presencia eventual de productos volátiles, especialmente de ácidos orgánicos (ácido láctico y otros ácidos) y de sustancias nitrogenadas de pequeña molécula (amoníaco y amidas) (...). La pérdida de peso debe corregirse si se poseen elementos de cálculo. (1)

4.1.3 Determinación de Cenizas

4.1.3.1 Introducción

Las cenizas son los residuos que se obtienen al calentar un alimento a una temperatura de 650°C. No siempre el residuo representa toda la substancia inorgánica presente en la muestra, puesto que algunas sales sufren volatilización o reducción a esa temperatura. (83)

4.1.3.2 Aparatos y equipo

- . Balanza analítica con sensibilidad a 0.0001 g (70)
- . Mufla con pirómetro y regulador de temperatura
- . Desecador de vidrio con desecante efectivo (puede emplearse sílica gel con colorante)
- . Crisoles de porcelana de 4-5 cm de diámetro (83)
- . Cánula o cañuela
- . Pinzas para crisol
- . Parrilla eléctrica con regulador de calor (83)

4.1.3.3 Procedimiento

La determinación debe hacerse por duplicado.

La muestra se toma por medio de la cánula, introduciéndola hasta el centro del queso y de esta muestra se toman las cantidades necesarias para el análisis, (70) o bien, se toma del queso rayado previamente.

En un crisol a peso constante, se pesan 3 a 5 g de muestra.

Siempre con ayuda de las pinzas, se coloca el crisol en una parrilla y se quema lentamente el material hasta que ya no desprenda humos, evitando que se proyecte fuera del crisol. (83)

Se lleva el crisol a la mufla y se efectúa la calcinación a 600°C durante tres horas por lo menos.

Se deja enfriar la mufla y se transfiere al desecador para su completo enfriamiento.

Se pesa el crisol. (83)

4.1.3.4 Cálculos

La cantidad de cenizas se calcula de la siguiente forma: (70)

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_1 - P_2}{p} \times 100$$

donde:

C = contenido de cenizas en por ciento
 P₁ = peso del crisol en gramos más muestra
 P₂ = peso del crisol en gramos más cenizas
 p = peso en gramos de la muestra

En la reproducción de la prueba, la diferencia máxima que se permite para la determinación efectuada por duplicado, no debe ser mayor de 0.1%, en caso contrario, se repite la determinación.

4.1.4 Determinación de Proteínas

4.1.4.1 Introducción

Este método se basa en la descomposición de los com-

puestos nitrogenados orgánicos por ebullición con ácido sulfúrico.

El hidrógeno y carbón de la materia orgánica se oxidan hasta agua y CO_2 . Por otra parte, en forma simultánea, el ácido sulfúrico se transforma en SO_2 , el cual reduce el material nitrogenado a amoníaco. Este amoníaco se libera después por la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una solución al 4% de ácido bórico. Posteriormente, el nitrógeno amoniacal se titula con una solución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. (65)

En el método de Kjeldahl-Cunning se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de ebullición de la mezcla y acelerar la digestión.

4.1.4.2 Aparatos y equipo

- . Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 g
- . Digestor y destilador macro-Kjeldahl
- . Matraces Kjeldahl de 500-800 ml
- . Espátula o cuchillo

4.1.4.3 Materiales y reactivos

- . Probeta de 200 ml o 250 ml
- . Probeta de 50 ml
- . Bureta automática
- . Perlas de vidrio
- . Indicador de Wesslow (0.8 g de rojo de metilo y 0.2 g de azul de metileno diluidos en 500 ml de alcohol (65)
- . Acido sulfúrico de 93 o 98% (65)
- . Catalizador: Mezcla reactiva de selenio (Lab. Merk) 6 g por muestra aproximadamente o sulfato de cobre pentahidratado y sulfato de amonio anhidro (65)
- . Zinc granulado
- . Solución de ácido bórico al 4% (65, 66), preparado de la siguiente manera: se colocan 40 g de ácido bórico QP en un matraz aforado de un litro. Se calienta medio litro de agua destilada a 60-70°C y se vierte lentamente en el matraz aforado.

Posteriormente se agrega agua destilada fría lentamente para evitar que cristalice la solución al cambiar de temperatura. Aforar el matraz. No debe taparse el matraz mientras esté caliente. Agitar.

- . Solución de hidróxido de sodio 1:1 P/V (1 litro de agua y 1 kg de NaOH)
- . Acido clorhídrico 0.1 N (66)
- . Agua destilada

4.1.4.4 Procedimiento

Digestión:

Se pesa exactamente 1 g de queso en la balanza analítica y se deposita en un matraz Kjeldahl junto con el catalizador (6 g de muestra activa de selenio, o bien, 2 g de sulfato de cobre pentahidratado y 10 g de sulfato de sodio anhidro), 6 perlas de vidrio y 25 ml de ácido sulfúrico 93 o 98%.

Se coloca el matraz Kjeldahl en el calentador del aparato (digestor) y se enciende simultáneamente el abanico extractor. Se calienta hasta que todo el material esté carbonizado; se aumenta la temperatura gradualmente hasta que la disolución esté completamente clara. Se deja por 30 minutos más a esa temperatura.

Se apaga el calentador y se deja enfriar el matraz Kjeldahl. Posteriormente se añaden entre 200 a 250 ml (450: Lab. Nac.) de agua para disolver completamente la muestra. Se agregan 6 a 7 gránulos de zinc y 50 ml de NaOH 1:1. No debe agitarse. Se conecta inmediatamente al aparato de destilación.

Destilación:

Se conecta el agua a los condensadores del aparato y se ponen a funcionar los calentadores de la sección de destilación. El destilado se recibe en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, que contiene 50 a 75 ml de la solución de ácido bórico al 4% y cinco gotas de la solución indicadora preparada como se indicó anteriormente (indicador de Wesslow). El indicador puede agregarse hasta el momento de titular.

El matraz Erlenmeyer se coloca bajo el condensador con el extremo del tubo de destilación sumergido en la solu-

ción. Se destila hasta que haya pasado todo el amoniaco, aproximadamente 300 ml. Se retira el matraz.

Titulación:

Se titula el destilado con HCl, hasta obtener una coloración salmón pálido.

4.1.4.5 Cálculos y resultados (65)

$$\% N = \frac{V \times N \times 0.014}{P} \times 100$$

en donde:

- V = ml de ácido clorhídrico valorado empleados en la titulación
- N = normalidad de la solución valorada (HCl:0.1)
- P = peso de la muestra en gramos
- 0.014 = miliequivalente del nitrógeno

El porcentaje de proteínas se obtiene multiplicando el por ciento de nitrógeno por el factor correspondiente a leche y productos lácteos, que es 6.38. (40)

$$\% \text{ Prot} = \% N \times 6.38$$

4.1.5 Determinación de Grasa (Extracto etéreo) Método Roese-Gottlieb (83, 40, 62)

4.1.5.1 Introducción

Además del método volumétrico que explicamos en Evaluación de la Leche y que tendría un equivalente modificado para el queso, en los métodos ponderales, la grasa se extrae mediante disolventes, éter en general, ya sea de una manera discontinua, por decantaciones sucesivas en tubos, o de una manera continua en aparatos especiales. Tras la evaporación del disolvente, que no es más que un vehículo transitorio, se pesa la grasa. Son métodos precisos pero de ejecución relativamente larga. (1)

El Método de Roese-Gottlieb se emplea en la determinación del extracto etéreo de productos lácteos. Utiliza el amoniaco para suavizar la caseína de la leche (en este caso

del queso), el alcohol etílico para romper la emulsión y la combinación grasa-proteínas, y una mezcla de éteres para la extracción de la grasa. El alcohol favorece la extracción de la grasa por el éter etílico. El éter de petróleo también disminuye la solubilidad del éter etílico en la capa acuosa. La grasa se extrae y posteriormente se estima por diferencia de pesos. (83)

4.1.5.2 Aparatos y equipo

- . Tubos de Rohring y gradillas adecuadas
- . Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g
- . Placa caliente
- . Estufa de 105°C
- . Desecador

4.1.5.3 Materiales y reactivos

- . Agitador (varillas de vidrio)
- . Perlas de vidrio
- . Vasos de precipitado de 100-125 ml
- . Pipetas graduadas de 2, 10 y 30 ml
- . Acido clorhídrico concentrado
- . Alcohol etílico 96% (83)
- . Eter etílico (libre de peróxidos)
- . Eter de petróleo (PE 30-60°)
- . Agua destilada
- . Hidróxido de amonio GR (Grado Reactivo)

4.1.5.4 Procedimiento

- . Pesar exactamente de 1 a 2 g de muestra en un vaso de precipitado de 100-125 ml
- . Añadir 8 ml de agua
- . Agregar un mililitro de hidróxido de amonio y perlas de vidrio
- . Agitar (varilla de vidrio)
- . Calentar a baja temperatura en placa caliente hasta digerir evitando la ebullición
- . Agregar 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y digerir nuevamente a baja temperatura hasta que se oscurezca

- . Enfriar y pasar el contenido del vaso a un tubo de Rohring con todo y perlas de vidrio
- . Lavar el vaso con 4 ml de etanol y añadir el lavado al tubo
- . Agregar 30 ml de éter etílico al vaso y pasarlos al tubo
- . Agitar el tubo un minuto
- . Añadir 30 ml de éter de petróleo al vaso y pasarlos al tubo
- . Agitar vigorosamente el tubo durante un minuto
- . Dejar reposar en la gradilla hasta que el líquido superior esté prácticamente claro (15 min aproximadamente), cuidando que no permanezca alguna porción de la muestra en el conducto de la llave
- . Decantar la solución etérea a través de la llave del tubo en un vaso de 100-125 ml
- . Extraer nuevamente con 25 ml, de cada solvente, dejar reposar y decantar
- . Hacer una tercera extracción con 20 ml de cada solvente y decantar lo más posible
- . Evaporar los solventes del vaso en placa caliente o en un baño de agua
- . Secar la grasa a $\pm 80^{\circ}\text{C}$
- . Enfriar y pesar el vaso con la grasa (A)
- . Lavar el vaso tres veces con 30 ml de éter de petróleo caliente, desechar el éter y evaporar en placa caliente a baja temperatura
- . Secar 15-20 min en la estufa a $\pm 80^{\circ}\text{C}$
- . Transferir a un desecador y pesar el vaso seco y sin grasa (B).

4.1.5.5 Cálculos y resultados

Peso de la grasa extraída = A - B

$$\% \text{ de grasa} = \frac{\text{Peso de la grasa extraída}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

La diferencia máxima permisible en la determinación efectuada por duplicado no debe ser mayor de 0.1%, en caso contrario, se recomienda repetir la prueba.

4.1.6 Determinación de pH - Método Electrométrico (ver 3.1.9.9)

4.1.6.1 Aparatos y equipo

- . Potenciómetro
- . Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g

4.1.6.2 Materiales y reactivos

- . Vaso de precipitado de 100 ml
- . Mortero de porcelana
- . Probeta graduada de 50 ml
- . Cañuela o cánula
- . Solución Buffer de pH 7
- . Agua destilada

4.1.6.3 Procedimiento

Se pesa exactamente 1 g de queso y se tritura en el mortero pasando cuantitativamente a un vaso de precipitado con ayuda de 10 ml de agua, diluyéndose perfectamente.

Se calibra el potenciómetro con la solución Buffer. Posteriormente se hace la lectura en el potenciómetro provisto de un electrodo de membrana de vidrio que se introduce en el queso diluido junto con el electrodo tipo.

La lectura se hace directamente en el potenciómetro.

4.1.7 Determinación de Fosfatasa

4.1.7.1 Introducción

El Control de la Pasteurización, según se estableció

en el inciso 3.1.3.3 se realiza preferentemente en el producto terminado, por razones de índole práctica y en cumplimiento con requisitos higiénico-sanitarios, siguiendo la metodología de la Association of Official Analytical Chemist. (40)

La prueba de la fosfatasa ha probado ser de valor excepcional para localizar la o las causas de una pasteurización imperfecta y/o para el descubrimiento de recontaminación con leche cruda, en una leche adecuadamente pasteurizada.

La fosfatasa es una enzima termolábil cuya temperatura de inactivación es superior a la que pueden soportar los gérmenes patógenos presentes en la leche cruda.

Existen en la leche dos tipos de fosfatasas, la alcalina y la ácida; ya que la primera es mucho más abundante que la última, es la que sirve de base para determinar si una leche ha sido o no bien pasteurizada, por lo cual, cuando en lactología se habla de fosfatasa, este término se refiere, exclusivamente, a la fosfatasa alcalina, la cual es una fosfomonoesterasa tipo A, que tiene su actividad óptima a un pH 9-10 y por tanto en la leche (pH 6.5-6.7) está actuando en el lado ácido de su óptimo. (44)

La prueba de la fosfatasa se basa en el principio de que la fosfatasa alcalina tiene la habilidad (bajo condiciones adecuadas de temperatura y pH), de liberar fenol del fenilfosfato disódico. La cantidad de fenol liberado y que es proporcional a la cantidad de enzima activa presente, se determina por la reacción entre el fenol liberado y la 2-6 dicloroquinonacloroimida (CQC) y por medición colorimétrica de la cantidad de indofenol azul formado. (2)

La fosfatasa puede ocasionalmente reactivarse cuando la temperatura o tiempo de sostenimiento han sido impropios (...). En el Standard Methods for the Examination of Dairy Products (2) se encuentra descrito el método para diferenciar la fosfatasa reactivada de la residual. (44)

También puede haber reacciones falsas positivas de fosfatasa en productos bien pasteurizados (especialmente cuando se trata de leches con extractos saborizantes que poseen fenol).

Otra causa de falsas reacciones positivas puede ser la existencia de bacterias que producen fosfatasa, tales como algunas cepas de *Pseudomonas*, *Lactobacillus thermophilus*, gérmenes del grupo *Escherichia* - *Enterobacter*, etc.; sin em-

bargo, se han descrito métodos para diferenciar la fosfatasa microbiana de la bovina.

Existen muchos métodos para la determinación cuantitativa de esta enzima, tales como el de Kay y Graham (1933), el de Aschaffenburg-Mullen, muy usado en Europa, los de la ciudad de Nueva York, el Scharer, los I y II de la AOAC, etc. (44)

Describiremos un método extremadamente simple y rápido que únicamente debe servir como indicador de fallas en la pasteurización. Los quesos que resulten positivos en esta prueba, pueden cuantificarse por otros métodos. Algunos de ellos se encuentran descritos en la bibliografía utilizada. (44, 41, 40, 2)

4.1.7.2 Prueba cualitativa

4.1.7.2.1 Aparatos y equipo

- . Balanza eléctrica
- . Incubadora con termómetro

4.1.7.2.2 Materiales y reactivos

- . Pipetas de 1 y 10 ml
- . Vaso de precipitado
- . Matraz volumétrico de 100 ml
- . Embudo pequeño
- . Tubos de ensaye
- . Lacto-zyma I (sal de sodio de fenilfosfato y Buffer alcalino)
- . Lacto-zyma II (reactivo desarrollador del color)
- . Agua destilada

4.1.7.2.3 Procedimiento

Se pesan 10 g por duplicado en la balanza eléctrica, se desmenuzan, rallan o maceran perfectamente; 10 g se disuelven en un poco de agua tibia (temperatura inferior a 65°C) en un vaso de precipitado y 10 g (control), se disuelven en agua a 85-90°C en un vaso de precipitado.

Se pasa el contenido de cada vaso a matraces volumé-

tricos de 100 ml con ayuda de un embudo para cada matraz y se aforan a 100 ml.

En dos tubos, uno para la prueba control y el otro para el queso problema, se colocan 10 ml de agua destilada a 37°C y 250 mg del reactivo Lacto-zyma, se mezcla bien hasta su disolución y a cada tubo se le agrega 1 ml del contenido del matraz volumétrico respectivo (problema y control). Se incuban durante 10 minutos a 37°C (temperatura óptima de acción de la fosfatasa) en baño de agua o en una estufa.

Posteriormente se agrega a cada tubo 250 ml de polvo del reactivo Lactozyma II, se incuban 5 a 10 minutos a 37°C y se compara la coloración de cada tubo con la tabla de colores que proporcionan los preparados comerciales.

4.1.7.2.4 Resultado

Coloración azul indica la presencia de fosfatasa (positivo); según la intensidad de la coloración será débil o fuertemente positivo.

Una coloración rojiza-café indica reacción de fosfatasa negativa. (Esta debe ser siempre la coloración del tubo control puesto que el calentamiento inactiva a la enzima).

4.2 ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS

Las técnicas que se describen a continuación se consideran entre las más importantes y reveladoras del aspecto higiénico-sanitario del control de calidad en el queso tipo Oaxaca. Son, además, las técnicas comúnmente señaladas para efectuar las investigaciones oficiales y en gran medida muy útiles para el autocontrol de la fabricación.

Su ejecución debe estar a cargo de personal capacitado y familiarizado con los términos ya que su explicación no se ofrece en este trabajo.

4.2.1 Cuenta de Organismos Coliformes. Recuento de colonias en medio sólido (58, 29, 76, 44, 24, 12, 3, 83, 38, 84, 2, 41)

4.2.1.1 Introducción

El grupo de los organismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de contaminación fecal en algunos casos, de prácticas inadecuadas en otros. Es, además, el que por primera vez fue empleado con estos propósitos en 1892. (29)

En este grupo de microorganismos se incluyen bacilos gramnegativos, aerobios, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas cuando se incuban a 32-35°C. Una variedad de bacterias, muy abundantes y siempre presente en la materia fecal del hombre y animales superiores, satisface la definición anterior; también pertenecen a este grupo ciertas bacterias del suelo y los vegetales, (83, 58) cepas errantes de Salmonella (0.8%), Providencia (0.3%), Serratia (2.2%) y de Proteus (variable según la especie) pueden fermentar la lactosa.

La interpretación del hallazgo y abundancia de los organismos coliformes no tiene carácter universal. En tanto que en agua, en términos generales se considera que su presencia revela una exposición reciente a la contaminación fecal, su significado no es el mismo en el caso de la leche, sustrato en el cual son capaces de desarrollar muy activamente. (83, 58) En algunos tipos de queso, incluso, números elevados de estos microorganismos no guardan necesariamente relación con los antecedentes de manejo higiénico del producto y su presencia carece de significado sanitario. (83)

La demostración y el recuento de organismos coliformes pueden realizarse mediante el empleo de medios sólidos que los favorecen selectivamente o los diferencian de los microorganismos con los que suelen encontrarse asociados en los alimentos, o bien recurriendo a tubos de fermentación que contengan caldo lactosa y computando su número con base a las tablas del número más probable (NMP). (83, 58)

El criterio para seleccionar uno u otro procedimiento depende principalmente de la densidad de gérmenes que se espera encontrar, siendo en algunos casos necesario considerar además, la composición y naturaleza del alimento que se va a examinar. (83)

(...) Por diversas razones, entre otras, la facilidad de operación y economía, se ha introducido el medio de Agar-bilis-rojo-violeta para el recuento de organismos coliformes principalmente a partir de alimentos en los que se espera un número más bien alto. (29)

(...) En la identificación de microorganismos calificados de coliformes en las placas de agar-bilis-rojo-violeta durante el análisis de los alimentos hay que tomar en cuenta diversos hechos que conducen a falsos positivos, por ejemplo: (29)

- a) Si el alimento es un producto que contiene mono o disacáridos en concentración importante, estos pueden ser fermentados por algunos microorganismos presentes, distintos a los coliformes, y generar por ello colonias semejantes aparentemente fermentadoras de lactosa.
- b) El sobrecalentamiento del medio y defectos en las condiciones de incubación (especialmente incubaciones prolongadas) pueden facilitar el desarrollo de colonias rojas por especies de cocos grampositivos.

En los caldos lactosados con reacción positiva, no es de esperarse un cultivo puro de microorganismos; más bien una mezcla de bacterias que pueden incluir una variedad de organismos coliformes y de otras especies.

4.2.1.2 Aparatos y equipo

- . Espátula
- . Papel estaño
- . Lápiz graso
- . Mecheros bunsen
- . Incubadora con reóstato de 32 a 35°C
- . Horno para esterilizar a 180°C
- . Termómetros
- . Baño maría de 45° a 48°C con termostato o termómetro
- . Mortero estéril (o licuadora con vaso metálico estéril)
- . Aparato cuenta colonias Quebec
- . Balanza y taras
- . Asa de platino o nicromel

4.2.1.3 Materiales, reactivos y medio de cultivo

Cristalería:

- . Frascos de dilución de vidrio de 200 a 250 ml de capacidad para contener solución reguladora diluyente (con tapones de rosca)
- . Pipetas bacteriológicas estériles de 10 y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml respectivamente. (83)
- . Cajas de Petri de 100 x 15 ml
- . Matraces de + 200 ml
- . Agua destilada
- . Solución reguladora diluyente. (Fosfato ácido de potasio), preparada como sigue:

KH₂PO₄..... 34 g
 Agua destilada..... 500 ml

Se disuelve el fosfato en el agua y se ajusta el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 0.1 N. Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza durante 20 min a 121°C.

De la solución anterior se toman 1.25 ml y se llevan a un litro de agua destilada; ésta es la solución de trabajo. (76)

- . Medio de cultivo:

Agar de bilis y rojo violeta (recomendado para enumeración de bacterias coliformes; 2) que posee la siguiente composición:

Extracto de levadura.....	3.0	g
Peptona de gelatina.....	7.0	g
Sales biliares.....	1.5	g
Lactosa.....	10.0	g
Cloruro de sodio.....	5.0	g
Rojo neutro.....	0.030	g
Cristal violeta.....	0.002	g
Agar.....	15.0	g
Agua destilada.....	1000	ml

pH final: 7.4

4.2.1.4 Procedimiento

A. Limpieza y esterilización del equipo

Los medios de cultivo y el material que se utiliza en bacteriología se esterilizan antes y después de su uso para evitar contaminación microbiana.

La esterilización puede hacerse:

- a) Horno para el material de vidrio o metal
- b) Autoclave, para soluciones, medios de cultivo, agua destilada, etc.

Clasificación del material a esterilizar:

Material	Esterilización
. Frascos de dilución:	
Sin líquido.....	Horno
Con líquido.....	Autoclave
. Pipetas.....	Horno
. Cajas de Petri:	
Sin medio de cultivo.....	Horno
Con medio de cultivo.....	Autoclave
. Matraces:	
Sin medio de cultivo.....	Horno
Con medio de cultivo.....	Autoclave
. Agua destilada.....	Autoclave
. Solución diluyente.....	Autoclave
. Espátula.....	Horno
. Papel estaño.....	Horno
. Medio de cultivo preparado.....	Autoclave

El equipo por esterilizar en el horno se coloca debidamente envuelto en un papel adecuado y resistente y se somete a una temperatura de 170°C por un tiempo de dos horas, al cabo del cual se deja bajar la temperatura antes de abrir el horno.

El material por esterilizar en autoclave se coloca en el interior del aparato. La circulación de vapor caliente debe ser uniforme, por lo que en seguida se cierra el autoclave y se empieza a calentar con la válvula de vapor

abierta, con el objeto de desalojar de su interior todo el aire y lograr una presión de vapor constante, la cual se alcanza cuando se establece una salida de vapor continua por dicha válvula. Después se cierra la válvula, con lo cual asciende de inmediato la presión interior del autoclave.

La esterilización debe realizarse a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo señalado se suspende el calor desconectando el autoclave y se deja que el manómetro baje lentamente hasta que marque cero, después se abre la válvula para igualar la presión interna con la externa. El material ya esterilizado puede ser retirado del aparato.

B. Preparación del medio de cultivo

Debe prepararse únicamente la cantidad necesaria de medio considerando que se requieren 41.5 g de medio deshidratado para un litro de agua destilada.

La cantidad de medio se calcula teniendo en cuenta el número de muestras, de diluciones de cada muestra (dos o más; ver más adelante), el número de cajas testigo y la contaminación de la muestra. Se considera que cada caja de Petri que contendrá el medio debe considerarse como 15 ml.

C. Preparación y dilución de la muestra

Independientemente del grupo de microorganismos que se pretendan enumerar, el procesamiento de la muestra y la preparación de las diluciones deberá realizarse con apego a las directrices que se describen a continuación.

El incumplimiento de estas condiciones dará lugar a variaciones importantes en los resultados hasta el punto de resultar inutilizables. Así, no es posible comparar los resultados entre dos laboratorios que trabajan la misma muestra con un manejo diferente de la técnica de análisis, ni es posible interpretar los resultados sucesivos de un laboratorio si no se observan en cada ocasión las normas precisamente en los términos descritos. (83)

Las diluciones permiten lograr una separación de las bacterias y evitan que el medio se opaque al sembrar directamente. (24) Hay muchas formas de realizar las diluciones:

- a) Pesar 11 g de queso de cada muestra sobre papel

estaño estéril, cerca del fuego y sin corrientes de aire. Molerlos empleando el mortero estéril y diluyéndolos en 99 ml de solución diluyente estéril de un frasco de dilución. Agitar vigorosamente varias veces. De esta forma se obtiene la primera dilución aproximada de 1:10.

$$\frac{11}{11 + 99} = \frac{11}{110} = \frac{1}{10}$$

De la dilución 1:10 se toma 1 ml y se disuelve en 99 ml del líquido de dilución de otro frasco para obtener la dilución 1:1000.

La dilución 1:100 se obtiene tomando 0.1 ml de la dilución 1:10.

b) Otra forma de preparar las diluciones a partir de una muestra sólida (queso) consiste en pesar 10 g obtenidos de diferentes zonas del producto con ayuda de la espátula estéril, transferirlos a un vaso de licuadora estéril (o a un mortero estéril) y agregar 90 ml de solución diluyente. Se forma así la primera dilución 1:10. Posteriormente y después de agitar perfectamente el frasco, se toman 10 ml de la primera dilución y se adicionan a un frasco que contenga 90 ml de la solución diluyente; se obtiene así la segunda dilución (1/100). Si se extrae 1 ml de ésta y se deposita en 90 ml de solución diluyente se obtiene la tercera dilución (1/1000) y así sucesivamente (ver 83).

c) Agregar a 90 ml de solución diluyente 10 g de muestra. Después de agitar la dilución (1/10) se extrae 1 ml y se adiciona a 9 ml de solución diluyente para formar la segunda dilución (1/100). Se extrae 1 ml de ésta y se transfiere a 9 ml de solución diluyente para formar la tercera dilución (1/1000), etc.

Cada botella con diluyente que se inocula debe estar estéril y agitarse siempre de la misma manera: 25 movimientos de abajo hacia arriba en un arco de 30 cm completados en 7 segundos, o cualquier otro que conduzca al mismo resultado (ver 83).

Deben utilizarse pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. Para aspirar el líquido de las muestras con la pipeta, sumergir ésta lo menos posible al realizar la operación. (83)

Los frascos de dilución se preparan a partir de la

solución de fosfato preparada como se indicó anteriormente y se llenan con 99, 90 y/o 9 ml según el procedimiento escogido para preparar las diluciones; se cubren con una pequeña hoja de aluminio o papel estaño y se tapan dejándoles la tapa floja para ser esterilizados en autoclave (121°C/20 min).

Después de la esterilización se cierran bien y se comprueba que la cantidad de líquido no haya disminuido; de ser así, se pondrá en los frascos una cantidad ligeramente mayor (2 ml), a fin de que, una vez esterilizados, tengan el volumen adecuado.

D. Inoculación e identificación de las placas

Las cajas de Petri que servirán para la cuenta de coliformes, así como las cajas testigo (1 por cada 3-4 diluciones de la misma muestra), se identifican anotando con el lápiz graso en la tapa superior, el número de muestra, la dilución que contienen, el tipo de prueba, la fecha y demás datos de utilidad.

Considerando que las diluciones se prepararon conforme se indicó en el inciso a), de la dilución 1:10 se toma 1 ml y se deposita en una caja de Petri estéril cerca del fuego y sin corrientes de aire. Bajo las mismas condiciones se toma 0.1 ml de la dilución y se deposita en otra caja de Petri estéril que se marca como dilución 1/100. De la dilución 1/1000 se toma 1 ml y se deposita en otra caja de Petri estéril.

En el caso de haber preparado las diluciones conforme a los incisos b) y c), de cada una de las diluciones se extrae 1 ml y se deposita en una caja de Petri estéril respectivamente.

Como testigo se emplean cajas de Petri que contienen 1 ml de la solución diluyente y el medio de cultivo.

Con cada una de las muestras debe procederse análogamente.

E. Adición del medio de cultivo a las cajas

En las cajas de Petri se colocan de 12 a 15 ml del medio preparado y conservado a 45°C en baño maría, flameando la boca del matraz antes y después de vaciar el medio. Inmediatamente después se tapan las cajas y se colocan en una su

perficie plana para moverlas varias veces en forma de 8 (ocho), evitando que la mezcla de medio o inóculo moje la tapa de las cajas.

Se deja solidificar y se añade otra capa de medio fundido de 4 a 5 ml para evitar el desarrollo de colonias su perfciales de identificación dudosa.

Las cajas se dejan en reposo hasta que solidifiquen, se invierten y se llevan a la incubadora.

F. Incubación de las muestras

Las cajas de Petri se acomodan en la incubadora con las tapas hacia abajo, teniendo cuidado de no amontonarlas una con otra ni pegarlas a las paredes de la incubadora. Se incuban durante 24 + 2 horas entre 32 a 35°C. (58, 83)

G. Cuenta y reporte de colonias

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se sacan las cajas de la incubadora y se lee el número de colonias desarrolladas por medio del cuenta-colonias Quebec de campo obscuro en caso de ser muchas.

Las cajas deben conservarse a + 4°C durante 24 horas en caso de no examinarse inmediatamente después de la incuba ción. (3)

Los organismos coliformes forman colonias superficia les de color rojo púrpura de 0.5 mm o más, de diámetro, gene ralmente rodeadas por una zona rojiza de bilis precipitada en los productos lácteos. (83, 84) Las colonias de ciertas formas de cocos a veces producen colonias semejantes en color y tamaño a los coliformes, aunque sin halo. (83, 58)

Las colonias se cuentan tan pronto como sea posible, una vez terminada la incubación. La refrigeración de las placas puede alterar el color de las colonias y dificultar la exactitud del recuento. (84)

Para dar la cifra final de colonias se selecciona de entre las placas de cada muestra, aquella donde aparezcan en tre 30 y 300 colonias para obtener el menor error en el re-cu ento.

Se cuentan todas las colonias desarrolladas en las

placas seleccionadas (excepto las de hongos), incluyendo las colonias puntiformes. Debe hacerse uso del microscopio para resolver los casos en los que no se puedan distinguir las colonias de pequeñas partículas de alimento.

La cifra resultante del cómputo se multiplica por la inversa de la dilución para obtener el número de colonias por gramo de la muestra y reportar como "Cuenta de organismos coliformes en placas de agar-rojo-violeta-bilis incubadas a 24 horas a 35°C".

Si no se dispone de una placa que posea entre 30 y 300 colonias por muestra, sino en un número mucho mayor, se cuenta únicamente la mitad o un cuarto representativo y el número obtenido después de contar se multiplica por 2 o por 4 antes de hacerlo por la inversa de la dilución.

4.2.2 Cuenta de Organismos Coliformes Fecales (83, 59, 29)

4.2.2.1 Introducción

En el grupo de los organismos existen algunos cuyo hábitat natural no es la materia fecal. El coliforme típicamente fecal suele identificarse con la especie Escherichia coli. Cuando se pretende explorar la posibilidad de una contaminación fecal en un alimento, la técnica más confiable actualmente es la demostración y recuento de este microorganismo (...). Su ausencia, razonablemente ofrece un margen de seguridad en el sentido de excluir la presencia de enterobacterias patógenas; pero su presencia aunque sugiere el riesgo de una contaminación fecal, puede ser el caso de origen distinto ya que el germen es capaz de sobrevivir y multiplicarse en la materia orgánica fuera del intestino. La correcta interpretación de la presencia de esta bacteria en un alimento, no siempre es posible; implica la consideración del tipo de alimento y del conocimiento sobre las condiciones de obtención, manejo y almacenamiento del producto. Señalar que Escherichia coli es el mejor indicador de los antecedentes sanitarios de un alimento que los organismos coliformes es más prudente que el afirmar que la presencia de Escherichia coli, es un indicador de contaminación fecal en los alimentos.

El recuento de Escherichia coli en el laboratorio, sin embargo, requiere una técnica laboriosa y costosa. Es

necesario, a partir de un recuento presuntivo confirmar las colonias desarrolladas en un medio selectivo a través de varias pruebas bioquímicas. Esto demanda un gran esfuerzo. Con el propósito de simplificar la investigación se ha introducido el término de coliformes fecales para referirlo a un grupo de microorganismos más específico que el de los coliformes y con mayor identidad a la Escherichia coli. El recuento de este grupo de bacterias cuya conceptualización es de orden funcional se funda en la capacidad del germen para producir indol y fermentar la lactosa a temperaturas elevadas. Bajo estas condiciones se excluyen cepas de coliformes de asiento no intestinal, lo que da mayor especificidad al estudio. Los diferentes autores insisten en la importancia de realizar la prueba con un estricto control de la temperatura; para ello se requiere de un baño maría con termostato y un sistema de circulación de agua. Llama la atención la rigidez de los investigadores para evitar fluctuaciones en la temperatura mayores a 0.1°C cuando que mientras algunos señalan 44.5°C, otros dan 45.5°C como cibras para la incubación. (29)

Los dos métodos disponibles para este propósito siguen la técnica del Número más Probable (NMP). Después de incubar series de tubos inoculados con la muestra en caldo-lauril triptosa (técnica de Eijkman) o en caldo McConkey a 35°C (técnica de McKenzie). (29)

4.2.2.2 Aparatos y equipo

- . Horno para esterilizar
- . Autoclave
- . Baño maría con termostato y termómetro
- . Mortero estéril
- . Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g
- . Cuchillo y espátula estériles
- . Gradilla para tubos de cultivo .
- . Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- . Asa de platino o nicromel

4.2.2.3 Materiales y reactivos

- . Pipetas bacteriológicas estériles de 10 y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml respectivamente
- . Tubos de vidrio de 16 x 150 con tapón de rosca

- . Frascos de vidrio para dilución para contener 99 ml y tubos de vidrio de 16 x 150 mm con tapón de rosca para contener 9 ml de solución reguladora diluyente, en ambos casos + 1% del volumen señalado después de la esterilización
- . Tubos de vidrio de 13 x 100 mm
- . Solución reguladora diluyente: se disuelven 34 g de fosfato monopotásico en 500 ml de agua y se ajusta el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1 N. Se esteriliza a 121°C durante 20 min. Se conserva en refrigeración; se toman 1.25 ml y se completa el volumen a 1,000 ml con agua. Se emplean 99 y 9 ml para hacer las diluciones. Se esterilizan los frascos y tubos conteniendo la solución a 121°C durante 20 minutos. El pH final será de 7.2.

4.2.2.4 Medios de cultivo

- . Caldo Lauril Sulfato Triptosa (59)

Triptosa.....	20	g
Lactosa.....	5	g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄).....	2.75	g
Cloruro de sodio.....	5	g
Lauril sulfato de sodio.....	0.1	g
Agua destilada.....	1000	ml

Se disuelven 35.6 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se hierve y se distribuye 10 ml de medio en tubos de 16 x 150 mm con campana de fermentación. Se esteriliza a 15 libras (121°C) durante 15 minutos. El pH final será de 6.8

- . Caldo EC

Triptona o triptícase.....	20	g
Lactosa.....	5	g
Salas biliares.....	1.5	g
Fosfato dipotásico.....	2.75	g
Fosfato monopotásico.....	1.5	g
Cloruro de sodio.....	5	g
Agua destilada.....	1000	ml

Se disuelven 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se hierven y distribuyen 10 ml del medio en tubos de 16 x 150 mm con campanas de fermentación. Se esteriliza a 15 libras

de presión (121°) durante 15 min. El pH final del medio será de 6.9.

4.2.2.5 Procedimiento (Técnica de Eijkman)

Se pesan 11 g de queso, se muelen en el mortero estéril y se transfieren a 99 ml de solución reguladora diluyente estéril contenidos en un frasco de dilución, para obtener así la primera dilución aproximada de 1:10. De esta dilución se toma 1 ml y se pasa a un frasco que contiene 9 ml de solución diluyente estéril para obtener la dilución 1:100. La dilución 1:1000 se prepara pasando 1 ml de la dilución 1:100 a 9 ml de solución diluyente estéril contenidos en otro tubo de dilución.

Prueba presuntiva:

Se inocula 1 ml de cada dilución a cada uno de tres tubos con 10 ml de Caldo Lauril Sulfato Triptosa.

Se incuban los tubos durante 48 ± 2 horas a 37°C. Se examinan los tubos a las 24 ± 2 horas para observar si hay acumulación de gas en la campana de fermentación. Se re incuban 24 horas más. La presencia de gas en cualquier cantidad, dentro de 48 horas hace positiva la prueba.

Prueba confirmatoria:

Se agitan suavemente los tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa que resulten positivos. Se transfieren dos a tres asadas de cada tubo a tubos con caldo E₁C, anotando cuidadosamente la dilución que corresponde a cada tubo del cual se efectúa el inóculo. Si todos los tubos resultasen positivos, inocular las tres últimas diluciones.

Se incuban los tubos a 45 ± 2°C y se observa si hay formación de gas a las 24 y 48 horas.

Los tubos que presenten gas al cabo de 48 horas son positivos.

4.2.2.6 Cálculos y resultados

Conociendo el número de tubos positivos y negativos de cada dilución, se determina el número más probable de or-

ganismos, tomando en cuenta que el empleo de las tres primeras diluciones a partir de la dilución 1:10 (3 tubos con 1 ml de la primera dilución, 3 tubos con 1 ml de la segunda dilución y 3 tubos con 1 ml de la tercera dilución), permiten obtener directamente a través de los valores de la table correspondiente, el número de microorganismos por gramo de muestra. Después de consultar la tabla III, se reporta el NMP de coliformes fecales por gramo de muestra.

TABLA III

NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS

Tubos inoculados: 3 con 1 ml dilución 1:10 = 0.1 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:100 = 0.01 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:1,000 = 0.001 g muestra

Tubos positivos NMP/g															
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
(0.1)	(0.01)	(0.001)	(0.1)	(0.01)	(0.001)	(0.1)	(0.01)	(0.001)	(0.1)	(0.01)	(0.001)				
0	0	0	-3.0	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23.0
0	0	1	3.0	1	0	1	7.2	2	0	1	14.0	3	0	1	39.0
0	0	2	6.0	1	0	2	11.0	2	0	2	20.0	3	0	2	64.0
0	0	3	9.0	1	0	3	15.0	2	0	3	26.0	3	0	3	95.0
0	1	0	3.0	1	1	0	7.3	2	1	0	15.0	3	1	0	43.0
0	1	1	6.1	1	1	1	11.0	2	1	1	20.0	3	1	1	75.0
0	1	2	9.2	1	1	2	15.0	2	1	2	27.0	3	1	2	120.0
0	1	3	12.0	1	1	3	19.0	2	1	3	34.0	3	1	3	160.0
0	2	0	6.2	1	2	0	11.0	2	2	0	21.0	3	2	0	93.0
0	2	1	9.3	1	2	1	15.0	2	2	1	28.0	3	2	1	150.0
0	2	2	12.0	1	2	2	20.0	2	2	2	35.0	3	2	2	210.0
0	2	3	16.0	1	2	3	24.0	2	2	3	42.0	3	2	3	290.0
0	3	0	9.4	1	3	0	16.0	2	3	0	29.0	3	3	0	240.0
0	3	1	13.0	1	3	1	20.0	2	3	1	36.0	3	3	1	460.0
0	3	2	16.0	1	3	2	24.0	2	3	2	44.0	3	3	2	1,100.0
0	3	3	19.0	1	3	3	29.0	2	3	3	53.0	3	3	3	+1,100.0

Referencia: 83, 59.

4.2.3 Investigación de Salmonella (73, 83, 29, 76)

4.2.3.1 Introducción

Las técnicas para el aislamiento de Salmonella a partir de los alimentos constituyen un ejemplo muy ilustrativo de la flexibilidad fisiológica de las bacterias, de la influencia que sobre ésta tienen los diferentes tratamientos con los que la industria procesa los alimentos y la variedad de diseños que el microbiólogo puede llevar a efecto en las técnicas de laboratorio para poner de manifiesto contaminaciones aun minúsculas por microorganismos (a veces una bacteria en 500 g de producto) y que con frecuencia se han visto seriamente lesionados en su viabilidad. (29) Tales técnicas tienen que resolver, además, el problema de la interferencia de miles y millones de otras bacterias, ecológica y fisiológicamente muy relacionadas con el microorganismo en cuestión. Dentro de esta tarea, es evidente que la sensibilidad, ligada a la especificidad, son las características claves en las técnicas de análisis a diferencia de la precisión y exactitud que son fundamentales en los recuentos de microorganismos en los alimentos.

Precisamente debido a esa flexibilidad de los microorganismos frente a las condiciones ambientales en las que llegan a verse involucrados, se pueden observar cambios notables en su comportamiento en los medios de laboratorio en términos que varían con la naturaleza de los tratamientos a los que se han sometido. Es explicable pues, que no exista un solo método, bien definido en todos sus puntos (como el recuento de bacterias mesofílicas aerobias) para el aislamiento de Salmonella a partir de los alimentos. (29)

Aunque microbiólogos y epidemiológicos están de acuerdo en que cualquiera de los aproximadamente 1,500 serotipos conocidos de Salmonella, deben considerarse potencialmente patógenos para el hombre y por ello condenar cualquier alimento que lo contenga, se sabe por otra parte, que la susceptibilidad a los agentes físicos y químicos muestran diferencias interesantes entre esos serotipos. También se conoce en muchos casos el daño que sufren esos microorganismos por acción del calor, la desecación, las radiaciones o la acidez excesiva al procesar los alimentos. Se ha ensayado y evaluado por ello, el efecto de diversas sustancias y tratamientos para permitir una recuperación de las salmonelas en los medios de cultivo, así como su respuesta al efecto tóxi-

co de las sustancias inhibidoras adicionadas a estos. Asimismo, otros estudios han evaluado el tamaño de la alícuota de alimento inoculado a los medios de cultivo, en la sensibilidad de las técnicas para el aislamiento. El resultado de todo esto ha sido la confección de una numerosa variedad de técnicas, algunas de ellas específicamente indicadas para un tipo particular de alimento.

En general, las tácticas son laboriosas, costosas y se requiere de tiempo y personal bien adiestrado. Pero la importancia que para la salud constituyen estos microorganismos da lugar a que continúen ensayándose nuevas técnicas con el objeto de hacerlas más sensibles, específicas, económicas y rápidas.

La metodología general incluye una sucesión de etapas:

- a) Preenriquecimiento o enriquecimiento no selectivo
- b) Enriquecimiento en medios selectivos
- c) Aislamiento en medios de agar selectivos
- d) Identificación presuntiva mediante pruebas bioquímicas
- e) Identificación serológica

En los laboratorios muy especializados se completa el estudio con la tipificación del fago al que pertenece la Salmonella aislada.

El propósito del preenriquecimiento consiste en facilitar a las salmonelas presentes en el alimento una recuperación del stress en el que se encuentran como resultado de la exposición a condiciones traumatizantes durante el procesado de algunos alimentos.

Los medios de cultivo que para tal fin se utilizan no contienen en general sustancias inhibidoras; la flora asociada no se ve por ello impedida para proliferar. De ahí que el recurso del medio de preenriquecimiento debe manejarse cuidadosamente para obtener sus beneficios en la recuperación de las salmonelas y evitar un sobredesarrollo de la flora competitiva que estorbara su aislamiento.

En alimentos crudos y en los suavemente procesados y con una carga bacteriana algo más discreta el empleo del preenriquecimiento no es recomendable.

Es necesario tomar en consideración que las salmone-

las en los productos procesados pueden encontrarse no sólo mermadas en su vitalidad, sino generalmente en escaso número. Entre los medios de preenriquecimiento recomendados están el agua peptonada (jamón cocido), el caldo lactosado (huevo en polvo) y el agua destilada (leche descremada).

Los medios de enriquecimiento pueden utilizarse a partir del preenriquecimiento, o directamente con el alimento. (29) (En el caso del queso se utilizan directamente).

Los medios de enriquecimiento contienen sustancias inhibitoras y pretenden, por una parte, la multiplicación de las salmonelas y por otra impedir la de la flora asociada. Este es al menos, el objetivo, pero diversos factores en un sentido o en otro demeritan el valor de cada uno de los medios conocidos en mayor o menor grado. Algunos medios pierden poder selectivo al ser adicionados del alimento. (29)

Por esta razón se pueden encontrar en la literatura especificaciones para cada tipo de alimento en lo referente no sólo al medio de enriquecimiento recomendado, sino a las condiciones en que debe ser utilizado: concentración del inóculo, temperatura y tiempo de incubación. (29)

(...) Probablemente el efecto más notable en la eficacia de los medios de enriquecimiento se encuentra en el tipo de alimento con que se inoculan. Esto no es de extrañar dada la complejidad de los productos sujetos al análisis, la cantidad de muestra inoculada y la naturaleza química del proceso inhibitorio por el cual funcionan otros medios de enriquecimiento. Es evidente que entre los componentes inhibitorios del medio y las bacterias ocurren reacciones químicas que fácilmente llegan a ser perturbadas por determinados componentes del alimento. (29)

Dos grupos de medios de enriquecimiento han sido utilizados con mayor profusión: el grupo del caldo tetrionato-bilis-verde brillante o medio de Kauffmann (caldo-tetrionato-verde brillante, caldo-tetrionato-sulfatiazol-bilis-verde brillante y caldo tetrionato-novobiocina) y el grupo del Selenito (caldo Selenito F, caldo Selenito-cistina, caldo Selenito-verde brillante y caldo Selenito-sulfaverde brillante).

En el primer grupo el medio contiene una fuente de nitrógeno orgánico a base de peptona, triptona, extracto de carne o extracto de levadura, adicionado, según el caso, de sales biliares o novobiocina para inhibir a bacterias grampositivas, verde brillante para inhibir además de éstas a bac-

terias coliformes, carbonato de calcio para regular el pH neutralizando el ácido que se va generando y tiosulfato de sodio que parcialmente pasa a tetracionato de sodio cuando se adiciona el yodo al inocular la muestra. Estas sales tienen un efecto tóxico, cuando actúan en combinación según se cree por reacción con los grupos sulfhidrilo de las enzimas involucradas en la síntesis de la membrana y pared celular de las bacterias sensibles. (29)

En el grupo del Selenito, los medios también contienen una fuente de nitrógeno a base de triptona y peptona debiéndose el efecto tóxico del selenito a dos posibles mecanismos: reacción del grupo sulfhidrilo enzimático o formación de aminoácidos análogos en los que el Selenio ha tomado el lugar del azufre: la lactosa y fosfatos tienen un efecto regulador del pH. La cistina favorece el desarrollo de las salmonelas en presencia del alimento involucrado. (27)

Otros caldos de enriquecimiento también se utilizan con cierta frecuencia: medio Rapport, caldo GN de Hjna, etc.

En la práctica, la recomendación general consiste en el empleo de dos medios de enriquecimiento para cada muestra de alimento. (29)

Como consecuencia del empleo de los medios de enriquecimiento se obtiene, después de la incubación, una flora mixta en los caldos y a partir de ellos se procede al aislamiento de las salmonelas.

En este tercer estudio se hace uso por ello, de medios sólidos los que por otra parte mantengan un efecto inhibitorio sobre la flora asociada, estimulen la formación de colonias de Salmonella y finalmente comuniquen a éstas características diferenciales respecto a las colonias de otros gérmenes. En atención a su fuerza selectiva, se pueden constituir tres grupos:

- a) Ligeramente selectivos (medios de Endo, Agar Eosina, azul de metileno y EMB y medio de MacConkey)
- b) Moderadamente selectivos (Agar-DCLS, agar SS y Agar-xilosa-lisina-desoxicolato XLD)
- c) Fuertemente selectivos (Agar verde brillante y Agar Sulfito de bismuto)

Idealmente a este nivel de la técnica de aislamiento las salmonelas debieran aparecer bien desarrolladas y en cul

tivo puro sobre las placas; esta no es, ni con mucho, la regla. Otros géneros y, mejor aún, ciertas cepas de esos géneros muy relacionadas bioquímicamente a las salmonelas llegan a desarrollarse. De éstas algunas pueden diferenciarse sobre las mismas placas y desecharse; otras, requieren confirmación a través de pruebas en cultivos puros. (29)

Ciertas características le dan preferencia a uno u otro medio. La experiencia ha demostrado que la conducción más correcta del análisis incluye el empleo de dos medios (uno moderado y otro fuertemente selectivo), para cada medio de enriquecimiento por nuestra examinada. Cuando así se procede, el resultado es poco influido por la selección de uno u otro dentro de cada grupo.

Algunas de las características más interesantes que deben conocerse de los medios que emplearemos, son las siguientes:

Agar Verde Brillante. Al medio nutritivo básico se le adiciona verde brillante como inhibidor de la flora grampositiva y de algunos coliformes. El mecanismo indicador está formado por lactosa y sacarosa con el rojo de fenol como indicador.

La incorporación de sulfapiridina hace aún más inhibitorio el medio, lo que según algunos autores llega a perjudicar al aislamiento de un número de salmonelas. Con o sin sulfas es también uno de los medios más recomendados.

Agar-Xilosa-Lactosa-Desoxicolato. Aunque menos inhibitorio que el anterior, este medio manifiesta aparentemente una sensibilidad mayor, lo que desde este renglón lo sitúa con ventaja. La inhibición de las bacterias grampositivas se debe al desoxicolato presente. El sistema indicador funciona a partir de tres carbohidratos: xilosa, lactosa y sacarosa, la descarboxilación de la lisina y la producción de H_2S . La xilosa es fácilmente utilizada por las salmonelas, lo que provoca una acidificación del medio. Sin embargo, al descarboxilar a la lisina, las colonias de estos gérmenes elevan el pH haciendo virar a rojo el indicador rojo de fenol; esta es la coloración típica de las colonias de *Salmonella* en el medio. Las bacterias fermentadoras de lactosa o sacarosa acidifican al medio a tal grado (el medio contiene 7.5 g/lit de cada uno de estos azúcares) que aún descarboxilando la lisina no llegan a producir un virre alcalino del medio.

Medio de Wilson y Blair o Agar Sulfito de Bismuto.

Este es uno de los medios de cultivo de mayor predilección entre los bacteriólogos para el aislamiento de Salmonella. Ampliamente utilizado en Europa. También es recomendado por casi todas las agencias norteamericanas interesadas en el problema. A diferencia de los restantes medios el sistema indicador no funciona a base de la fermentación o no de la lactosa o de algún otro carbohidrato por sí mismo. La flora grampositiva es inhibida por el verde brillante y una interesante proporción de gramnegativos por el efecto del sulfito de bismuto y del sulfito de sodio. La combinación de sulfuro ferroso y fosfato disódico constituyen la reacción de hierro que permitirá la eventual formación del sulfuro de hierro negro a partir del H_2S generado por las salmonelas en presencia de glucosa. Algunos autores han señalado la obtención de falsas positivas en el medio y es de esperar por su falta de sensibilidad para poner de manifiesto cepas de Salmonella, no productoras de H_2S . (El medio fue propuesto por los autores para el aislamiento de una especie muy constante como generadora del H_2S ; Salmonella typhi).

No es difícil advertir que la variedad de medios de cultivo diseñados para el aislamiento de Salmonella, contemplan un problema singular que surge de dos hechos: la eventual abundancia y variedad de la flora asociada y la eventual escasez de células de Salmonella o la existencia de éstas con desusual sensibilidad a los agentes inhibitorios. El primero, se relaciona con la especificidad y el segundo con la sensibilidad del medio de cultivo seleccionado; tanto especificidad como sensibilidad del medio de cultivo se consigue aumentando la concentración del agente inhibidor incorporado. Del mismo modo para favorecer el desarrollo de células de Salmonella especialmente susceptibles al efecto de sustancias antibacterianas, hay que reducir éstas, lo que da lugar a un desarrollo más exuberante de la flora indeseada sobre las placas. (29)

La recomendación práctica de los expertos es en el sentido de utilizar para cada caldo de enriquecimiento al menos una placa de un medio fuertemente inhibitorio y otro medianamente inhibitorio. Esto por suerte, independientemente de la selección de las colonias para confirmar, por personal bien entrenado en el área. (29)

La identificación presuntiva de las colonias de Salmonella, desarrolladas en las placas, se efectúa mediante la aplicación de pruebas bioquímicas en medios de cultivo que llevan incorporado un sistema sencillo o múltiple de indicadores y ningún elemento restrictivo para la multiplicación bacteriana. Durante esta etapa se pretende conocer el perfil bioquímico de las cepas en estudio para compararlo con

el que generalmente exhiben las cepas del género Salmonella. Se dice que la identificación, al concluir estas pruebas, es presuntiva debido a la existencia de cepas de Salmonella que se apartan de los lineamientos tipos del género y de cada cepa de otros géneros que pueden responder con las características propias de la Salmonella. La oportunidad de que esto ocurra disminuye conforme se emplean más y más pruebas durante el proceso. Aun así, siempre existe el riesgo de estar frente a una cepa que no se conduce en alguna prueba en la forma que se reconoce típica de las Salmonellas. Por ejemplo, después de ensayar miles de cepas del género se ha encontrado que 9.4% no producen H₂S en medio de agar TSI, 5.4% son inmóviles, 0.3% no fermentan al manitol y 6% la xilosa; por otra parte, un 0.8% fermenta la lactosa, 0.5% la sacarosa, 1.1% produce indol y 0.3%, aunque tardíamente, llegan a desarrollar en presencia de cianuro. (29)

La lista anterior permite subrayar un hecho no privativo de las salmonelas, pero sí que en ellas alcanza su mayor expresión. El diagnóstico o identificación final de una Salmonella no se obtiene a través de unas cuantas pruebas bioquímicas; como tampoco es legítimo identificarla sólo por aglutinación de un suero polivalente a partir de colonias más o menos típicas en las placas de los medios selectivos y diferenciales. Igualmente erróneo puede ser el desechar una cepa sólo porque no responde a una prueba aislada como típica del género. El diagnóstico más confiable que puede conseguirse es aquel que se fundamenta en una serie de pruebas bioquímicas positivas y negativas, según el ensayo de que se trate en cada caso. Aunado a las pruebas de aglutinación con los antisueros del grupo al menos. (29)

Por lo demás, es imperativo probar varias colonias típicas de cada placa inoculándolas a la serie de tubos con los medios que más adelante se mencionan. El bacteriólogo debe ser consciente en todo momento de que estas inoculaciones han de efectuarse a partir de un cultivo puro del microorganismo; por ello deberá seleccionar cuidadosamente, de preferencia bajo lente de aumento y con una adecuada iluminación, aquellas colonias más sugestivas, si las hay típicas y si no de las sospechosas. Si alguna duda existiera, se procederá a su aislamiento en alguno de los medios selectivos ya comentados.

Las pruebas bioquímicas que se utilicen para la identificación presuntiva de Salmonella no se han señalado en los diferentes manuales como obligatorias; ejecutadas correctamente, el bacteriólogo puede diseñar los medios de cultivo que en su experiencia o según su disponibilidad en el comer-

cio se lo permitan. Se recurre en general a los siguientes: TSI Agar o el medio de Kliger para observar la fermentación de la glucosa y de la lactosa (y/o la sacarosa en el caso del TSI) y la producción de H₂S; el medio de SIM para observar la movilidad, la producción de indol y la de H₂S; el caldo Surraco para observar la fermentación de la sacarosa y la hidrólisis de la urea; la fermentación del manitol en caldo Manitol y la prueba para la lisina descarboxilasa en el Agar LIA. (29)

4.2.3.2 Aparatos y equipo

- . Horno para esterilizar
- . Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de 0.1° y termómetro
- . Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g
- . Mortero estéril
- . Espátula estéril

4.2.3.3 Materiales y reactivos

- . Tubos de ensaye, preferentemente de 13 x 150 mm
- . Tubos de ensaye, preferentemente de 13 x 100 mm
- . Frascos de vidrio para dilución con tapas de rosca
- . Pipetas bacteriológicas estériles de 10 y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml respectivamente
- . Cajas de Petri de 100 x 10 mm
- . Asa de platino o nicromel de 3 mm de diámetro y asa recta
- . Portaobjetos de vidrio lavados y desengrasados
- . Solución de Verde Brillante 1:1000 (0.1%)

Verde Brillante.....	0.1 g
Agua destilada estéril.....	100 ml
- . Solución de Yodo-yoduro

Cristales de yodo.....	6 g
Yoduro de potasio.....	6 g
Agua destilada.....	20 ml

 (Debe conservarse en frasco ámbar)
- . Indicador de Timol

Azul de timol.....	1.6 g
--------------------	-------

Hidróxido de sodio 0.1 N....	35 ml
Agua destilada.....	100 ml
. Reactivo de Kovac	
p-Dimetil-aminobenzaldehído.	5 g
Alcohol amílico.....	75 ml
Acido clorhídrico concentra	
do.....	25 ml, que se
agrega lentamente al final	

4.2.3.4 Medios de cultivo

Los medios de cultivo mencionados en 4.2.3.1, representan la alternativa de medios seleccionados para la investigación de Salmonella y corresponden a los que se utilizan rutinariamente en el Laboratorio Nacional de Referencia de la Secretaría de Salubridad y Asistencia (1980).

Los diferentes pasos que requiere la investigación de Salmonella: preenriquecimiento, enriquecimiento, etc., ofrecen la posibilidad de seleccionar otros medios de cultivo de acuerdo con la experiencia, el tipo de alimento, etc.

La Norma Oficial Mexicana F-304-1977 "Método General de Investigación de Salmonella en Alimentos" (73) propone el empleo de los medios que se enumeran a continuación (únicamente se describen los medios seleccionados para este trabajo; algunos de ellos no están incluidos en la norma de referencia).

A. Medios de preenriquecimiento

- a) Agua peptonada
- b) Agua destilada estéril

B. Medios de enriquecimiento

- a) Caldo Selenito Cistina
- b) Caldo Tetratiolato (Kawffman)

Proteosa peptona o triptona....	5 g
Sales biliares.....	1 g
Carbonato de sodio.....	10 g
Tiosulfato de sodio.....	30 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se disuelven 46 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y se calienta a ebullición. Se enfría

aproximadamente a 45° y se agregan 10 ml. de una solución 1:1000 de Verde Brillante. Se homogeneiza y se distribuye en recipientes estériles en volúmenes de 125 ml. Si se va a usar el mismo día, agregar 20 ml de solución yodo-yodurada, si no es así, adicionar proporcionalmente la cantidad de solución yodo-yodurada a la cantidad de medio a usar el mismo día.

C. Medios para el aislamiento

a) Agar Verde Brillante

Extracto de levadura.....	3 g
Peptona de carne.....	10 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Lactosa.....	10 g
Sacarosa.....	10 g
Rojo de fenol.....	0.08 g
Verde Brillante.....	0.0125 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH final: 6.9

Suspender los ingredientes en 200 ml de agua destilada. Dejar reposar por 10 minutos, añadir 400 ml más de agua y calentar agitando frecuentemente. Al llegar al punto de ebullición, bajar la espuma formada añadiendo 500 ml de agua caliente. Permitir que hierva durante uno o dos minutos más y retirar del calor.

Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 20 libras de presión (si se prolonga el tiempo de esterilización bajará la selectividad del medio).

Distribuir el medio a 45°C en cajas de Petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

b) Agar Sulfito de bismuto

Peptona polipeptonada.....	10 g
Extracto de carne.....	5.0 g
Dextrosa.....	5.0 g
Fosfato disódico.....	4.0 g
Sulfato ferroso.....	0.300 g
Indicador sulfito bismuto...	8.0
Verde Brillante.....	0.015
Agar.....	20.0 g

pH final + 7.5

Se hace una suspensión con 52 g de polvo en un litro de agua destilada. Se mezcla bien. Cuando se logra una suspensión uniforme, se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Se deja enfriar a unos 45°C. Se agita el medio o se hacen rotar los recipientes para que se disperse el precipitado y se vierte en placas usando unos 20 ml por cada placa. Las placas deben estar cubiertas parcialmente hasta que se seque la superficie del medio. El medio en las placas debe usarse el mismo día de su preparación.

- c) Agar SS
- d) Agar McConkey
- e) Agar XLD

Xilosa.....	3.5	g
L-lisina.....	5.0	g
Lactosa.....	7.5	g
Sacarosa.....	7.5	g
Cloruro de sodio.....	5.0	g
Extracto de levadura.....	3.0	g
Rojo fenol.....	0.08	g
Agar (desechado).....	13.50	g
Desoxicolato de sodio.....	2.5	g
Tiosulfato de sodio.....	6.8	g
Citrato de hierro y amonio.	0.80	g

pH final 7.4 ±

Se hace una suspensión con 55 g de material deshidratado en un litro de agua destilada. Se calienta agitando frecuentemente, justo hasta que hierva el medio. No debe sobrecalentarse: se transfiere de inmediato al baño maría a unos 50°C. Se vierte en placas tan pronto como se haya enfriado el medio. El medio debe tener un color rojizo y estar claro. El calentamiento excesivo o la prolongada estancia al baño maría produce precipitación.

D. Medios para la identificación bioquímica

- a) Medio de SIM

Peptona de caseína.....	20	g
Peptona de carne.....	6.1	g
Sulfato de hierro y amonio.	0.2	g
Tiosulfato de sodio.....	0.2	g
Agar.....	3.5	g

pH final: 7.3 ± 0.1

Se suspenden 30 g del medio deshidratado en 250 ml de agua destilada, se remojan durante 10 minutos y se añaden 250 ml más de agua destilada agitando frecuentemente. Se lleva a ebullición y se baja la espuma formada con 500 ml de agua destilada, se hierve por un minuto más y se distribuyen en tubos de ensaye (75 x 10 mm de preferencia) en cantidad de 1.75 ml. Si se usan tubos mayores se llenan con un volumen suficiente para alcanzar una altura de 4 cm más o menos. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El aspecto del medio al salir del autoclave, debe ser claro y de color paja. Se deja solidificar en posición vertical.

b) Agar Triple Azúcar Fierro (TSI)

Mezcla de peptonas.....	20 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Lactosa.....	10 g
Sacarosa.....	10 g
Dextrosa.....	10 g
Rojo de fenol.....	0.025 g
Sulfato ferroso amónico....	0.20 g
Tiosulfato de sodio.....	0.20 g
Agar.....	13 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH final: 7.3

Se suspenden 68.425 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se mezcla bien y calienta a ebullición, agitando ocasionalmente hasta completa disolución. Se enfría a 60°C y se ajusta el pH de tal forma que después de la esterilización sea de 7.3 - 0.1.

Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Se distribuye en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Se inclinan los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.0 a 1.5 cm.

c) Caldo Surraco (Caldo sacarosa urea)

Caldo base rojo de fenol...	1.6 g
Urea.....	1.0 g
Sacarosa.....	1.0 g
Agua destilada.....	100 ml

pH final 7.0 ± 0.1

Los ingredientes se disuelven en el agua y se ajusta

el pH con ácido tartárico al 10% (aproximadamente 0.08 ml). Se agrega 0.3 ml de una solución de timol, se envasa el medio en tubos de 13 x 100 ml de presión. Los tubos deben contener aproximadamente 2.0 ml.

d) Caldo Manitol

Caldo base rojo de fenol.....	1.6 g
D-manitol.....	0.5 g
Agua destilada.....	100 ml

pH 7.4

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada. Se ajusta el pH con Na_2CO_3 al 10% (aproximadamente 0.2 ml).

Se envasa en tubos de 75 x 10 mm, con volumen de 1.8 ml aproximadamente. Se esteriliza entre 116 y 118° (no más de 12 libras de presión) durante 15 minutos. No debe sobrecalentarse. El medio es claro, de color rojo-fresa.

e) Caldo Cianuro de Potasio

f) Agar Citrato de Simmons

g) Caldo Malonato

h) Caldo RM-VP

i) Medio LIA

Peptona de gelatina.....	5.0 g
Extracto de levadura.....	3.0 g
Dextrosa.....	1.0 g
L-lisina.....	10.0 g
Citrato de hierro y amonio...	0.50 g
Tiosulfato de sodio.....	0.04 g
Púrpura de Bromocresol.....	0.02 g
Agar (desecado).....	13.5 g

pH final 6.7

Se suspenden 33 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se calienta hasta disolución y se hierve durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C (15 libras de presión), durante 12 minutos. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

4.2.3.5 Procedimiento

A. Enriquecimiento:

Se pesan 15 g de cada muestra de queso obtenidos de

diferentes partes por medio de una espátula estéril; se transfieren primero a un mortero estéril hasta lograr su homogeneización y luego a 120 ml de medio Caldo Tetratiolato (Kawffman), contenido en una botella de dilución.

Se agrega 1 ml de solución verde brillante y 2 ml de solución de yodo (ver soluciones) y se incuba 24 horas a 35°C dejando floja la tapa de la botella.

B. Aislamiento:

Después de la incubación, se agita perfectamente la botella y se inoculan dos placas de los medios sólidos como mínimo de manera que puedan obtenerse colonias bien aisladas para su identificación posterior.

Las placas que contienen los medios Verde Brillante, Sulfito de Bismuto y XLD, deben identificarse perfectamente y anotar la procedencia del inóculo (la letra K puede servir para indicar que proviene del Caldo Tetratiolato o Kawffman). La siembra debe realizarse de tal modo que puedan aislarse las colonias.

Las placas se incuban 24 horas a 35°C y se observan cuidadosamente para identificar las colonias sospechosas de Salmonella.

a) Agar Verde Brillante. Este medio contiene lactosa y sacarosa, un indicador, el rojo de fenol; el inhibidor es el verde brillante. Las colonias de salmonela que no fermentan la lactosa ni la sacarosa, tienen un color rojo o rosa, rodeadas de medio rojo. Las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias amarillas. (83) En la proximidad a colonias de coliformes activas fermentadoras de la sacarosa o lactosa, pueden éstas comunicarles color verdoso. (29)

b) Agar Sulfito de Bismuto. Este medio contiene sulfito de bismuto como agente selectivo. La mayoría de las salmonelas son capaces de reducir el sulfato y el sulfito a sulfuro, produciendo colonias negras con o sin brillo metálico, rodeadas de un halo café, que posteriormente se torna negro. En ocasiones, las colonias pueden ser de color café. (83) Algunas cepas de Salmonella desarrollan un color verde, que es más característico, en este medio, de los coliformes. (29)

c) Agar XLD. Este medio contiene xilosa, lisina y desoxicolato; las colonias de Salmonella son de color rojo

debido a la descarboxilación de la lisina que causa una alcalinización del medio. Las colonias de Salmonella generalmente presentan centro negro por producción de H_2S . Los fermentadores de la lactosa y sacarosa producen colonias amarillas. El desoxicolato se agrega para prevenir el Swarming del Proteus (83) (Swarm: vocablo inglés que significa enjambre; pular).

(...las colonias de coliformes se encuentran rodeadas de halo amarillo que puede llegar a invadir las colonias de Salmonella; 29).

Si no se llegasen a observar colonias características, se proseguirá la incubación 24 horas más. (73)

C. Identificación bioquímica:

Seleccionar al menos dos colonias típicas, sospechosas, que se encuentren bien aisladas, de cada placa. (83)

Transferir con un asa recta de cada colonia seleccionada a una serie de cinco tubos de cultivo sin volver a tocar la colonia con el asa. La serie de tubos de cultivo consiste en:

a) Agar TSI. Este medio se inocula primero por estría y luego por picadura en el fondo del tubo. Contiene tres azúcares, lactosa, sacarosa y glucosa; un indicador para detectar su fermentación y una sal de fierro para detectar la producción de H_2S . (TSI = triple sugar iron). En el agar TSI, la Salmonella produce color rojo en la superficie del tubo (no fermentación de la lactosa) y amarillo en el fondo (fermentación de la glucosa); generalmente con ennegrecimiento del medio (producción de H_2S); las colonias superficiales son de color rosa.

b) Agar SIM (Ácido Sulhídrico, Indol, Motilidad). Este medio contenido en un tubito, se inocula por picadura con la misma asada del medio anterior y sirve para indicar:

- Movilidad. Prueba positiva, crecimiento a lo largo de la picadura y en el seno del medio de cultivo. Prueba negativa, crecimiento a lo largo de la picadura exclusivamente.
- Producción de H_2S . Prueba positiva, aparición de un color negro a lo largo de la picadura que puede extenderse a todo el medio; prueba negativa, ausencia de coloración negra.

c) Agar LIA. Después de inocular el medio anterior, con la misma asada se inocula el agar lisina y fierro (lisin iron agar), primero por estría y luego por picadura. La lisina del medio, al ser descarboxilada por la acción de bacterias como Salmonella y Arizona, produce una amina que eleva el pH, detectándose por medio de un indicador, el púrpura de bromocresol, que hace virar el medio a color púrpura.

Los tubos positivos presentan color morado: la descarboxilación de la lisina hace virar el medio, pero la acidez que se produce le reintegra el color.

d) Caldo Surraco. Este medio se inocula agitando el asa sumergida en el medio líquido. Contiene urea y sacarosa. La hidrólisis de la urea (prueba positiva) se realiza por la enzima ureasa, que al formar amoníaco produce una coloración violeta por el indicador azul de timol; cuando no hay cambio de coloración la prueba es negativa.

La fermentación de la sacarosa (prueba positiva), hace virar el medio a amarillo, en caso negativo no hay cambio de color (hidrólisis de la urea: coloración violeta).

e) Caldo Manitol. Este medio se inocula con la misma asada que los precedentes, agitándola en el interior del medio líquido. La fermentación del manitol hace virar el indicador rojo de fenol a amarillo (83) (prueba positiva).

Los últimos dos medios no existen en preparaciones comerciales, por lo que deben prepararse a partir de su fórmula, cuyos ingredientes sí se pueden adquirir en forma comercial.

La serie bioquímica se incuba 24 horas a 35°C.

Para la identificación de los géneros de las bacterias probadas, se consultan los resultados obtenidos en la tabla "Diferenciación de Enterobacterias Mediante Pruebas Bioquímicas". (83, 73)

Para confirmar la presencia de Salmonella y Arizona, la SSA establece el uso del medio PDS (ver 83).

D. Confirmación serológica:

Las pruebas de aglutinación de las cepas representativamente identificadas como Salmonella conducen al diagnóstico final del género, la especie y el serotipo. (29)

La disponibilidad de sueros flagelares y somáticos para este fin suele estar limitada a laboratorios especializados o de referencia. Para un laboratorio menos especializado el diagnóstico del género se puede dar razonablemente completo mediante el estudio bioquímico y la aglutinación al menos con los sueros polivalentes. Es recomendable enviar las cepas así identificadas al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, para la confirmación del serotipo involucrado. (29)

Tómese siempre en consideración la posibilidad de estar ante un alimento con más de un serotipo de Salmonella contaminante, lo que tiene significado cuando se suscita un problema epidemiológico consecutivo a su consumo. (29)

Si el cultivo presuntivamente identificado como Salmonella se ha estudiado con un buen número de pruebas bioquímicas, puede confirmarse como Salmonella si se obtiene clara aglutinación con el antisuero somático polivalente. (29)

Idealmente debe hacerse tanto una aglutinación con el antisuero "O" polivalente de Salmonella, como con el antisuero "H" polivalente. El primero puede dar falsas reacciones positivas, debido a bacterias de otros géneros pero que comparten con ella algunos antígenos somáticos. Habiéndose realizado una lista conveniente de pruebas bioquímicas, puede darse por confirmado el diagnóstico con aglutinación al antisuero O. El antisuero H es más específico, carácter que sólo pierde ante miembros del género Arizona (este microorganismo se reconoce como un patógeno en términos semejantes a las salmonelas). (29)

(83) La prueba confirmatoria debe realizarse como sigue:

- a) Colocar en la parte superior de una laminilla de portaobjetos una gota de antisuero polivalente O para Salmonella.
- b) Colocar en la parte inferior de la lámina dos gotas de solución salina fisiológica, separadas unos centímetros.
- c) Suspender en cada una de ellas una porción de cultivo del tubo TSI.
- d) Homogeneizar perfectamente.
- e) Mezclar la gota del antisuero con una de las gotas de cultivo homogeneizado.
- f) Agitar la lámina de atrás hacia adelante, observando la presencia de aglutinación. La gota con solución salina sirve como testigo para cepas autoaglutinantes.

4.2.4 Determinación de Cuenta de Estafilococo áureo
Coagulasa Positiva. Método de Baird-Parker
(61, 76, 83, 29, 84)

4.2.4.1 Introducción

La presencia de S. aureus en ciertos alimentos revisa su importancia por tratarse de un microorganismo parásito del hombre y animales superiores y por su capacidad para producir, en determinadas condiciones, una poderosa enterotoxina. (83) Al administrar filtrados estériles del cultivo del germen a voluntarios humanos se reproduce la típica sintomatología de una intoxicación por lo que no se trata de una infección (la enterotoxina es termoestable).

La capacidad para producir la toxina es una facultad más bien limitada a pocas cepas; la existencia de un gran número de estafilococos en un alimento por sí mismo no constituye un riesgo actual en ausencia de enterotoxina, lo que bien puede ocurrir, el consumo del alimento no provoca daño alguno. (29)

Cuando se pone de manifiesto en algún alimento, razonablemente se puede asociar este hecho con una exposición a la contaminación de origen si el animal de donde proviene el alimento sufría o sufre alguna infección piógena. La situación adquiere mayor significado conforme el número encontrado se eleva por arriba de 100 y de 1000 gérmenes por gramo o ml de alimento, y se trata además de cepas coaguladoras de plasma. Esta última circunstancia da al microorganismo un riesgo especial, ya que se sabe que todas las cepas formadoras de enterotoxina coagulan el plasma. (83) Al respecto, el Manual de Prácticas de Microbiología Sanitaria del IPN (29) cita que muchas cepas coagulasa positiva no son enterotoxigénicas y existen incluso, si bien raras, cepas coagulasa negativas y productoras de enterotoxinas.

Mediante concentración y parcial purificación de la toxina se han logrado obtener buenos antisueros y demostrar la existencia, a la fecha, de cinco tipos antigénicos designados A, B, C, D y E. La prueba del gel de Ouchterlony ha resultado especialmente útil y disponiendo de toxinas y antitoxinas de referencia, el ensayo es en la actualidad un hecho corriente en muchos laboratorios del mundo. El recuento de estafilococos en los alimentos, sin embargo, continúa siendo motivo de interés para el bacteriólogo, fundamentalmente por tres propósitos:

- a) Poner de manifiesto deficiencias en el manejo de algunos alimentos.
- b) En el control sanitario de los alimentos. Un número elevado de gérmenes constituye un riesgo potencial.
- c) Continúa siendo utilizado el recuento como un medio para reforzar un diagnóstico clínico y epidemiológico de un brote, en ausencia del ensayo inmunológico.

La presencia de Staphylococcus aureus en los alimentos se reconoce en general como indicación de un manejo sanitario deficiente. El germen causa procesos infecciosos en el hombre y en los animales y se aísla en individuos asintomáticos a partir de la faringe (4-7% en adultos en Estados Unidos e Inglaterra; 40-70% en países escandinavos) (de la mucosa nasal 60-80%). Aunque ésta es con mucho la fuente de contaminación más frecuente del Staphylococcus aureus en los alimentos, es posible también una contaminación indirecta a través del equipo y, desde luego, alimentos de origen animal provenientes de animales con la infección. Como el germen llega a instalarse con cierta facilidad en las personas, es de esperarse un hallazgo más o menos común en los alimentos. Sin embargo, en aquellos que están sujetos a un tratamiento antibacteriano, dada la susceptibilidad del microorganismo a los agentes físicos y químicos, deberán encontrarse libres de células viables del estafilococo. (...29)

La mayoría de los medios de cultivo recurren al empleo de un agente selectivo: el telurito de potasio, o a la incorporación de cloruro de sodio hasta 7.5 y 10%. Los medios de 110 y de Chapman tan utilizados en la bacteriología médica, tienen escaso valor en los alimentos debido principalmente a la abundante y variada flora competitiva que suele encontrarse en estos últimos. (29)

Todos los medios propuestos y corrientemente en uso como selectivos para el Staphylococcus aureus, de alguna manera interfieren también con el crecimiento de este germen. Como en el caso de las salmonelas, el efecto se resiente aún más con células desvitalizadas que resultan de la variedad de tratamiento a los que son sometidos los alimentos durante su procesado. La inhibición a su vez puede ser revertida si se incorporan al medio algunas sustancias, o se aumenta su concentración como ocurre con la yema de huevo, el manitol y el extracto de levadura. Quizá como en ningún otro lado, pueden encontrarse en la literatura comunicaciones de diferentes auto

res en las que lo mismo destacan el valor de un determinado medio que se le señalan serios inconvenientes para el recuento del microorganismo (...29).

Existe una tendencia a utilizar determinado medio de cultivo en ciertos países, generalmente coinciden con el lugar en donde fue diseñado y aplicado por primera vez; el medio de Vogel-Johnson, el agar-telurito-yema de huevo-polimixina y el medio 110 en Estados Unidos; el agar-fenoltaleína-polimixina y Baird-Parker en Inglaterra; el agar-azida-yema de huevo en Suecia y el agar-leche-cloruro de sodio en la URSS. (29)

En la técnica de Baird-Parker el recuento se efectúa directamente en placa por siembra en superficie. En general esta técnica tiene mayor aceptación que muchas otras por su especificidad y porque arroja cifras más reproducibles.

El medio de Baird-Parker posee una gran capacidad para impedir el desarrollo de la flora asociada e incluso de cepas coagulasa negativa de Staphylococcus aureus. Algunos enterococos, micrococos y corinebacterias llegan a desarrollarse y formar colonias negras, pero ninguno clarifica la yema de huevo; las levaduras y bacilos grampositivos que llegan a crecer forman colonias grises. Puede considerarse que las colonias típicas desarrolladas a las 24 horas en este medio, pertenecen a todas las cepas de Staphylococcus aureus coagulasa positiva. El medio, sin embargo, es costoso y pierde mucho de sus características deseables después de 24 horas de preparación.

4.2.4.2 Aparatos y equipo

- . Horno para esterilizar a 180°C
- . Autoclave con termómetro probado
- . Baño de agua con regulador de temperatura de $\pm 0.1^\circ\text{C}$
- . Mortero estéril
- . Balanza con sensibilidad de 0.1 g
- . Cuchillo y espátula estériles
- . Contador de colonias Quebec
- . Asa de platino o nicromel
- . Incubadora con regulador de temperatura
- . Separador de yemas de huevo

4.2.4.3 Materiales, reactivos, soluciones

- . Frascos de dilución con tapón de rosca para contener 99 ml de solución diluyente
- . Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca para contener 9 ml de solución reguladora diluyente
- . Pipetas bacteriológicas de 10 y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml respectivamente
- . Cajas de Petri de 100 x 10 ml
- . Varillas de vidrio de 3.5 mm de diámetro por 20 cm de longitud con un dobléz terminal en ángulo recto de 2 cm
- . Gradilla para tubos
- . Disolución salina

Cloruro de sodio.....	0.85 g
Agua destilada.....	100 ml

Se disuelven y distribuyen en volúmenes de 25 ml para su esterilización a 121° durante 15 minutos.

- . Disolución reguladora diluyente

Se disuelven 34 g de fosfato monopotásico en 500 ml de agua y se ajusta el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1 N. Se esteriliza a 121° durante 20 minutos; se toma 1.25 ml y se completa el volumen a un litro con agua, se distribuye en porciones de 99 y 9 mililitros. Se esterilizan a 121° durante 20 minutos; el pH final debe ser 7.2.

- . Plasma humano o de conejo, diluido volumen a volumen con disolución salina estéril (0.80-0.85%)*

Preparación: Se saca el suero del congelador y se deja el tiempo necesario para que se licúe a temperatura ambiente. Se centrifugan pequeños volúmenes a 2,500 rpm/10 min; se decanta y se puede diluir volumen a volumen (1:1) con la solución salina.

*En este trabajo se utilizó Suero Humano Sistme Fenwal TA-3-M Bolsang Transfer esterilizado y libre de pirógenos Traveler, S. A. de C. V.

4.2.4.4 Medios de cultivo

a) Agar de Baird-Parker

Medio base:

Peptona.....	10 g
Extracto de carne.....	5 g
Extracto de levadura.....	1 g
Cloruro de litio.....	5 g
Glicina.....	12 g
Piruvato de sodio.....	10 g
Agar.....	17 g

Se suspenden 60 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada, se calienta agitando constantemente y se hierve durante un minuto. Se esteriliza a 121°C (15 libras) durante 15 minutos.

El pH final de la base debe ser 6.8.

Medio completo:

Se enfría el medio base estéril a 45-50°C y se agregan 10 ml de una solución al 1% de telurito de potasio estéril y 90 ml de emulsión de yema de huevo. Se homogeneiza y distribuye en cajas de Petri estériles.

Preparación de la emulsión de yema: (83)

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios, desinfectarlos con tintura de yodo. Abrirlos en condiciones asépticas y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas en una probeta estéril hasta medir un volumen de 60 ml y completar a un volumen de 90 ml con solución salina estéril. Transferir a un matraz con trozos de vidrio y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa.

Todo el material utilizado debe ser estéril y se trabajará bajo flujo laminar o en condiciones de esterilidad. Secar la superficie de las placas manteniendo las cajas con las tapas ligeramente abiertas a 37°C durante una hora. Emplear las placas dentro de las 24 horas posteriores a su preparación.

(En el comercio se encuentra a la venta una emulsión de yema de huevo estéril y estabilizada)

b) Caldo Infusión cerebro corazón (BHI)

Infusión cerebro de ternera....	200 g
Infusión corazón de res.....	250 g
Proteosa-peptona.....	10 g
Cloruro de sodio (NaCl).....	5 g
Fosfato disódico.....	2.5 g
Glucosa.....	2 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se disuelven 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se hierva. Se distribuye en tubos de 12 x 75 mm, en volúmenes de 0.3 ml. Esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión. El pH final del medio debe ser 7.4.

4.2.4.5 Procedimiento

Se pesan 11 g de queso, se muelen en un mortero estéril y se transfieren a 99 ml de solución reguladora diluyente estéril contenidos en un frasco de dilución, para obtener así la primera dilución aproximada de 1:10. De esta dilución se toma 1 ml y se pasa a un frasco que contiene 9 ml de solución diluyente estéril para obtener la dilución 1:100. La dilución 1:1000 se prepara pasando 1 ml de la solución 1:100 a 9 ml de solución diluyente estéril contenidos en otro frasco de dilución.

Se coloca 0.1 ml de cada dilución sobre una placa de agar Baird-Parker y se extiende con la varilla de vidrio estéril doblada con soplete en ángulo recto, en toda la superficie. Se emplea una varilla para cada dilución. (Puede emplearse una sola varilla si se comienza a difundir el inóculo de la placa que posee la mayor dilución).

Se incuban las placas invertidas a 35-37° durante 24-48 horas; después de 24 horas se seleccionan las placas que muestren de 50 a 150 colonias aisladas, se cuentan y marcan todas aquellas que aparezcan negras y brillantes con o sin un ligero borde blanco y rodeadas por una zona clara en el fondo del medio opaco, pues se trata de colonias de esta-filococo áureo. Se incuban las placas 24 horas más y se incluyen en el cómputo las nuevas colonias que reúnan las características señaladas.

Se selecciona la caja que contenga más de 150 colonias sospechosas y se efectúa la prueba de la coagulasa.

Prueba de coagulasa:

Se siembra el número de colonias que corresponda según el siguiente cuadro, en tubitos con 0.2 - 0.3 ml de caldo infusión cerebro-corazón y se incuban a 35-37°D durante 24 horas, agregadas de 0.2 ml de plasma diluido 1:1.

Número de colonias sospechosas en la placa	Colonias por probar
Menos de 50	3
51 - 100	5
101 - 150	7

La prueba será positiva si hay formación de coágulo (el coágulo puede ser pequeño pero bien constituido o bien una coagulación total de la mezcla: presencia de la enzima coagulasa).

4.2.4.6 Cálculos y resultados (83, 61)

Se calcula el contenido de microorganismos en el que se tomando en cuenta el número de colonias, la dilución seleccionada para el recuento y el volumen inoculado.

El total de colonias coagulasa positiva en placa se obtiene por regla de tres simple:

Si por ejemplo la dilución seleccionada para el cálculo final es diez a la menos tres (1:1.000) y se contaron 148 colonias, de acuerdo a la tabla, se probarán 7. Si de ellas 5 resultasen positivas a la prueba de la coagulasa, el cálculo final será:

7 colonias	5 positivas
148 colonias	X

X = 105 colonias positivas (en la dilución 10^{-3} de la placa inoculada con 0.1 ml).

Se redondea la cifra a dos dígitos significativos:
105 ----- 100

Como 0.1 ml de la dilución 10^{-3} corresponde a 1 ml de la dilución diez a la menos cuatro, se multiplica el número de colonias por la inversa de esta dilución:

$$100 \times \frac{1}{10^{-4}} = 1\ 000\ 000$$

Se informa como "Cuenta de estafilococo áureo — colonias por gramo de queso".

Si la prueba de coagulasa resulta negativa en todas las colonias probadas, se informa como menos de una colonia/gramo.

4.2.5 Conteo de Hongos y Levaduras (69, 83, 29, 84, 76)

4.2.5.1 Introducción

Los hongos y levaduras son microorganismos que tienen interés como causa de alteración y como elementos biológicos utilizados en la manufactura de algunos alimentos: quesos, cerveza, pan, etc. Ciertos hongos pueden producir al desarrollarse en el alimento, toxinas con efecto en los animales y el hombre, las que genéricamente reciben el nombre de micotoxinas. Los hongos tienen gran ubicuidad en la naturaleza, siendo muy comunes en el polvo y la tierra; las levaduras se desarrollan con facilidad en los utensilios y equipo defectuosamente lavados, que se utilizan en industrias que manejan carbohidratos. El propósito primario de su investigación en el laboratorio consiste en descubrir la exposición a fuentes de contaminación y defectuosa conservación de algunos alimentos. Por ello, la técnica se ha diseñado para estimar su abundancia y no su mera presencia. Investigar cepas toxigénicas carece, hasta el momento de valor práctico. La prueba no se aplica a cualquier tipo de alimento, sino sólo en aquellos en los que de acuerdo con la experiencia, permiten correlacionar su hallazgo por encima de ciertos límites, con prácticas sanitarias defectuosas en la producción y almacenamiento del alimento. (83)

Algunas diferencias que observan los hongos con respecto a las bacterias en las técnicas de recuento en alimentos, incluyen:

- . Una velocidad de crecimiento más lenta que las bacterias
- . La demanda de un ambiente aeróbico

- . La tendencia de algunas especies a desarrollar ex tensivamente sobre las placas de cultivo
- . Una temperatura de crecimiento inferior a la de la mayoría de las bacterias mesofílicas de interés sanitario
- . La formación de colonias considerablemente mayor a las de naturaleza bacteriana y limitadas a la superficie del medio
- . Una tolerancia notable de la mayoría de las especies para desarrollarse en un medio de alta acidez (pH 3 a 4)
- . La resistencia de los hongos y levaduras para desarrollar en concentraciones de muchos antibióticos que resultan fuertemente inhibitorios para las bacterias

Sin merma en la exactitud y precisión, en las técnicas de preparación de la muestra y diluciones, pueden utilizarse las mismas suspensiones preparadas para el recuento de bacterias a partir del alimento. (29)

Incluso, así como para el recuento viable de bacterias se emplean las técnicas de vaciado en placa, extensión en superficie y NMP, se ha señalado recientemente, el éxito en su aplicación para el recuento de hongos.

Los requerimientos nutricionales de los hongos en general no son muy especializados y estrictos; desarrollan con facilidad en casi todos los medios simples de laboratorio. Sin embargo, dada la lentitud en su crecimiento que demanda hasta de cinco días de incubación para evitar la interferencia de bacterias, suele adicionarse al medio de cultivo un agente selectivo; los más utilizados son antibióticos de amplio espectro contra bacterias (aureomicina, cloranfenicol) y la acidificación del medio con ácido orgánico. Los datos reportados por algunos autores muestran que con estos artificios no suele encontrarse una diferencia significativa en los recuentos al utilizar diferentes medios de cultivo: agar-papa-dextrosa, agar malta, agar libre de azúcar o agar cuenta estándar. (29)

Constituyendo la tierra el mayor reservorio de hongos, su contacto con los alimentos fácilmente se traduce en un incremento en la carga microbiana. Al ponerse de manifiesto esto en el laboratorio, se puede condenar al producto, cuando la cifra rebasa límites que previamente han demostrado son im propios de una fabricación higiénica.

En general, simultáneamente con el recuento de hongos puede realizarse el de las levaduras, ya que el medio de cultivo les proporciona también buenas condiciones para su multiplicación. Sin embargo, cuando se presenta un desarrollo excesivo de hongos, difícilmente puede efectuarse el recuento de las colonias de las levaduras. Si tal es el caso y existe la necesidad de practicar su recuento, lo recomendable es preparar doble serie de diluciones e incubar una a 35°C durante 24 a 48 horas, lo que permite desarrollar a las levaduras cuando los hongos aún no cubren las placas. Las colonias de levaduras pueden aparecer sobre la superficie o en el seno de la gelosa. En el primer caso son circulares y de diámetro mayor; en el seno del medio suelen aparecer estrelladas o algo más pequeñas. (29)

Al contar las colonias de hongos en las placas, cuidar de individualizar cada una. Debido a la confluencia ocasional en el desarrollo de colonias cuyo centro no existe o es difícilmente perceptible puede haber cierta dificultad; ésta se elimina o disminuye cuando el recuento se realiza en las primeras 72 horas de incubación.

4.2.5.2 Aparatos y equipo

- . Horno para esterilizar a 180°C
- . Autoclave
- . Baño de agua con control de temperatura $\pm 0.1^\circ\text{C}$
- . Incubadora con control de temperatura
- . Mortero estéril
- . Balanza
- . Espátula
- . Contador de colonias, Quebec
- . Contador manual

4.2.5.3 Medio de cultivo

- . Agar papa dextrosa

Infusión de papa.....	200 g
Dextrosa.....	20 g
Agar.....	15 g
Agua.....	1000 ml

Se suspende la cantidad en gramos necesaria para preparar los ml de medio requeridos, considerando que 39 g del medio deshidratado se diluyen en un litro de agua. El medio

preparado se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121°C. Se enfría a 45-48°C y se acidifica a pH 3.5 con disolución estéril de ácido tartárico al 10% (aproximadamente 1.4 ml de ácido por 100 ml de medio).

4.2.5.4 Materiales y reactivos

- . Frascos de dilución con tapa de rosca para contener 99 ml y tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca para contener 9 ml de disolución reguladora diluyente, en ambos casos + 1% del volumen señalado después de la esterilización
- . Cajas de Petri de 100 x 15 mm
- . Pipetas bacteriológicas de 10 y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml respectivamente
- . Disolución reguladora diluyente: se disuelven 34 g de fosfato monopotásico en 500 ml de agua y se ajusta el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1 N, se esteriliza a 121° durante 20 minutos. Se conserva en refrigeración, se toman 1.25 ml y se completa el volumen a 1000 ml con agua. Se emplean 99 y 9 ml para hacer las diluciones. Se esterilizan los frascos y tubos conteniendo la solución a 121°C durante 20 minutos. El pH final debe ser de 7.2.
- . Disolución estéril de ácido tartárico al 10%

Acido tartárico.....	10 g
Agua destilada.....	100 ml

Se disuelven y esterilizan a 121°C durante 15 minutos.

4.2.5.5 Procedimiento

Se pesan 11 g de queso, se muelen en mortero estéril y se transfieren a 99 ml de solución reguladora diluyente estéril contenidos en un frasco de dilución, para obtener así la primera dilución aproximada de 1:10. De esta dilución se toma 1 ml y se pasa a un frasco que contiene 9 ml de solución diluyente estéril contenidos en un tubo o frasco de dilución.

De cada dilución se coloca un mililitro por duplica-

do en cajas de Petri y se agregan de 12 a 15 ml de agar-papa-dextrosa acidificado, fundido y mantenido a 45-48°C.

Se homogeneiza y se deja solidificar.

Se incuba una serie de placas a 22°C durante tres días primero y luego se continúa hasta cinco días después de su observación y la otra serie a 35°C durante 48 horas.

4.2.5.6 Cálculos y resultados

Se cuentan las colonias de hongos en la serie incubada a 22°C a los tres días, si éstas son ya evidentes sobre las placas. En caso contrario, se contarán hasta los cinco días. Si al cabo de cinco días el desarrollo extensivo no permite el recuento de las colonias, reportar el número obtenido a los tres días haciendo notar en el informe este período de incubación.

Multiplicar la cifra obtenida por la inversa de la dilución correspondiente e informar como "Cuenta de hongos en placas de agar-papa-dextrosa acidificada e incubada durante cinco días a 22°C, por gramo de queso".

Se cuentan las colonias de levaduras en la segunda serie que se incubó a 35°C/48 horas. Generalmente por la acidez y el medio utilizado la interferencia bacteriana es escasa; comprobar mediante frotis los casos dudosos.

Las colonias de levaduras, a diferencia de las de hongos, pueden desarrollar en el seno del agar. (29)

La cifra obtenida (en la caja que permita una mayor claridad para la cuenta), se multiplica por la inversa de la dilución y se reporta como colonias de levaduras por gramo de muestra.

RESULTADOS

A. EVALUACION DE LA LECHE

Las técnicas para el análisis de la leche destinada a seguir su transformación en queso tipo Oaxaca, tanto por el procedimiento industrial como por el procedimiento rústico, se practicaron conforme a la metodología descrita en los incisos correspondientes, obteniéndose los resultados siguientes:

a) Procedimiento Industrial

Leche de Recepción

Análisis	1	2	3	4	5	Promedio
% Grasa	3.5	3.3	3.4	3.5	3.6	3.46
Densidad (valor corregido)	1.031	1.032	1.032	1.031	1.030	1.0312
% Sólidos totales	11.96	11.97	12.09	11.96	11.83	11.962
Neutralizantes	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	-
Punto de congelación	-0.550	-0.555	-0.550	-0.545	-0.560	-0.552
Acidez °D	16	18	18	15	16	16.6
Prueba del alcohol	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	-

b) Procedimiento Rústico

Leche de Recepción

Análisis	1	2	3	4	5	Promedio
% Grasa	3.4	3.5	3.4	3.5	3.6	3.48
Densidad (valor corregido)	1.032	1.031	1.031	1.032	1.032	1.0316
% Sólidos totales	12.09	11.96	11.84	12.21	12.33	12.08
Neutralizantes	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	-
Punto de congelación	-0.550	-0.555	-0.560	-0.555	-0.550	-0.554
Acidez °D	16	17	15	17	18	16.6
Prueba del alcohol	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	-

B. PROCEDIMIENTOS DE ELABORACION

En los cuadros siguientes se presentan los resultados obtenidos en los puntos más importantes de los procedimientos industrial y rústico. En conjunto, permiten seguir el curso de la elaboración en cada una de las cinco pruebas realizadas, hasta el momento del malaxado y el número de kg de queso obtenidos.

a) Procedimiento Industrial

Acondicionamiento y coagulación de la leche	P r o c e d i m i e n t o					Promedio
	1	2	3	4	5	
Volumen de leche (litros aprox.)	410	420	400	400	440	414
Grasa inicial g/lit	35	33	34	35	36	34.6
Estandarización (%)	2.7	3.0	2.8	2.9	2.8	2.8
Acidez inicial (°D)	16	18	18	15	16	16.6
Acidez postpasteurización (°D)	19	20	19	16	18	18.4
Litros de cultivo	8.2	8.4	8	8	8.8	8.28
Acidez del cultivo (°D)	70	72	70	75	68	71
Acidez al momento de cuajar (°D)	23	21	20	20	22	21.2
Temperatura de congelación (°C)	31	32	30	32	31	31.2
Mililitros de cuajo (1)	62	63	60	60	66	62.2
Mililitros de cloruro de calcio (2)	82	84	80	80	88	82.8
Mililitros de colorante (3)	23.5	24	23	23	25	23.7
Tiempo de coagulación (min.)	30	28	35	30	25	29.6
Tratamiento de la Cuajada. Suero:						
Acidez al corte (°D)	14	15	12	14	15.5	14.1
Acidez al momento de desuerar (°D)	20	20	20	20	20	20
Acidez al momento de malaxar (°D)	28	28	28	28	28	28
Producción:						
Kg de queso obtenidos	25	26	22.8	25	29.3	25.6

- (1) Entre 0.01-0.02%
- (2) 0.01% Ver 3.1.8.5.2.4
- (3) 0.006%

b) Procedimiento Rústico

Acondicionamiento y coagulación de la leche	P r o c e d i m i e n t o					Promedio
	1	2	3	4	5	
Volumen de leche (litros aprox.)	360	380	360	400	390	378
Grasa g/lt	34	35	34	35	36	34.8
Acidez inicial (°D)	16	17	15	17	18	16.6
Acidez de la leche de adición (°D)	70	65	75	60	73	68.6
Volumen de leche adi- cionada (1)	31	29	37	33	21	30.2
Volumen final	391	409	397	433	411	408.2
Acidez al momento de cuajar (°D)	22	22	22	22	22	22
Temperatura de coagu- lación (°C)	22	25	23	23	20	22.6
Mililitros de cuajo (2)	39	40	40	45	41	41
Mililitros de cloru- ro de calcio (3)	20	20	20	20	20	20
Mililitros de colo- rante (4)	23	25	24	26	25	24.6
Tiempo de coagula- ción (min.)	20	25	30	20	25	24
Tratamiento de la Cuajada. Suero:						
Acidez al corte (°D)	18	17	18	17	19	17.8
Acidez al momento de desuerar (°D)	20	20	20	20	20	20
Acidez al momento de malaxar (°D)	28	28	29	28	28	28
Producción:						
Kg de queso obtenidos	25.5	26.5	26.8	28	28.2	27.0

(1) Ver 3.2.6.3

(2) 0.01%

(3) 0.01% o menos

(4) 0.006%

C. CONTROL DE CALIDAD

Las especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas descritas con anterioridad se practicaron en varias unidades de producto, siguiendo un plan de muestreo basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-R-18. (77)

Muestreo:

La producción de queso, considerada en lotes* se compuso por unidades pequeñas de 1/2 y 1 kg, por lo que se tomaron muestras al azar constituidas por (n) unidades de producto (ver tabla) y se procedió a verificar su calidad.

TABLA PARA MUESTREO

Tamaño del lote Número de piezas (N)	Tamaño de la muestra Número de muestras (n)
2 - 8	2
9 - 15	2
16 - 25	3
26 - 50	5
51 - 90	5
91 - 150	8
151 - 280	13
(...)	

El número de piezas de 1/2 kg y de 1 kg dependió de la demanda o pedido vigente; sin embargo, el número de kilogramos de queso obtenidos fue más constante, consecuencia de utilizar más o menos la misma cantidad de leche en cada prueba; por ello la unidad de muestra, para simplificar el muestreo, se consideró de 1 kg, cuantificando dos piezas de 1/2 kg por una.

El número de piezas para efectuar las determinacio-

*Lote. Es la cantidad de unidades de producto fabricadas esencialmente bajo las mismas condiciones de operación y que puede ser manejado como una parte de la producción. DGN. R-49-1965. (75)

nes fisicoquímicas y microbiológicas se obtuvo entonces al confrontar los kilogramos de queso obtenidos con la tabla de muestreo:

a) Procedimiento Industrial

Muestreo	P r u e b a				
	1	2	3	4	5
Número de muestras	3	5	3	3	5

b) Procedimiento Rústico

Muestreo	P r u e b a				
	1	2	3	4	5
Número de muestras	3	3	3	5	5

a) Procedimiento Industrial

Especificaciones Fisicoquímicas

	Humedad % máx	ST % mín	Cenizas %	Prot. %	Grasa %	Valor pH	Fosfatasa
PRUEBA 1							
Muestra 1	48	52	5.0	24	23	5.0	Negativa
2	47	53	5.1	25	24	5.1	Negativa
3	47	53	5.3	24	24	5.15	Negativa
PRUEBA 2							
Muestra 1	48	52	5.5	25	25	5.2	Negativa
2	49	51	5.2	24	23	5.1	Negativa
3	46	54	5.0	25	25	5.2	Negativa
4	47	53	4.9	25	23	5.0	Negativa
5	48	52	5.1	25	24	5.0	Negativa
PRUEBA 3							
Muestra 1	48	52	4.9	26	23	5.15	Negativa
2	48.5	51.5	4.8	24	22.5	5.0	Negativa
3	47.5	52.5	5.0	23.5	23	4.9	Negativa
PRUEBA 4							
Muestra 1	48	52	5.0	26	24	4.8	Negativa
2	47	53	5.2	25	23	4.7	Negativa
3	46	54	5.2	25	24	4.9	Negativa
PRUEBA 5							
Muestra 1	46	54	4.9	24	25	5.0	Negativa
2	47	53	5.2	24	24	5.0	Negativa
3	48	52	5.0	25	23	4.9	Negativa
4	49	51	5.1	23.5	23	4.7	Negativa
5	49	51	5.2	23	23	4.9	Negativa
PROMEDIO	47.5	52.3	5.0	24.5	23.6	4.9	-

b) Procedimiento Rústico

Especificaciones Fisicoquímicas

	Humedad % máx	ST % mín	Cenizas %	Prot. %	Grasa %	Valor pH	Fosfatasa
PRUEBA 1							
Muestra 1	47	53	5.1	25	29	4.9	Negativa
2	48	52	5.0	24	29.5	5.0	Positiva
3	47	53	5.2	25	29.5	5.1	Positiva
PRUEBA 2							
Muestra 1	47	53	5.2	24	31	4.9	Positiva
2	49	51	5.0	25	31.5	4.9	Negativa
3	46	54	5.4	26	30.5	4.8	Negativa
PRUEBA 3							
Muestra 1	48	52	5.1	24	29	5.0	Positiva
2	47	53	5.2	25	28.5	5.0	Positiva
3	47	53	5.2	25	29.5	5.12	Positiva
PRUEBA 4							
Muestra 1	47	53	5.4	24	30	5.0	Positiva
2	47.5	52.5	5.3	23	30.5	5.1	Positiva
3	48	52	5.0	23	30.5	5.0	Negativa
4	48	52	5.1	23.5	30	4.9	Negativa
5	46	54	5.4	24	31	5.0	Negativa
PRUEBA 5							
Muestra 1	47	53	5.1	24	31	4.9	Positiva
2	48	52	5.2	25	31	4.95	Positiva
3	48	52	5.1	24.5	32	5.0	Positiva
4	47	53	5.1	25	31	5.2	Negativa
5	47	53	5.1	26	31.5	5.2	Positiva
PROMEDIO	47.3	52.6	5.1	24.4	30.3	4.9	-

a) Procedimiento Industrial

Especificaciones Microbiológicas

	P R U E B A															Prom.				
	1			2					3			4			5					
	1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	1		2	3	4	5
Cuenta de organismos coliformes en placas de agar rojo-violeta-bilis 24 hr/35° colonias/gramos (ver 4.2.1)	15,000	3,200	10,000	400	800	450	550	680	960	7,000	5,000	60	160	230	1,700	5,500	3,200	2,900	5,100	3,309.5
Cuenta de organismos coliformes fecales (NMP) gérmenes/gramo (ver 4.2.3)	6	3	6.2	12	16	15	20	7.2	3	6.2	6	24	29	20	3.6	12	6.2	3	9.2	10.9
Investigación de Salmonella colonias/15 g (ver 4.2.3)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
Determinación de cuenta de estafilococo áureo coagulasa positiva col/g (ver 4.2.5)	4,000	2,000	-	1,000	2,000	2,000	1,500	2,000	-	2,000	500	8,500	6,000	8,500	2,000	35,000	45,000	5,000	3,000	6,947
Cuenta de hongos colonias/gramo (ver 4.2.5)	200	10	100	20	-	-	30	-	400	200	100	7,800	450	100	5,500	20,000	7,000	3,000	54,000	5,205
Cuenta de levaduras colonias/gramo (ver 4.2.5)	30	60	300	10	1,500	900	3,100	10	100	800	-	20,000	18,000	32,000	850	29,000	17,000	58,000	4,700	9,914

b) Procedimiento Rústico

Especificaciones Microbiológicas

(*)	P R U E B A										Prom.
	1		2		3		4		5		
	1-2	3	1-2	3	1-2	3	1-2-3	4-5	1-2-3	4-5	
Cuenta de organismos coliformes en placas de agar rojo-violeta-bilis 24 hr/35° colonias/gramo (ver 4.2.1)	1'200,000	2'400,000	5'500,000	520,000	1'200,000	1'400,000	1'000,000	1'200,000	1'200,000	190,000	1'581,000
Cuenta de organismos coliformes fecales (NMP) gérmenes/gramo (ver 4.2.3)	1,110	160	42	20	24	210	9.2	20	44	290	192.9
Investigación de Salmonella colonias/15 g (ver 4.2.3)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Salmonella sp.	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
Determinación de cuenta de estafilococo áureo coagulasa positiva col/g (ver 4.2.4)	130,000	19,000	20,000	130,000	75,000	180,000	130,000	4,500	100,000	180,000	96,800
Cuenta de hongos colonias/gramo (ver 4.2.5)	150,000	480,000	320,000	78,000	51,000	80,000	96,000	1'000,000	400,000	100,000	275,500
Cuenta de levaduras colonias/gramo (ver 4.2.5)	130,000	580,000	Más de 1'000,000	Más de 1'000,000	740,000	Más de 2'000,000	300,000	Más de 1'000,000	Más de 1'000,000	Más de 1'000,000	725,000

*Por razones de tiempo y material, el número de especificaciones se redujo a dos.

ANALISIS Y DISCUSION

A. EVALUACION DE LA LECHE

La elaboración de queso tipo Oaxaca con leche procedente de un mismo proveedor (el Instituto de Investigaciones Pecuarias de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos), permitió obtener algunas ventajas; la uniformidad de su calidad, en las distintas pruebas y en los distintos procedimientos, se debe, además del origen, a las características de manejo con que se lleva una explotación con fines de investigación y desarrollo ganadero.

Las pruebas seleccionadas para la evaluación de la leche, se incluyeron por ser prácticas, económicas y de gran importancia en la fabricación de queso, como es el caso de la grasa, acidez, neutralizantes, etc. Algunas de ellas fueron motivo de una mayor profundización por involucrarse directamente durante el procedimiento de elaboración.

Los promedios y los resultados individuales obtenidos para cada una de las pruebas de evaluación que se practicaron a la leche, se encuentran dentro de rangos muy satisfactorios tanto para el procedimiento industrial como para el rústico.

Consideramos, independientemente del origen y naturaleza de la leche analizada, que únicamente un conjunto de pruebas específicas, aunado a conocimientos sobre la composición de la leche y su variabilidad, así como información de la manera en que la leche fue obtenida, transportada, etc. permiten dictaminar con mayor acierto y apegados a un criterio de evaluación adecuado, si la leche es o no apta para su transformación en queso en una planta de lácteos.

B. PROCEDIMIENTOS DE ELABORACION

La descripción del procedimiento industrial com-

prende los puntos más relevantes de la fabricación del queso tipo Oaxaca; su exposición en forma secuencial permite seguir el proceso con el acercamiento necesario y la explicación que se ofrece en cada uno de los incisos, aunque incompleta, cumple con los objetivos precisos del trabajo.

La depuración y la estandarización de la leche imprimen desde el inicio la característica industrial del procedimiento y, por ende, se demuestra la necesidad de que el proceso sea enteramente conducido por profesionales de la leche.

La pasteurización, que además de destruir los gérmenes patógenos, se traduce en productos de calidad más uniforme y con menos defectos de fabricación, es un tema que se trata breve y sustancialmente para dar paso a la elaboración de cultivos lácticos, requisito esencial para la elaboración de un buen queso.

La importancia de la microbiología como ciencia auxiliar de la lactología, queda demostrada ampliamente en este inciso de los fermentos lácticos. Los microorganismos, que intervienen en la leche y los productos láctos como factores de alteración, de enfermedades e intoxicaciones alimenticias, son también, desde el punto de vista técnico, indispensables para la elaboración de productos lácteos, pues confieren las características principales de sabor, aroma, etc. a los productos a través de los compuestos producidos en las distintas fermentaciones microbianas. Su importancia es, pues, indiscutible. Son el alma del queso. (En este inciso se procuró destacar esta importancia y el uso inteligente que debe hacerse de los microorganismos lácteos, especialmente de aquellos que se seleccionan para la fabricación de queso).

El procedimiento rústico no cubre, en razón de su naturaleza, complicaciones técnicas mayores; sin embargo, se describe en circunstancias en las que se cuenta con un mínimo de tecnología y conocimientos. Sabemos que en muchas regiones del país este mínimo no existe ni podrá encontrarse en mucho tiempo; un ejemplo de ello constituye la apreciación organoléptica de la acidez de la leche y el suero, en vez de recurrir al acidímetro y al uso de una solución de sosa valorada.

En el procedimiento rústico no existe un control sobre la flora de la leche y las consecuencias negativas de ello son siempre posibles; además, desde un punto de vista técnico, la constante variación de dicha flora en cantidad y calidad, produce resultados variables y difícilmente se consigue una estandarización rigurosa del producto, hoy día im-

prescindible para una demanda adecuada en el mercado.

En los dos procedimientos se utilizó cuajo de buena calidad para reducir los sólidos esenciales de la leche a una forma concentrada. La humedad que se separa de la cuajada más o menos completamente por división mecánica, agitación e intervención de la acidificación, constituye un factor esencial que determina la conservación del queso y sus propiedades principales.

Los aspectos anteriores se describieron en los incisos Proteínas y Coagulación de la Leche y Tratamiento y Manipulación de la Cuajada. En el primero se presenta un resumen de carácter técnico que resalta la variedad de interacciones físicas, químicas y de tipo biológico que tienen lugar entre los componentes de la leche durante la coagulación. En el segundo, se pone de manifiesto la importancia de crear, mediante el desuerado y el trabajo de la cuajada, las condiciones favorables al desarrollo de los procesos microbiológicos y enzimáticos, de influencia definitiva para determinar el tipo de queso a elaborar.

En ambos procedimientos, el malaxado se realiza cuando la pasta se encuentra dentro de ciertos límites de acidez, lo que permite que el queso adquiera elasticidad y se pueden formar las tiras para trenazarlas según la creatividad del fabricante.

Los procedimientos de elaboración, pero especialmente el industrial por ser su descripción más detallada, se ilustraron con un ejemplo de 400 litros por considerarse representativo para ambos procedimientos.

Cuatrocientos litros de leche con 3.4% de grasa, permiten derivar la materia prima en la obtención de crema, preparación de cultivos y descremado del suero en el procedimiento industrial; en el rústico, representan un volumen de empleo frecuente en la elaboración de queso. En ambos casos, el ejemplo puede servir de base o simplemente como referencia para cualquier volumen de leche aproximado, ajustando en cada caso las variantes en la composición de la leche y los subproductos, así como para realizar las modificaciones del procedimiento y tecnología que resulten más eficientes y produzcan un mayor rendimiento quesero sin perder calidad.

C. CONTROL DE CALIDAD

Especificaciones Fisicoquímicas

El análisis fisicoquímico de un alimento permite valorarlo en muchos aspectos, entre ellos, el nutricional. Tratándose de quesos, el contenido en humedad es distinción y referencia para agrupar a los quesos en blandos, semiduros y duros. Las pruebas seleccionadas para determinar humedad y sólidos totales, se complementan específicamente con las determinaciones de cenizas, proteínas (contenido nutricional característico del queso), y de materia grasa, también importante componente de la dieta humana, especialmente la grasa de origen animal.

Los productos deben adquirirse y pagarse en base a la calidad de sus nutrientes, por ello, las técnicas para su determinación se encuentran muy difundidas y existen normas y manuales de referencia oficiales e internacionales.

Los resultados obtenidos en las cinco determinaciones fisicoquímicas anteriores, practicadas a las muestras de queso de ambos procedimientos, se encuentran dentro de lo esperado; ello se debe, además de la buena calidad de la leche utilizada, a que en el procedimiento industrial, el descremado fue calculado y controlado; en el procedimiento rústico, el descremado es prácticamente nulo y la totalidad de la grasa láctea interviene en la elaboración, aumentando el rendimiento.

Otro tipo de pruebas son relevadoras del proceso o del estado en que se encuentra el producto; es el caso de la determinación de pH y la prueba de la fosfatasa. Con relación a esta última, la metodología propuesta por el AOAC (40) y la APHA (2), no pudo aplicarse para determinar la cantidad de enzima por razones de tipo técnico y administrativo. Sin embargo, el uso de la prueba cualitativa, práctica y económica, demostró su utilidad en ambos procedimientos. Los quesos elaborados en el procedimiento industrial resultaron fosfatasa negativa, lo cual es perfectamente coherente por haberse utilizado leche pasteurizada. Los resultados obtenidos al practicar la prueba a los quesos elaborados con el procedimiento rústico, en términos generales, fueron fosfatasa-positivos, lo que demuestra que el agua caliente que se aplica a la pasta durante el malaxado no es suficiente para afirmar que se cumple la pasteurización. La fosfatasa se inactiva únicamente en las porciones de cuajada que entran en contacto directo con el agua caliente.

Especificaciones Microbiológicas

Las especificaciones microbiológicas: Cuenta de organismos coliformes, Cuenta de organismos coliformes fecales, Investigación de Salmonella, Determinación de estafilococo áureo coagulasa positiva, Conteo de hongos y levaduras, se seleccionaron por su importancia higiénico-sanitaria en el autocontrol del procedimiento de elaboración y con el objeto de ser consideradas en el momento de establecer, como primer paso, una Norma de Calidad para el queso tipo Oaxaca, y posteriormente, como pruebas de importancia para determinar criterios microbiológicos.

Las técnicas bacteriológicas son por lo general complejas y los caminos a seguir en una investigación de este tipo son muy variables. Por ello es muy importante realizar las con los criterios y pautas de referencia oficial para que los resultados sean comparables y el dictamen verdadero. Debe insistirse, además, en que se lleven a cabo por personal capacitado. En un trabajo como este hubiera resultado inconveniente detallar todas y cada una de las operaciones necesarias para llegar a identificaciones de grupo y diferenciación dentro de ellos; no obstante, la primera técnica ofrece una descripción más minuciosa del procedimiento, con el objeto de facilitar, en alguna medida, la ejecución de las técnicas siguientes.

Del análisis de los resultados obtenidos se desprenden diferencias muy importantes entre los dos procedimientos. El procedimiento industrial asegura, en gran medida, la obtención de productos con cuentas bacterianas "bajas" y la ausencia de Salmonella en todas las muestras analizadas.

El procedimiento rústico, por el contrario, muestra las cuentas bacterianas "elevadas" como resultado de utilizar leche cruda en la elaboración. Además, el descuido y contaminación del producto por parte de los manejadores, puede deducirse al observar que en una de las muestras, baja en coliformes fecales, se encontró Salmonella.

D. RENDIMIENTO QUESERO DE LOS DISTINTOS COMPONENTES DE LA LECHE

El rendimiento quesero de los distintos componentes de la leche, dada su importancia científica y económica, ha sido objeto de múltiples estudios por diferentes autores y

se han propuesto varias fórmulas y procedimientos para su de terminación. El rendimiento constituye una forma de análi-
sis de la leche, del procedimiento y del producto que deter-
minan la rentabilidad económica de un proceso en que se
transforma una materia prima valiosa por sí misma. Por ello,
el rendimiento se incluye aquí como un breve paréntesis pero
aspirando a que se consulten en la literatura, otros aspek-
tos prácticos y de interés general.

Las sales de la leche se encuentran disueltas en su
mayor parte. La cuantía en que pasan al queso viene regula-
da por la proporción de suero residual de la cuajada y fluc-
túa casi siempre entre el 3 y el 5%. Se exceptúan las sales
de calcio y fósforo, una buena proporción de las cuales pasa
a la cuajada.

El rendimiento en lactosa depende del tipo de queso.
Lo más corriente es que sea sólo del 5 al 7%. (13)

El rendimiento en grasa se relaciona estrechamente
con las particularidades tecnológicas que concurren en la fa-
bricación de cada tipo de queso. En el queso tipo Oaxaca,
existen dos puntos en el procedimiento de elaboración, en
donde se reduce significativamente la cantidad de grasa que
pasa al queso, lo que obliga a partir de una leche que posea
aproximadamente 2.78% de grasa para obtener un producto que
contenga un mínimo de 23% de grasa láctea.

La estandarización de la leche permite obtener crema
como subproducto y derivarla como una línea económica parale-
la a la fabricación de queso. Como la elaboración de crema
es un tema muy amplio y fuera de nuestros objetivos principa-
les, juzgamos conveniente que el lector cubra esta deficien-
cia recurriendo a la literatura especializada y al capítulo
III referente a Cremas, del Reglamento de Productos Deriva-
dos de la Leche y Substitutos de Ellos, de la Secretaría de
Salubridad y Asistencia. (81)

La posibilidad de utilizar la crema como materia pri-
ma para la elaboración de mantequilla, representa otra alter-
nativa en la producción de derivados lácteos.

Los dos momentos durante el procedimiento de elabora-
ción de queso tipo Oaxaca, en los que el contenido graso de
la leche disminuye considerablemente, son, primero, al momen-
to de cortar y desuerar la cuajada; en el suero permanecen
todos los glóbulos grasos no aprisionados al formarse la ma-
lla de caseína (es por ello que el rendimiento graso está
siempre ligado al contenido de proteínas). En el ejemplo

TABLA V
DISTRIBUCION DE LA GRASA

400 litros de leche 3.4% grasa (13,600 g)	Estandarización (ver 3.1.2.2 y 3.1.2.4)	4.5 litros de crema con 57.5% grasa = 2,587.5 g \pm 395.5 litros de leche de quesería con 2.78% grasa = 10,995 g*					
	Cuadrado de Pearson (ver 3.1.2.5)	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="padding: 5px;">23 litros de crema</td> <td style="padding: 5px;"> { 4.58 lt con 57.5% grasa = 2,633.5 g 18.42 lt con 57.5% grasa (10,591.5 g) </td> <td rowspan="2" style="padding: 5px; vertical-align: middle;"> } 395.4 lt de leche de quesería con 2.77% grasa = 10,968.5 g* </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">377 lt de leche descremada con 0.1% grasa = 377 g</td> <td></td> </tr> </table>	23 litros de crema	{ 4.58 lt con 57.5% grasa = 2,633.5 g 18.42 lt con 57.5% grasa (10,591.5 g)	} 395.4 lt de leche de quesería con 2.77% grasa = 10,968.5 g*	377 lt de leche descremada con 0.1% grasa = 377 g	
	23 litros de crema	{ 4.58 lt con 57.5% grasa = 2,633.5 g 18.42 lt con 57.5% grasa (10,591.5 g)	} 395.4 lt de leche de quesería con 2.77% grasa = 10,968.5 g*				
	377 lt de leche descremada con 0.1% grasa = 377 g						
Descremado y Estandarización	Substitución (ver 3.1.2.6)	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="padding: 5px;">23 litros de crema</td> <td style="padding: 5px;"> { 5.44 lt con 57.5% grasa = 3,128 g 17.56 lt con 57.5% grasa (10,097 g) </td> <td rowspan="2" style="padding: 5px; vertical-align: middle;"> } 377 lt de leche de quesería con 2.77% grasa (10,460 g)** </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">377 lt de leche descremada con 0.1% grasa = 377 g</td> <td style="padding: 5px;"> { 359.5 lt con 0.1% grasa (359.5 g) 17.56 lt con 0.1% grasa = 17.56 g </td> </tr> </table>	23 litros de crema	{ 5.44 lt con 57.5% grasa = 3,128 g 17.56 lt con 57.5% grasa (10,097 g)	} 377 lt de leche de quesería con 2.77% grasa (10,460 g)**	377 lt de leche descremada con 0.1% grasa = 377 g	{ 359.5 lt con 0.1% grasa (359.5 g) 17.56 lt con 0.1% grasa = 17.56 g
23 litros de crema	{ 5.44 lt con 57.5% grasa = 3,128 g 17.56 lt con 57.5% grasa (10,097 g)	} 377 lt de leche de quesería con 2.77% grasa (10,460 g)**					
377 lt de leche descremada con 0.1% grasa = 377 g	{ 359.5 lt con 0.1% grasa (359.5 g) 17.56 lt con 0.1% grasa = 17.56 g						

*El volumen que se extrae para la preparación de cultivos no se considera porque vuelve a adicionarse a la leche de quesería.

**Este ejemplo no se siguió en la práctica.

presentado, la grasa del suero representa un 38.2% de los 10,995 g de grasa de la leche estandarizada. En segundo lugar, la grasa que se desprende al momento de realizar el malaxado, significa un 14.1% del contenido graso de la leche de quesería. Con el objeto de ubicar los porcentajes descritos, en la Tabla V (pág. 405) se analiza nuevamente la distribución de la grasa láctea.

La grasa de la leche de quesería, según describimos con anterioridad, se distribuye en grasa del suero, grasa del agua del malaxado y grasa del queso. Si tomamos como ejemplo la leche estandarizada, los porcentajes se reparten como sigue:

+ 395.5 litros de Leche de quesería con 2.78% grasa (10,995 g = 100%)	}	-Grasa del suero (38.2%) 280 lt de suero con 1.5% grasa = 4,200 g
		-Grasa del agua del malaxado (14.1%) 40 lt de agua con 3.9% grasa = 1,560 g
		-Grasa del queso (48.7%) 22.83 kg con 23% grasa = 5,251 g

Resta por estudiar los beneficios que se obtendrían al homogeneizar la leche de quesería, pues se sabe que este proceso asegura un mayor rendimiento graso debido a que los glóbulos grandes reducen su diámetro y se aumenta la cantidad de los mismos retenidos en la cuajada.

La relación caseína:grasa, el tiempo de coagulación, la dureza de la cuajada, etc. son otros de los factores que deben tenerse presentes antes de juzgar el rendimiento graso.

El rendimiento en caseína, es decir, la proporción que de la contenida en la leche pasa al queso y por tanto se aprovecha, depende fundamentalmente de la relación existente entre sus fracciones alfa, beta, gamma. La caseína gamma no coagula bajo la acción del cuajo, por lo cual el rendimiento en caseína es tanto menor cuanto mayor sea la contribución de esta fracción al contenido total en caseína. (13) Otros factores que determinan el rendimiento en caseína y que fueron expuestos en su oportunidad, comprenden el tamaño en que se cortan los granos de cuajada, la pasteurización, adición de cloruro de calcio, etc., los cuales deben conocerse y manejarse para lograr el máximo rendimiento sin variar el tipo de queso.

Según se dijo anteriormente, existen muchas fórmulas

propuestas para conocer el rendimiento de los distintos componentes de la leche que pasan al queso; con fines prácticos y de apreciación, el rendimiento quesero puede calcularse de la siguiente manera:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{kg de queso obtenidos}}{\text{Litros de leche utilizados}} \times 100$$

Si aplicamos esta fórmula a las cantidades obtenidas en la elaboración de queso tipo Oaxaca, se traduce en un rendimiento muy bajo en virtud de los litros utilizados para producir 1 kg de queso, según puede apreciarse en los cuadros siguientes:

Procedimiento Industrial

	P R U E B A					Prom.
	1	2	3	4	5	
Litros de leche utilizados	410	420	400	400	440	414
Kg de queso obtenidos	25	26	22.8	25	29.3	25.6
Rendimiento en %	6.0	6.1	5.7	6.2	6.6	6.12
Litros de leche/kg de queso	16.4	16.1	17.5	16	15	16.2

Procedimiento Rústico

	P R U E B A					Prom.
	1	2	3	4	5	
Litros de leche utilizados	391	409	397	433	411	408.2
Kg de queso obtenidos	25.5	26.5	26.8	28	28.2	27.0
Rendimiento en %	6.5	6.47	6.75	6.46	6.86	6.2
Litros de leche/kg de queso	15.3	15.4	14.8	15.4	14.5	15.08

Consideramos que estos rendimientos podrían incrementarse si se practican algunas modificaciones en el procedimiento de elaboración. Por ejemplo, podría estudiarse el efecto que sobre el rendimiento se produciría al desuerar a niveles de acidez menores a 20°D, es decir, dejar que la cuajada se acidifique sin estar en contacto con la totalidad del suero, pues de este modo el enturbiamiento visible del suero se traduce en disolución y extracción de muchos componentes que de otro modo permanecerían en la cuajada.

E. EL QUESO COMO ALIMENTO

El queso es un producto lácteo que se ubica en el extremo de la secuencia: mamífero-leche-productos lácteos; tres elementos concatenados exclusivamente para beneficio del hombre.

Indiscutiblemente, el primer elemento es el ganado productor. La función principal de la producción animal es proporcionar proteína, energía, minerales y vitaminas que suplementan y enriquecen el valor de los cereales, legumbres y demás componentes de la dieta humana, proporcionando así variedad y placer al paladar.

El ganado vacuno lechero, como especie rumiante, cobra una gran importancia en la producción de proteína animal, debido a las ventajas que tiene frente a los animales no ruminantes. Los ruminantes en general pueden obtener una buena parte de sus necesidades energéticas y proteicas de alimentos que no pueden convertirse directamente en alimentos para el consumo humano.

La producción lechera se basa en la capacidad de las hembras de los animales mamíferos para producir leche, que posee un elevado valor nutritivo para la especie humana.

El hombre ha criado y seleccionado animales durante siglos, que son capaces de producir leche en cantidades que en la actualidad superan bastante las necesidades para la alimentación de sus crías, y esta leche excedente ha sido destinada para la alimentación humana.

Para que la población sea alimentada de una manera correcta deberá incrementarse mucho la producción de proteína animal; en nuestro caso, a través de ruminantes productores.

res de leche.

La actividad lechera nacional mostró, durante la década 70-79, un incremento en la producción del 48.2%, logrando de este modo una tasa media anual de crecimiento del 4.5% al pasar de 4,482 millones de litros en 1970 a 6,461.9 en 1979. Esto representa una evolución productiva bastante aceptable superior a la elevada tasa anual de crecimiento demográfico del 3.5% en el mismo periodo. (21)

No obstante que el crecimiento de la producción de leche y su estructura distributiva se ha manifestado casi uniforme a lo largo del periodo 70-79, éste no ha sido suficiente para superar el déficit establecido por el consumo y la demanda industrial, lo que ha ocasionado un incremento constante en las importaciones de leche en polvo a un ritmo promedio anual del 9%, pasando de 36.3 a 78.5 millones de toneladas, en los años en cuestión, de donde resulta una propensión media a importar del 9.6% respecto de la producción interna. (21)

México es un país con enorme potencial productivo, mismo que le permitiría, superados los obstáculos de la productividad, presentar cifras de producción mucho mayores en el ramo de la leche.

En la actualidad, el déficit nacional de leche es muy alarmante (el considerado en 1977 fue de 5,546'700,000 litros teniendo en cuenta una población de 64.6 millones de habitantes (...27) y puede incrementarse a niveles más altos si continúa la misma tendencia de la década 70-79.

El destino y la utilización de la producción nacional de leche se mantuvo sin cambios substanciales en la década 70-79. Se observa que el consumo directo de la población de leche bronca se mantiene alrededor de 45% del total producido, 24% se destina a la pasteurización y la industria lechera absorbe arriba del 31% canalizándose de este porcentaje un 20% a la industria de derivados lácteos. (21)

La elaboración de productos lácteos no puede alcanzar una estabilidad y un nivel adecuados cuando la producción de leche es insuficiente, desorganizada o relegada.

En la secuencia mamífero-leche-productos lácteos, la leche ocupa un lugar intermedio pero es el centro motor y regulador de los extremos.

La leche debe tener un destino cuidadosamente planea

do desde que se encuentra en la ubre de la vaca. Esto es posible cuando todos los factores que hacen de la producción de leche una ciencia, se encuentran en niveles aceptables y en manos de personas preparadas y conscientes.

La calidad de la leche al salir de la ubre debe variar únicamente en la medida deseada y programada o dentro de los rangos fisiológicos esperados para el animal o el hato. Naturalmente debe evitarse que cualquier otro tipo de alteraciones modifiquen las características esperadas del producto.

Quando el hombre interviene directamente sobre la leche, desde su obtención hasta el destino final, ésta se convierte en un indicador del avance social, por ejemplo, el consumo de leche cruda, que puede constituir un grave riesgo de salud, tiende a desaparecer del mercado de consumo en los países con alto grado de evolución social e industrial, los cuales no sólo utilizan la leche óptimamente, sino de manera variada y creativa.

En el mismo sentido, pensamos que el consumo de queso, en cantidad, variedad y calidad, aumenta conforme la población de un país posee los elementos de análisis suficiente para llegar a valorar correctamente a la leche y los productos lácteos.

Los productos lácteos, siguiendo el orden señalado, ocupan la tercera posición por razones naturales.

El queso es un producto lácteo que encontramos en casi todas partes del mundo; sus antecedentes deben buscarse a través de la historia del mamífero y la leche; en esta búsqueda, han sido de gran utilidad numerosos textos (jeroglíficos, bíblicos, etc.) y otros testimonios que aluden a la domesticación de los animales de ordeño.

Es muy probable que la producción quesera sea el resultado de un descubrimiento fortuito por el hecho de haber transportado leche en el estómago de un animal en un clima cálido. La leche se transformaría rápidamente y las enzimas del estómago actuarían sobre ella para formar la cuajada o una masa coagulada, que sería rápidamente fraccionada por el movimiento del transporte. Este produciría la sinéresis o la separación del suero para dejar el queso o coágulo primitivo. (22) (Esto debió ocurrir innumerables veces antes de que se diera el pequeño paso siguiente de separar mecánicamente la cuajada).

Es interesante resaltar que la producción de queso representa principalmente una imitación de lo que pasa cuando un becerro mama a una vaca, y que los métodos modernos, aunque altamente perfeccionados, corresponden en principio a todas las fases de este método primitivo, a saber, acidificación de la leche caliente, efecto del cuajo, ruptura del coágulo seguido de la separación del suero. (22)

En términos generales, la fabricación de queso puede ser caracterizada como la conversión de un alimento perecedero con gran contenido de humedad (leche) en un alimento compacto, con bajo contenido de humedad, de larga conservación y de alto valor nutritivo. La propiedad de conservación es principalmente función del contenido de humedad (...22).

Los procedimientos de elaboración se han perfeccionado por ensayo y error, combinando factores como tipo de leche, cuajo empleado, temperatura, acidez, grado de coagulación, prensado, grado de salinidad, etc. pero definitivamente, el avance más significativo fue propiciado por la serie de descubrimientos y aportaciones de la bacteriología, la química y otras ciencias auxiliares de la lactología, cuando empezaron a estudiarse y prepararse en los laboratorios los cultivos iniciales puros. Al mismo tiempo, los misterios del proceso de maduración y las complejas interacciones bioquímicas de los microorganismos que determinan el aroma, sabor, etc. de los productos lácteos, empezaron a ser objeto de estudios e investigaciones.

Los descubrimientos y las constantes innovaciones hacen que la elaboración actual de queso se haya convertido en una disciplina de orden químico, biológico, bacteriológico y técnico.

Una de las razones de la conservación de la leche en queso es lograr una prolongación de las características fundamentales de los elementos constitutivos de la leche, e incluso mejorar su aspecto y apetencia para el consumidor.

La leche destinada a la fabricación de queso puede proceder, teóricamente de cualquier hembra mamífera doméstica, pero es bien sabido que la mayor parte se obtiene de la leche de vaca. El empleo de las leches de oveja, cabra, etc. depende del reparto censal de estas especies, pero definiti-

vamente forman parte de la definición del queso, por ello el Reglamento de Productos Derivados de la Leche y Substitutos de Ellos (81) dice que se entiende por "Queso" el producto sano hecho de la cuajada obtenida de la leche entera, parcialmente descremada o totalmente descremada, de vaca o de otra especie de animales, con adición de crema o sin ella; por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos u otra enzima apropiada y con o sin tratamiento posterior de la propia cuajada por calentamiento, presión o por medio de fermentos de maduración, mohos especiales o sazónamientos.

Otras definiciones dejan a un lado la especie animal, por ejemplo, Carlos Compairé Fernández cita en su libro algunas definiciones de queso, de las cuales extraemos la siguiente: "el producto de la maduración de la cuajada procedente de la coagulación determinada con el cuajo o por la acidificación de la leche pura, de la nata de ella retirada o de la leche desnatada parcial o totalmente, no adicionada con sustancia alguna, exceptuando los productos propios de la fabricación quesera normal, como los fermentos, la sal, especias, colorantes especiales, etc.", o bien, "es el producto que resulta de someter la leche en determinadas condiciones, a la acción de una sustancia denominada cuajo, la que, separando elementos que pasan a formar el suero, reúne los restantes en una masa llamada cuajada, sobre la que se ejercen ciertas manipulaciones y a las que sigue un proceso de fermentación".

La transcripción de las distintas definiciones que se ha dado al queso podría ser interminable; no existe una definición universal, sino algunas más o menos acertadas, completas o sumarias. La enorme diversidad de quesos exige en cada caso una definición particular, porque cada tipo de queso es único; además, el número de ingredientes autorizados en el queso varían mucho de un país a otro (citemos por ejemplo acidificadores, cuajo, cloruro de calcio, cloruro de sodio, nitrato de sodio, caroteno, ácido ascórbico, nisina, resinas, etc.), lo cual obliga necesariamente a individualizarlos.

Por otro lado, la simple denominación del queso no indica necesariamente el país o lugar de origen, ya que la moderna técnica quesera ha permitido desligar estas fabricaciones de las condiciones naturales o costumbres locales que en su día dieron origen a determinados tipos y variantes, y hoy se obtienen, al menos los más apreciados, en cualquier lugar del mundo donde la industria quesera está asentada so-

bre bases científicas; no obstante, debe reservarse la denominación característica para cada queso solo cuando procede del lugar de origen y en cambio debe añadirse a su nombre la palabra "tipo o estilo" o bien otra que indique el país donde se ha fabricado cuando éste no sea de origen típico. En la actualidad existen tantas variedades que resulta imposible una clasificación adecuada.

o

Los alimentos cubren necesidades de diferente tipo, algunos proporcionan la energía necesaria para las necesidades fisiológicas, físicas, reproductivas, etc. de cada individuo, así como de mantenimiento del estado de salud, crecimiento y/o reparación de tejidos, etc.; otros tienen importancia psíquica (apetencia, satisfacción, etc.).

Las necesidades varían con los individuos y dependiendo de su estado (senectud, enfermedad, embarazo, etc.). De cualquier modo, la calidad de la alimentación puede evaluarse según su contenido de proteínas.

El queso como producto lácteo rico en proteínas, cobra una importancia plenamente justificada como elemento de calidad en la alimentación y puede utilizarse en donde quiera que se desee mejorar el estado nutricional de una población.

El queso como alimento, se coloca en una categoría aparte en virtud de sus cualidades.

Es rico en proteínas de alta calidad (contenido en aminoácidos esenciales), materia grasa, calcio, fósforo y otros elementos nutritivos, comprendiendo ciertas vitaminas, por lo que cumple en gran parte los requerimientos de una alimentación sana y completa.

Según el tipo de queso, ofrece las materias nutritivas de la leche en forma más digerible debido a las acciones enzimáticas de los fermentos iniciadores.

Ningún otro alimento permite tanta variación como el queso, variedades que ofrecen gusto y composición diferentes para satisfacer a todo género de edades y poblaciones; constituye igualmente un proveedor importante de nutrientes para algunas personas que no gustan o no pueden beber leche (ello

puede deberse a razones fisiológicas, por ejemplo, alergia a la caseína o a la albúmina, intolerancia a la lactosa, galactosemia, etc.). En el caso de los bebés y niños de esta categoría, la eliminación de la leche de su alimentación podría resultar en un aporte insuficiente de calcio y riboflavina, por ejemplo.

El queso, como cualquier otro producto lácteo representa la culminación de un largo y complejo proceso productivo y contribuye noblemente a que la lactología se consolide como una ciencia de progreso y evolución social.

o

Teniendo en cuenta el valor nutritivo extraordinario del queso, debería hacerse lo imposible para aumentar la producción, por disminuir el costo y el precio en los países de bajo consumo, (22) para que por ningún motivo se consideren artículos extraños al presupuesto hogareño.

La producción quesera, en términos generales, va en aumento en la mayoría de los países, pero el consumo por habitante fluctúa o tiende a disminuir, sobre todo en aquellos países que no poseen una tradición o una verdadera industria quesera.

Desde el punto de vista alimenticio, siempre hay lugar para emprender campañas oficiales en los países donde el consumo de queso es bajo para enseñar a las poblaciones a consumir mucho más, a menos que el consumo de leche sea elevado. No hay que olvidar que el valor nutritivo implica más que un análisis de la composición química de la proteína, etc., la digestibilidad, el sabor, el color, etc., tienen igualmente una importancia considerable. (22)

Hay muchos medios para educar al público a aprovechar las grandes posibilidades de variación y de interés gastronómico ofrecidos por los numerosos tipos de queso existentes en el mundo entero. (22)

La producción de queso es baja relativamente en los países o regiones calurosas; sin embargo, cuando se dispone de leche, se elaboran leches fermentadas o quesos frescos. Las temperaturas atmosféricas elevadas en dichas regiones, hacen difícil producir leche de calidad higiénica satisfacto

ria y poder madurar el queso a baja temperatura. Es por ello que los quesos frescos continuarán representando a la producción quesera mientras no se implementen las condiciones tecnológicas.

El queso Oaxaca es precisamente uno de los representantes más sobresalientes en las regiones calurosas y especialmente porque puede elaborarse a partir de leche que no reúne las características para ser considerada dentro de alguna de las clasificaciones sanitarias especificadas en el actual reglamento. (82)

Las regiones o países donde la producción quesera es elevada, disfrutan de grandes posibilidades de variación y deleite gastronómico. El arte tradicional es indispensable para mantener la variedad de la producción quesera actual.

Parece inevitable la concentración de la producción quesera en grandes fábricas con la aplicación de procedimientos destinados a regular la calidad y a rebajar el precio de venta. Es de desear que esta concentración no lleva a una uniformidad demasiado grande, a la creación de tipos indefinidos, o a la desaparición de algunas fábricas tradicionales. (1)

Debe llegarse a un equilibrio que no modifique el papel que le corresponde al queso como uno de nuestros alimentos más importantes, nutritivos y sabrosos.

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

La elaboración de queso tipo Oaxaca, al igual que la producción de cualquier otro derivado lácteo, necesariamente refleja la situación lechera del país. Por ello, paralelamente a todos los esfuerzos para el mejor aprovechamiento de la leche, deben aplicarse medidas eficaces para incrementar la producción de leche en el país.

El queso Oaxaca, además de ser una forma de conservación de la leche, principalmente en lugares muy carentes de tecnología, en tanto que queso fresco, desempeña un papel nutricional importante en las regiones calurosas, especialmente por elaborarse a partir de leche ácida.

La elaboración de queso tipo Oaxaca de acuerdo al procedimiento descrito y apegado al que se realiza en el Centro Nacional de Lactología, del Instituto Nacional de la Leche, condujo a la obtención de rendimientos muy bajos, por lo que se sugiere se estudie la posibilidad de realizar las modificaciones necesarias para disminuir el número de litros utilizados en la producción de 1 kg de queso, sin mermar la calidad del producto.

Únicamente la vigilancia continua y el estricto apego a la disciplina científica de la elaboración de queso, permiten obtener productos de óptima calidad.

Desde el punto de vista industrial, si se desea obtener 23% de grasa en el producto terminado, debe partirse de leche entera o ligeramente descremada. Esto se debe a que durante el procedimiento de elaboración la grasa se separa más acentuadamente que en otros quesos. Este alto contenido de grasa puede hacer incosteable la producción si no existen los medios para recuperar e industrializar los subproductos de fabricación.

Sugerimos se lleve a cabo un estudio complementario que tenga por objeto la obtención de un producto con menor contenido graso, 18% por ejemplo y comparar la rentabilidad, aceptación, especificaciones y legislación.

Por lo que respecta al Control de Calidad, éste no

sólo debe realizarse disciplinariamente como autocontrol de la producción, sino que las especificaciones y exigencias del mismo deben corresponder a la realidad y a las necesidades locales donde se practique.

El establecimiento de las características y especificaciones de un producto terminado, constituyen el primer paso en la reglamentación. Por ello sugerimos a continuación un Anteproyecto de Norma de Calidad para Queso tipo Oaxaca, en donde se proponen, en razón de su importancia, algunas especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, basadas en los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas en el procedimiento industrial y rústico.

En la elaboración rústica de queso tipo Oaxaca, el agua caliente que se aplica a la pasta durante el malaxato de la misma, no es suficiente para afirmar que se cumple la pasteurización. La fosfatasa se inactiva únicamente en las porciones de cuajada que entran en contacto directo con el agua caliente.

Las especificaciones microbiológicas propuestas pueden servir como referencia para determinar el grado de variación permisible en las cuentas microbianas; sugerimos se continúe el proceso de reglamentación sanitaria realizando estudios que permitan establecer criterios microbiológicos que operen en las distintas zonas y poblaciones del país obtenidos a partir de las cuentas máximas, medias y mínimas de cada germen y su correlación con la gravedad de los padecimientos de salud en la población de estudio.

ANTEPROYECTO DE
NORMA OFICIAL MEXICANA PARA "QUESO OAXACA"

Elementos Preliminares:

Portada: Es preparada a criterio de la Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial

Prefacio: 1a. Parte
(Responsabilidad de la SEPAFIN; comprende la enumeración de los organismos que participan en la elaboración de la Norma)

2a. Parte
Esta norma se elaboró para consolidar la producción fabril, impulsar la industria y favorecer el desarrollo industrial

Contenido

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. REFERENCIAS
3. DEFINICION
4. CLASIFICACION Y DESIGNACION DEL PRODUCTO
5. ESPECIFICACIONES
6. MUESTREO
7. METODOS DE PRUEBA
8. MARCADO, ETIQUETADO, ENVASE Y EMBALAJE
9. ALMACENAMIENTO
10. BIBLIOGRAFIA

Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana
para Queso Oaxaca

0. INTRODUCCION

Las especificaciones que se establecen en esta norma sólo podrán satisfacerse cuando en la elaboración del producto se utilicen materias primas e ingredientes de calidad sa-

nitaria, se apliquen buenas técnicas de elaboración, se realicen en locales e instalaciones bajo condiciones higiénicas, que aseguren que el producto es apto para el consumo humano, de acuerdo con el Código Sanitario de los Estados Unidos Mexicanos, sus reglamentos y demás disposiciones de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

Esta norma tiene por objeto establecer las especificaciones características del producto llamado queso Oaxaca en el momento de su exposición o venta.

2. REFERENCIAS

Para la aplicación correcta de esta norma es necesario consultar las siguientes Normas Oficiales Mexicanas vigentes:

Especificaciones Fisicoquímicas

NOM-F-98	Alimentos. Determinación de Proteínas Determinación de Proteínas en Quesos
NOM-F-100	Alimentos. Determinación de Extracto Etéreo (Grasa). Método de Roesse Gottlieb Determinación de Extracto Etéreo (Grasa) en Quesos
NOM-F-317 S	Alimentos. Determinación de pH Determinación de pH en Alimentos
NOM-F-66 S	Determinación de Cenizas Determinación de Cenizas en Alimentos
NOM-F-83	Alimentos. Determinación de Humedad Determinación de Humedad en Productos Alimenticios
	Determinación de Fosfatasa Cuando se considere necesario se emplearán los métodos del "Official Methods of Ana-

lysis of The Association of Analytical Chemist"

NOM-F-111 Alimentos. Determinación de Sólidos Totales. Método de Prueba para la Determinación de Sólidos Totales en Quesos Procesados

Especificaciones Microbiológicas

NOM-F-295 Muestreo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico

NOM-F-286 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para Análisis Microbiológicos

NOM-F-187 Determinación del Número más Probable de Gérmenes

NOM-F-253 Cuenta de Bacterias Mesofílicas Aerobias

NOM-F-254 Cuenta de Organismos Coliformes

NOM-F-308 Cuenta de Organismos Coliformes Fecales

NOM-F-304 Método General de Investigación de Salmonella en Alimentos

NOM-F-310 Determinación de Cuenta de Estafilococo Aureo Coagulasa Positiva en Alimentos

NOM-F-255 Método de Conteo de Hongos y Levaduras en Alimentos

NOM-BB-14 Clasificación y Tamaños Nominales para Utensilios de Vidrio, usados en Laboratorio

3. DEFINICION

Para los efectos de esta norma se establece la siguiente definición:

"Queso Oaxaca" es el producto obtenido de leche pasteurizada, entera o parcialmente descremada de vaca y/o ca-

bra, adicionada o no de cultivos lácticos y cuajada en condiciones definidas de temperatura y tiempo, siendo la pasta de suerada en forma mecánica, pasando a ser estirada y enfriada, teniendo una consistencia semiblanda, de color y sabor definidos. Se presenta en porciones trenzadas.

4. CLASIFICACION Y DESIGNACION DEL PRODUCTO

El producto objeto de esta norma se clasifica en un tipo con un solo grado de calidad designándose como queso Oaxaca elaborado con leche pasteurizada entera o semidescremada de vaca y/o cabra.

5. ESPECIFICACIONES

El queso Oaxaca elaborado con leche pasteurizada entera o semidescremada de vaca y/o cabra debe cumplir con las especificaciones siguientes:

5.1 Sensoriales

Color. Blanco amarillento, cuya intensidad variará de acuerdo al contenido graso de la leche o a la adición de colorante.

Olor. Debe ser característico del queso fresco y no presentar signos de rancidez u otro olor extraño.

Sabor. Debe ser característico, fresco, ligeramente ácido y salado y exento de sabores desagradables.

Aspecto. Debe ser de queso fresco, brillante, de consistencia blanda y agradable.

5.2 Físicas y Químicas

El queso Oaxaca elaborado con leche pasteurizada entera o semidescremada de vaca y/o cabra debe cumplir con las especificaciones físicas y químicas anotadas en la siguiente table.

TABLA 1

Especificaciones Físicas y
Químicas para Queso Oaxaca

Especificaciones		
Proteínas.....	Mínimo 24	%
Grasa.....	Mínimo 23	%
Sólidos Totales.....	Mínimo 52	%
Humedad.....	Máximo 48	%
Cenizas.....	Mínimo 5.0	%
pH.....	5.0	
Fosfatasa.....	Negativa	

5.3 Microbiológicas

El producto objeto de esta norma no debe contener microorganismos patógenos, toxinas microbianas e inhibidores microbianos y debe cumplir con las especificaciones anotadas en la siguiente tabla:

TABLA 2

Especificaciones Microbiológicas
para Queso Oaxaca

Especificaciones		
Organismos Coliformes.....	Máximo 5,000	col/g
Coliformes Fecales.....	Menos de 10	col/g
Salmonela.....	Negativo en 20 g	
Estafilococo áureo coagulasa positiva.....	Máximo 1000	col/g
Hongos y Levaduras.....	Máximo 20	col/g

5.4 Materia Extraña

El producto objeto de esta norma debe estar libre de fragmentos de insectos, pelos y excretas de roedores, así como cualquier otra materia extraña de origen animal o vegetal.

5.5 Contaminantes Químicos

El producto objeto de esta norma no deberá contener ningún contaminante químico en cantidades que puedan representar un riesgo para la salud. Los límites máximos para estos contaminantes quedan sujetos a lo que establezca la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

5.6 Ingredientes Básicos

- Leche pasteurizada entera o semidescremada de vaca y/o cabra
- Sal yodatada (cloruro de sodio: NaCl) en proporción no mayor de 0.5-0.6% en el producto terminado (salado directo 5-6 g/kg)

5.7 Aditivos Alimentarios

Se pueden emplear los siguientes aditivos permitidos por la Secretaría de Salubridad y Asistencia:

- Cloruro de Calcio (CaCl_2) en proporción no mayor de 0.02% (20 g/100 litros)
- Cultivos lácticos iniciadores (estreptococos lácticos) 1-2% (1-2 l/100 litros de leche)
- Cuajo u otras enzimas coagulantes adecuadas
- Annato (bija o semilla de achiote) y caroteno, solos o en combinación, en proporción no mayor de 0.006% (6 ml/100 litros de leche)

6. MUESTREO

- 6.1 Cuando se requiere el muestreo del producto, éste podrá ser establecido de común acuerdo entre productor y com-

prador, recomendándose el uso de la Norma Oficial Mexicana NOM-R-18.

6.2 Muestreo Oficial

El muestreo para efectos oficiales estará sujeto a la legislación y disposiciones de la dependencia oficial correspondiente.

7. METODOS DE PRUEBA

Para la verificación de las especificaciones físicas, químicas y microbiológicas y otras que se establecen en esta norma se aplicarán los métodos de prueba que tiene establecidos la Dirección General de Laboratorios en Salud Pública de la Secretaría de Salubridad y Asistencia y, en su caso, por los Métodos de Prueba de las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes, que se indican en el capítulo de referencia (véase 2).

8. MARCADO, ETIQUETADO, ENVASE Y EMBALAJE

8.1 Marcado y Etiquetado

8.1.1 Marcado en el envase

Cada envase del producto debe llevar una etiqueta o impresión permanente, visible e indeleble con los siguientes datos:

- Denominación del producto y materia prima empleada en la fabricación (véase A.2)
- Nombre comercial o marca comercial registrada, pudiendo aparecer el símbolo del fabricante
- El "contenido neto" de acuerdo con las disposiciones de la Secretaría de Comercio (véase A.3)
- Razón social o nombre del fabricante y domicilio donde se elabora el producto

- Fecha de elaboración
- Consérvese en refrigeración
- La leyenda "Hecho en México"
- Lista de ingredientes en orden de concentración decreciente (leche entera, cultivos lácticos, sal yodatada, cloruro de calcio y colorante)
- Texto de las siglas Reg. S.S.A. No. _____ "A" debiendo figurar en el espacio el número de registro correspondiente
- Los porcentos del contenido de grasa, proteínas y humedad
- Otros datos que exija el reglamento respectivo o disposiciones de la Secretaría de Salubridad y Asistencia

8.1.2 Marcado en el Embalaje

Deben anotarse los datos necesarios para identificar el producto y todos aquellos datos que se juzguen convenientes, tales como las precauciones que deben tenerse en el manejo y uso de los embalajes y envases.

8.2 Envase

El producto objeto de esta norma se debe envasar en un material resistente e inocuo, que garantice la estabilidad del mismo, que evite su contaminación y no altere su calidad ni sus especificaciones sensoriales.

8.3 Embalaje

Para el embalaje del producto objeto de esta norma se deben usar cajas de cartón o de algún otro material apropiado que tenga la debida resistencia y que ofrezca la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro, a la vez que facilite su manipulación en el almacenamiento y la distribución de los mismos, sin exponer a las personas que las manipulan (véase A.4).

9. ALMACENAMIENTO

El producto terminado debe conservarse en locales que reunan los requisitos sanitarios que señala la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

APENDICE A

- A.1 Las normas NOM que se mencionan en esta norma corresponden a las normas DGN vigentes de la misma letra y número.
- A.2 Se consideran como productos genuinos los que son elaborados con los componentes naturales y procedimientos especiales que les han dado nombre en el lugar de origen.
- A.3 Las especificaciones de envase y embalaje que deben aplicarse para cumplir con 8.1.1 y 8.1.2 serán las correspondientes a las Normas Oficiales Mexicanas de envase y embalaje específicas para cada presentación y gramaje del producto.

10. BIBLIOGRAFIA

- . S.S.A. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Reglamento de Productos Derivados de la Leche y Substitutos de Ellos.
- . Proyecto de Normas Microbiológicas y Químicas para el Control Sanitario del Agua, Bebidas y Alimentos (1974).
- . Reglamento para el Registro de Comestibles, Bebidas y Similares.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALAIS, CHARLES
 - a) Cience du Lait. Principes de Technologie Laitelière 3ème. Edition. Edition Publicité Sep. 1974.
 - b) Ciencia de la Leche. Principios de Técnica Lechera. Versión castellana de la 2a. Edición. Compañía Editorial Continental, S. A. (CECSA), 2a. reimpresión, 1980.
2. APHA. American Public Health Association
Standard Methods for the Examination of Dairy Products.
13th. Edition. Elmer H. Marth Ph. D. Editor. 1977.
3. ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION
Norme Expérimental V 08-012. Microbiologie Alimentaire.
Directives Générales pour le Dénombrement des Coliformes et le Dénombrement des Escherichia coli.
4. BABEL, FREDERICK JOHN
Homologation du "50-50" como coagulant pour la production Fromagère. Aspects Nouveaux dans la Production Fromagère Internationale. Publié par Chr. Hansen's Laboratorium, S.A. 1974.
5. BATH, DICKINSON, TUCKER, APPLEMAN
Dairy Cattle. Principlos, Practices, Problems, Profits,
2nd. Edition, Lea & Febiger, Philadelphia. 1978.
6. BERGEY'S MANUAL of Determinative Bacteriology. Buchanan R. E. and Gibbons N. E. Eight Edition, The Williams and Wilkins Company/Baltimore, 1973.
7. CARPENTER, PHILIP, L.
Microbiología. 4a. Edición, Ed. Interamericana, 1979.
8. COMPAIRE FERNANDEZ CARLOS
Quesos. Tecnología y Control de Calidad. Ministerio de Agricultura. Manuales Técnicos. Serie No. 43. 2a. Edición. Madrid 1976.

9. CONN E. ERICH y STUMPF, P. K.
Bioquímica Fundamental. 2a. Edición. Ed. Limusa, 1975.
10. DAVIS, B. D., DULBECCO, R., EISEN, H. N., GINSBERG, H. S., WOOD, W. B.
Tratado de Microbiología. Primera Edición, 1970. Reimpresión 1975. Salvat Editores.
Tratado de Microbiología. Segunda Edición, 1978. Reimpresión 1979. Salvat Editores.
11. DEMETER, KARL J.
Lactobacteriología. Ed. Acribia, 1979.
12. DEMETER y ELBERTZHAGEN
Elementos de Microbiología Lactológica. 6a. Edición.
Editorial Acribia. 1979.
13. DILANJAN, S. Ch.
Fundamentos de la Elaboración del Queso. Ed. Acribia.
1976.
14. DOUGHERTY y col.; W. F. SHIPE y col.
Physiological Mechanisms Involved in Transmitting Flavors and Odors to Milk
I. Contribution of Eructated gases to milk flavor.
II. Transmission of some flavor components of silage.
Journal of Dairy Science: vol. 45, 472-480 (1962)
15. FAO
Estudios sobre Nutrición No. 27. La Leche y los Productos Lácteos en la Nutrición Humana, por S. K. Kon. Segunda Edición revisada. Roma 1972.
16. FAO
Lechería Latinoamericana: Vol. 3, 45-48, 1971.
17. FAO-OMS
Programa Conjunto sobre Normas Alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Comité Mixto FAO-OMS de Expertos Gubernamentales sobre el Código de Principios Referentes a la Leche y los Productos Lácteos. 7a. Edición. CAC/M 1-1973.
18. FLORES MENENDEZ, J. A.
Bromatología Animal. 1a. Edición. Ed. Limusa, 1975.
19. FRAZIER, W. C.
Microbiología de los Alimentos. 2a. Edición. Ed. Acribia. 1a. Reimpresión 1976.

20. FUENTE DE LA, G.
La Importancia de la Industrialización de la Leche. Memorias del curso de actualización "Industrialización de la Leche", INL y CPAEL, 24, 25 y 26 de abril de 1980.
21. FUENTE, DE LA, G., TREJO, R.
Programa Integral para el Desarrollo Lechero. Nueva Lactología Mexicana. Organó Informativo de la Comisión Nacional para el Fomento de la Producción y Aprovechamiento de la Leche. Año 1, número 1, febrero 1981.
22. GILBERT, J. D.
La production Fromagère de l'Avenir. Aspects Nouveaux dans la Production Fromagère Internationale. Publié par Chr. Hansen's Laboratorium, S. A. 1974.
23. GUERULT, M. ANTOINE
La Fromagerie Devant les Techniques Nouvelles. 2ème. Edition. Editions Sep. Paris 1er. 1966.
24. HARVEY, C. Wm., HILL, H.
Leche, Producción y Control. Traducción de la 4a. Edición inglesa. Ed. Academia 1979.
25. HEIDRICH, H. J., RENK, W.
Enfermedades de las Glándulas Mamarias en los Animales Domésticos. Editorial Labor, S. A. 1969.
26. HOLUM, JOHN, R.
Introducción a los Principios de Química. Ed. Limusa, 1978.
27. INL. Instituto Nacional de la Leche
Análisis y Perspectivas de la Actividad Lechera Nacional. Gaceta del INL. Organó Informativo del INL. Año 1, No. 2, 1979.
28. INL. CENALAC. Instituto Nacional de la Leche. Centro Nacional de Lactología. Principios Técnicos Generales de la Fabricación de Quesos.
29. IPN. Instituto Politécnico Nacional. Escuela de Ciencias Biológicas. Manual de Prácticas de Microbiología Sanitaria. 3a. Edición. México, D. F.
30. JAWETZ, E., MELNICK, J., ADELBERG, A.
Manual de Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno. 1973 (Traducción de la 10a. Edición 1972).

31. KOSIKOWSKI, FRANK
Cheese and Fermented Milk Foods. Second Edition. Published by F. V. Kosikowski and Associates, 1978.
32. KOSIKOWSKI, F. V. y MACQUOT, G.
Recientes Progresos en la Tecnología del Queso. Colección FAO. Estudios Agropecuarios No. 38 Roma 1958.
33. LEHNINGER, ALBERT
Bioquímica. 1a. Edición. 5a. Reimpresión. Ediciones Omega 1972.
34. LENOIR, JEAN
Principes de Technologie Fromagère. La Preparation des Caillés. ACTIM, 1981.
35. LERCHE, MARTIN
Inspección Veterinaria de la Leche. Ed. Acribia 1969.
36. MCKENZIE, HUGH, A.
Milk Proteins. Chemistry and Molecular Biology. Vol. I and II. Academic Press, 1970.
37. MURILLO, HECTOR
Tratado Elemental de Química Orgánica. 12a. Edición. Editorial ECLAL, S. A. 1973.
38. NICKERSON, R. J., SINSKEY, J. A.
Microbiología de los Alimentos y sus Procesos de Elaboración. Ed. Acribia 1978.
39. NIELS JØRGEN TOFTE JESPERSEN
Cultures Lactiques Concentrées. Aspects Nouveaux dans la Production Fromagère Internationale. Publié par Chr. Hensen's Laboratoriums, S. A. 1974.
40. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 12th. Edition. William Horwitz, Editor, 1975.
41. OPS. Organización Panamericana de la Salud
Publicaciones Científicas No. 84. Normas para el Examen de los Productos Lácteos. Traducción de la 11a. edición del Standard Methods for the Examination of Dairy Products (ver 2).
42. OROZCO, FERNANDO D.
Análisis Químico Cuantitativo. 7a. Edición. Editorial Porrúa, S. A., 1973.

43. RAMOS CORDOBA
Leche. Su Producción Higiénica y Control Sanitario. 2a. Edición actualizada y ampliada. Publicado por el autor, 1969.
44. RAMOS CORDOBA
Manual de Métodos de Análisis de Leche y Lacticinios. Publicado por el autor, México, D. F. 1976.
45. R.C.W. DANIEL, D.A. BIGGS y D.A. BARNUM
The relationship between California Mastitis Test Scores and Monthly Milk Production and Composition. Canadian Veterinary Journal: Vol. 7 No. 5 99-105 (1966).
45. REITER, BRUNO
Review of the Progress of Dairy Science: Antimicrobial Systems in Milk. Journal of Dairy Research 45: 131-137 (1978).
47. REMIGTON
Farmacia Práctica de Remigton. Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana. Copyright 1953.
48. REVILLA, R. A.
Tecnología de la Leche. Procesamiento, Manufactura y Análisis. 5a. Edición. Ed. Herrer Hnos. Sucesores, S. A. 1976.
49. SARH. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Subsecretaría de Ganadería. Estimaciones del Instituto Nacional de la Leche, 1979.
50. SCHALM, O. W., CARROL, E. J., JAIN, N. C.
Bovine Mastitis. Lea & Febiger, Philadelphia 1971.
51. SCHMIDT, G. H.
Biología de la Lactación. Editorial Acribia 1974.
52. SCHMIDT, G. H., VAN VLECK, L. D.
Bases Científicas de la Producción Lechera (Principles of Dairy Science, 1974). Editorial Acribia, 1975.
53. SELLARS, R. L., BABEL, F. J.
Cultures for the Manufacture of Dairy Products. Published by Chr. Hansen's Laboratory Inc. Revised Edition, 1978.
54. SOCIETY OF DAIRY TECHNOLOGIE
Manual de Plantas de Pasteurización. Traducido del inglés por el Dr. José María Tarragona V. Editorial Acribia, 1971.

55. STUART, PATTON
Milk Scientific American, Offprints. Vol. 221 No. 1, pp. 58-68 July (1969).
56. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas.
Norma Oficial Mexicana "Clasificación y Tamaños Nominales para Utensilios de Vidrio usados en Laboratorio".
BB-14-1973. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de agosto de 1973.
57. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas.
Norma Oficial Mexicana "Cuenta de Bacterias Mesofílicas Aerobias" F-253-1977. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 8 de marzo de 1977.
58. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Cuenta de Organismos Coliformes" F-254-1977. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de diciembre de 1977.
59. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Cuenta de Organismos Coliformes Fecales" F-308-1977. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 11 de noviembre de 1977.
60. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas.
Norma Oficial Mexicana "Determinación de Cenizas en Alimentos" F-665-1978.
61. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas.
Norma Oficial Mexicana "Determinación de Cuenta de Esta filococo áureo, Coagulasa Positiva, en Alimentos" F-310-1978.
62. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas.
Norma Oficial Mexicana "Determinación de Extracto Etéreo (Grasa) en Quesos" F-100-1976. Publicada en el Diario Oficial de la Federación.
63. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas.
Norma Oficial Mexicana "Determinación de Humedad en Productos Alimenticios" F-03-1977. Publicada en el Diario

Oficial de la Federación el 4 de noviembre de 1977.

64. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Determinación de pH en Alimentos" F-317-1978. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de mayo de 1978.
65. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Determinación de Proteínas en Quesos" F-98-1976. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de mayo de 1976.
66. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Determinación de Proteínas en Productos Alimenticios" F-68-1977
67. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Determinación del Número más Probable de Gérmenes" F-187-1978. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de febrero de 1978.
68. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas" R-50-1977. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 11 de septiembre de 1977.
69. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Método de Conteo de Hongos y Levaduras en Alimentos" F-255. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de marzo de 1978.
70. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Método de Prueba para la Determinación de Cenizas en Quesos Procesados" F-94-1970. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de julio de 1970.
71. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Método de Prueba para la Determinación de pH en Quesos Procesados" F-99-1970. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 13 de julio de 1970.

72. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Método de Prueba para la determinación de Sólidos Totales en Quesos procesados" F-111-1970. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de septiembre de 1970.
73. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Método General de Investigación de Salmonela en Alimentos" F-304-1977. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 8 de marzo de 1977.
74. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Muestreo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico" F-285-1977. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 8 de marzo de 1977.
75. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial
Dirección General de Normas
Norma Oficial de Nomenclatura para Definiciones de Términos Empleados en el Muestreo de Aceptación" R-49-1965.
76. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial.
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para Análisis Microbiológicos" F-286-1977. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 8 de marzo de 1977.
77. SPFI. Secretaría del Patrimonio y Fomento Industrial
Dirección General de Normas
Norma Oficial Mexicana "Tablas y Gráficas para la inspección por Atributos" R-18, parte 3, 1975. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de septiembre de 1975.
78. SPREER EDGAR
Laboratorio Industrial. Traducción de la 2a. Edición alemana (1973). Editorial Acribia, 1975.
79. SSA. Secretaría de Salubridad y Asistencia. Dirección General de Investigación en Salud Pública. Técnica para el análisis fisicoquímico de Alimentos, 1974.
80. SSA. Secretaría de Salubridad y Asistencia.
Proyecto de Normas Microbiológicas y Químicas para el Control Sanitario del Agua, Bebidas y alimentos, 1974.

81. SSA. Secretaría de Salubridad y Asistencia
Reglamento de Productos Derivados de la Leche y Substitutos de ellos. Publicado en el Diario Oficial de la Federación, el jueves 27 de agosto de 1953.
82. SSA. Secretaría de Salubridad y Asistencia
Reglamento para el Control Sanitario de la Leche. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el viernes 24 de septiembre de 1976.

Decreto por el que se reforma la fracción II del artículo 14 de dicho reglamento, publicado en el Diario Oficial de la Federación, el lunes 3 de abril de 1978.
83. SSA. Secretaría de Salubridad y Asistencia
Dirección General de Laboratorios de Salud Pública.
"Técnicas Generales para el Análisis Microbiológico de Alimentos". México, 1979.
84. THOMAS, S. B.
Técnicas Bacteriológicas para el Control Lactológico.
Editorial Acribia, 1971.
85. UNAM. FMVZ. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en coordinación con el Instituto Nacional de la Leche (SARH).
Memorias del Primer Curso de Actualización sobre Mastitis bovina, 1978.
86. US DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION and WELFARE. Public Health Service. Screening Test for the Detection of Abnormal Milk 1965.
87. VACLAV KOUBA
Epizootiología General. Editorial Científico-Técnica. La Habana, 1975.
88. VAKIL, J. R., CHANDAN, R. C., PARRY, R. M. and SHAHANI, K. M. Susceptibility of Several Microorganism to Milk Lysozymes. Journal of Dairy Science Vol. 52 No. 8, 1192 (1969).
89. VEISSEYRE, ROGER
Technologie du Lait. Constitution, Récolte, Traitement et Transformation du Lait. 3ème. Edition, La Maison Russtique 1975.
90. VIEIRA DE SÁ
Lechería Tropical. 1a. Edición en español. Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana (UTEHA), 1965.

91. WARNER, N. JAMES
Principios de la Tecnología de Lácteos. AGT Editor, S.
A. 1980. (Traducción del Principios of Dairy Proceesing,
1976).
92. WEBB, JOHNSON and ALFORD
Fundamentals of Dairy Chemistry. Second Edition. The Avi
Publishing Company Inc., 1974.