

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Influencia de la congelación sobre posibles mejoras en la  
tecnología del queso manchego**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María del Carmen Peláez Martínez**

Madrid, 2015

María del Carmen Peláez Martínez

TP  
1983  
052



\* 5 3 0 9 8 6 0 4 2 X \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-012532-4

INFLUENCIA DE LA CONGELACION SOBRE POSIBLES MEJORAS  
EN LA TECNOLOGIA DEL QUESO MANCHEGO

Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 52/83

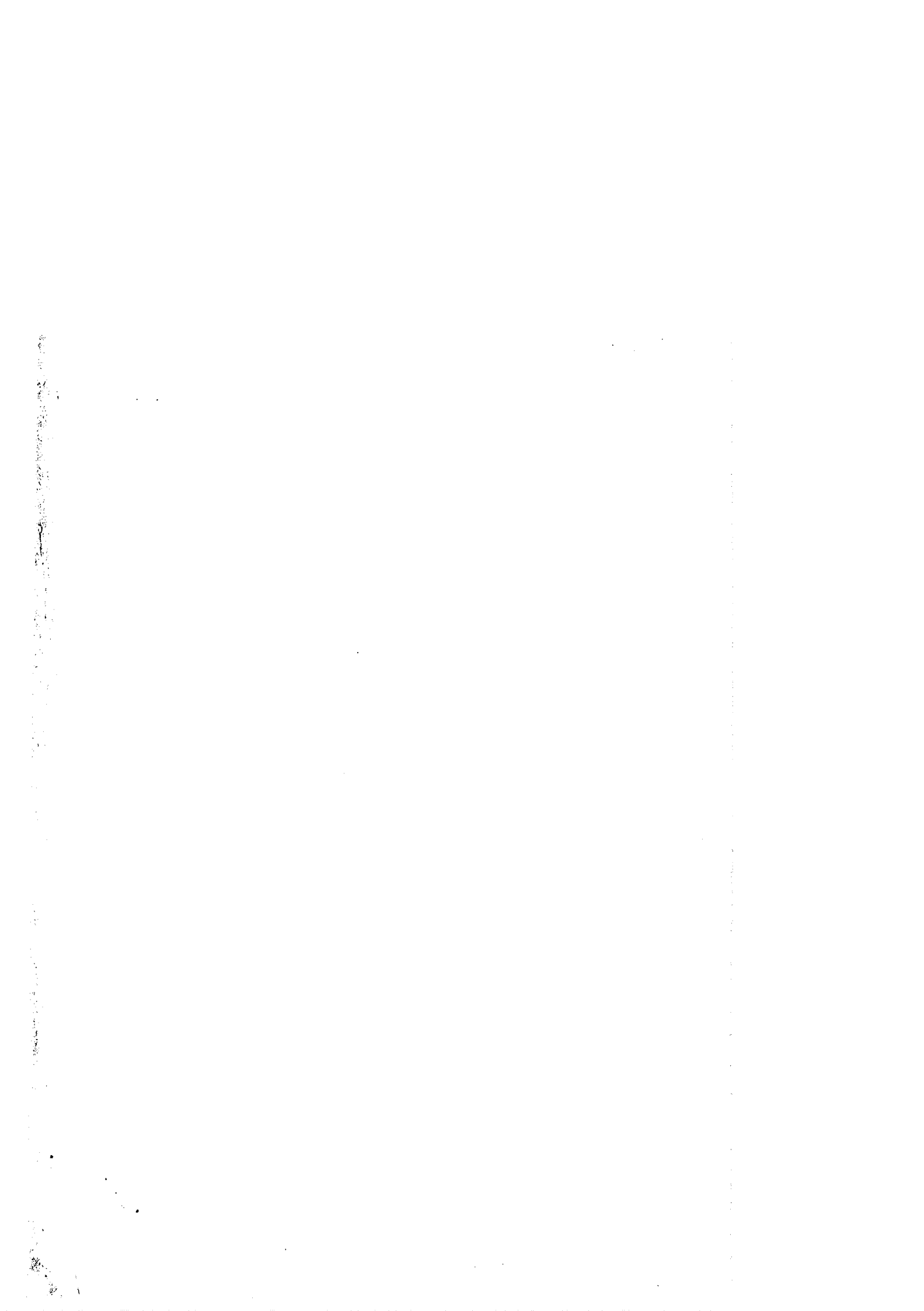
© M<sup>a</sup> Carmen Peláez Martínez  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1983  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-5410-1983

**Autor: MARIA DEL CARMEN PELAEZ MARTINEZ**

**INFLUENCIA DE LA CONGELACION SOBRE POSIBLES  
MEJORAS EN LA TECNOLOGIA DEL  
QUESO MANCHEGO**

**Director: Angel Goicoechea Mayo**  
**Doctor Veterinario, Investigador Científico del C. S. I. C.**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Departamento de Microbiología**  
**Año 1981.**



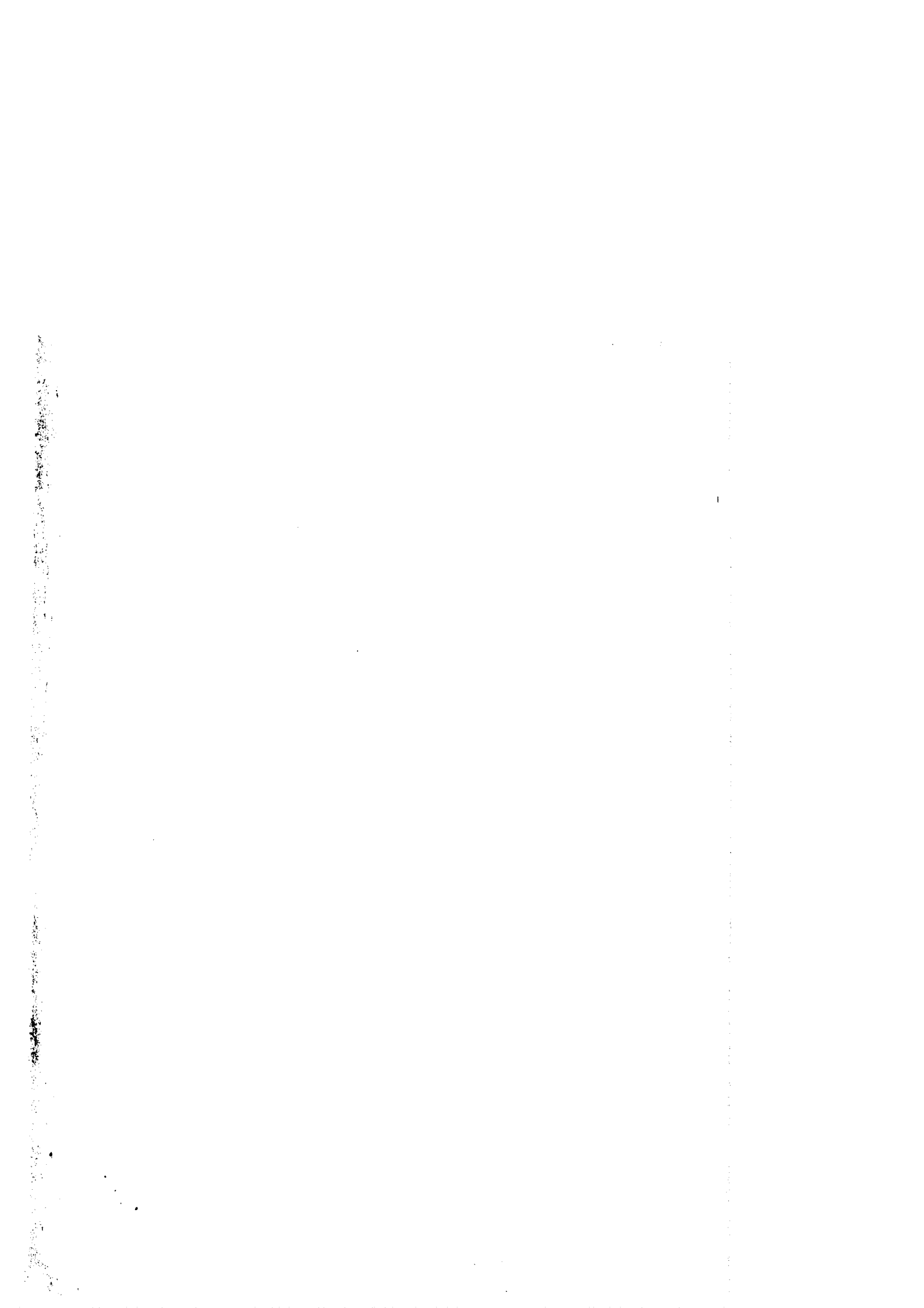
Esta Tesis ha sido realizada  
el INSTITUTO DEL FRIO, del C.S.I.C.  
bajo la dirección del Investigador  
Científico, Dr. D. ANGEL GOICOECHEA  
MAYO.



Vº Bº



El Doctorando



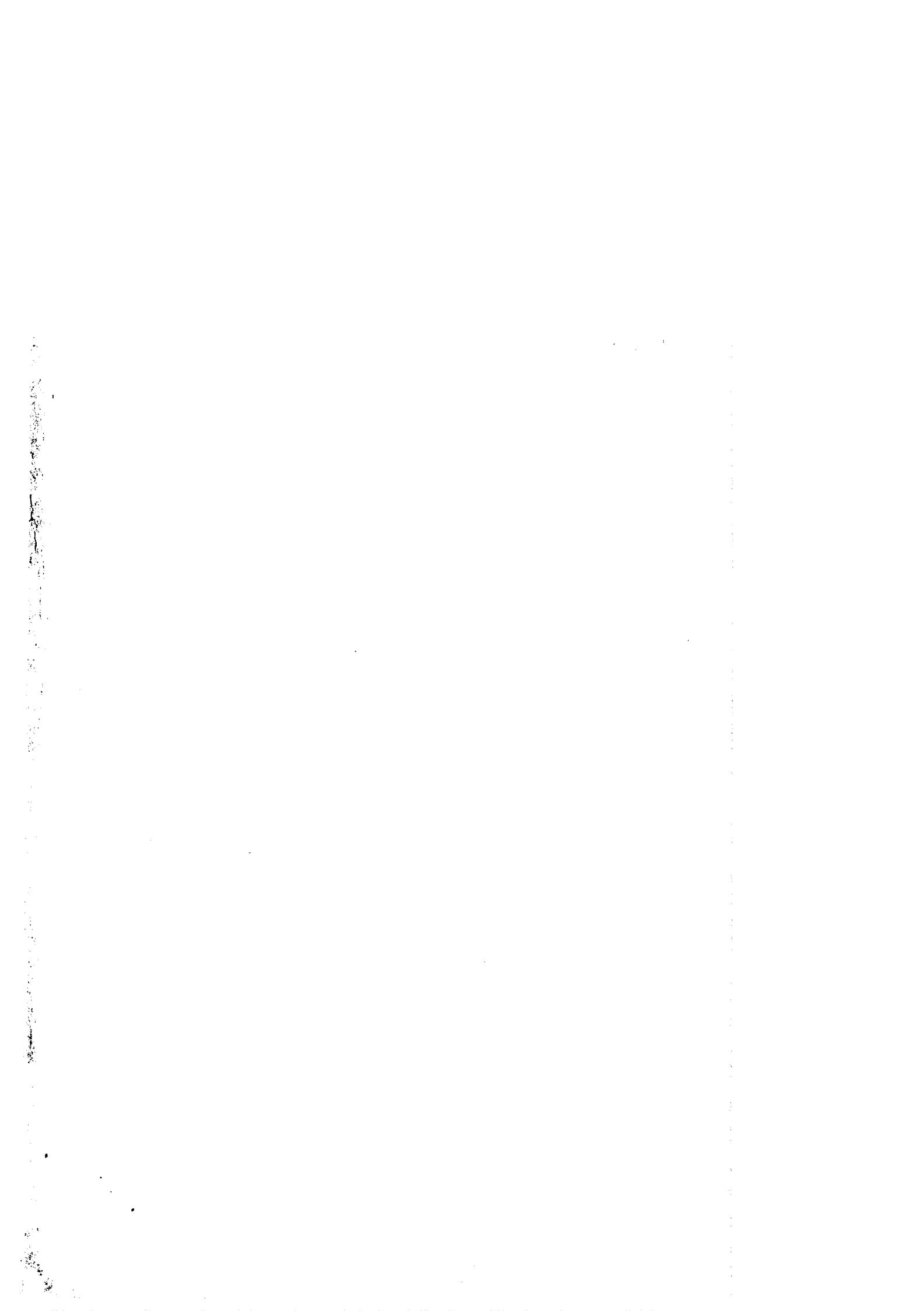
Agradezco al Dr. D. Angel Goicoechea Mayo, Director de esta Tesis y al Dr. D. Dimas Fernández Galiano ponente de la misma, la ayuda prestada en su realización.

Quiero agradecer al Dr. D. Félix Sanz Sánchez el interés mostrado y al Dr. D. Eugenio García Matamoros las múltiples facilidades que me dió para realizar este trabajo en la Unidad Estructural que dirige.

Para el tratamiento estadístico de los resultados he recibido el asesoramiento de D. Pedro Martín, a quien agradezco su inestimable ayuda.

Agradezco muy especialmente a la Dra. Dña. Manuela Juárez la colaboración prestada en diversas partes de la fase experimental del trabajo, así como a los Dres. D. Salvio Jiménez y Dña. Mercedes Ramos.

Por último, no quisiera olvidarme de Federico Morais, Carmen San José, mis compañeros de la Unidad Estructural de Productos Perecederos de Origen Animal y todas aquellas personas que con su ayuda contribuyeron a la realización de esta Tesis, ya que sin ellas no hubiera sido posible llevarla a cabo.



FE DE ERRATAS

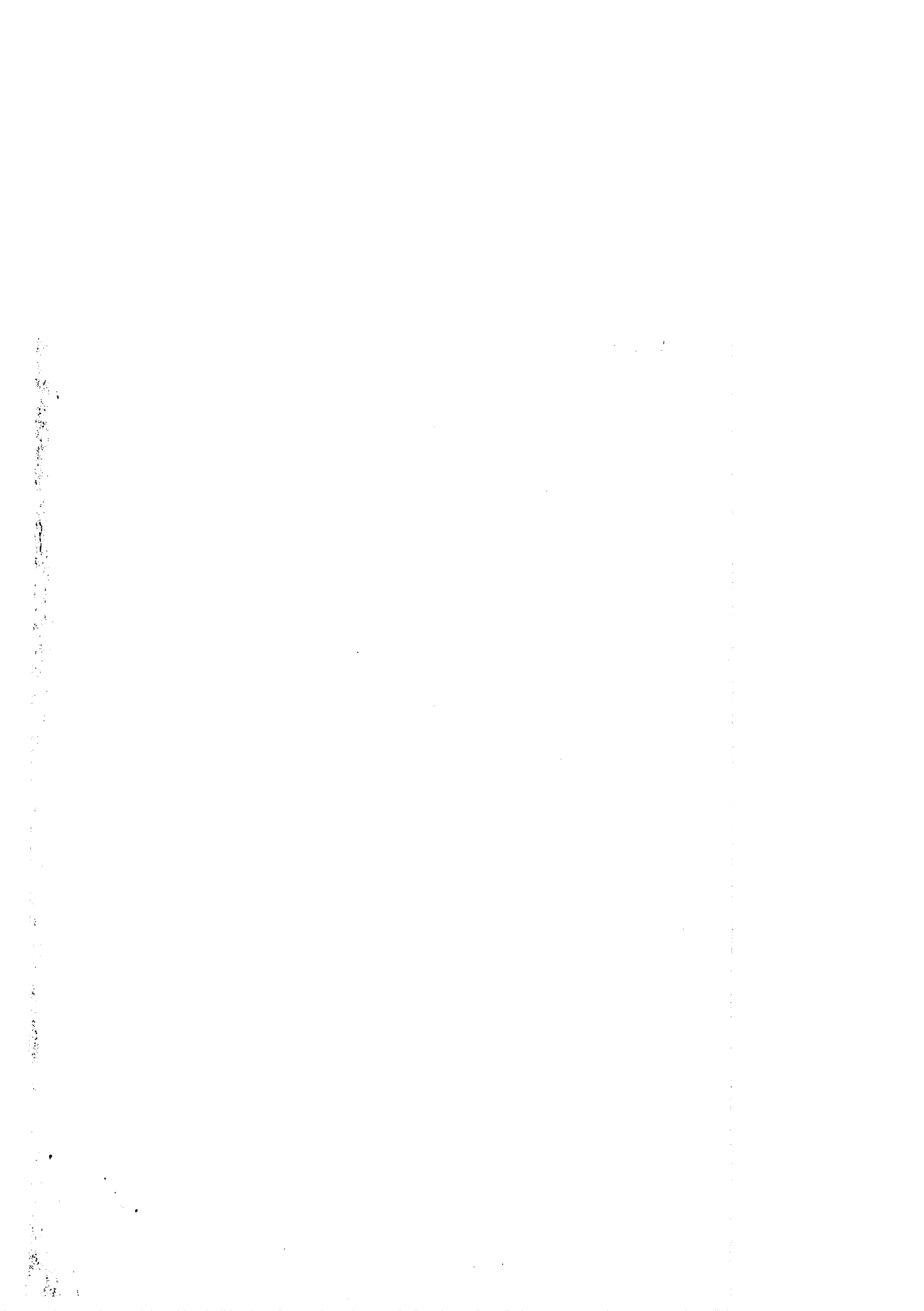
<u>Pag.</u>	<u>Línea</u>	<u>Dice</u>	<u>Debe decir</u>
103	a)	...entre los niveles de maduración y los niveles...	...entre los niveles de maduración y en-- tre los niveles...
107	a)	Idem	Idem
111	a)	Idem	Idem
114	a)	Idem	Idem
117	a)	Idem	Idem
121	a)	Idem	Idem
124	a)	Idem	Idem
128	a)	Idem	Idem
131	a)	Idem	Idem
134	a)	Idem	Idem
137	a)	Idem	Idem
139	a)	Idem	Idem
144	a)	Idem	Idem
150	a)	Idem	Idem
153	a)	Idem	Idem
156	a)	Idem	Idem

FE DE ERRATAS (bis)

<u>Pag.</u>	<u>Línea</u>	<u>Dice</u>	<u>Debe Decir</u>
9	13	.. Protelisis..	.. Proteolisis..
11	23	.. casina..	.. caseína..
14	7	.. actúan con ..	.. actúan como ..
18	8	.. contaminado..	.. contaminando..
33	22	.. día ..	.. días ..
35	21	.. metabolizante..	.. metabólica..
41	2	.. lente ..	.. lenta ..
49	14	.. madurado ..	.. madurador ..
54	9	..enzimas p <sup>r</sup> acticamente.	..enzimas quedan prácticamente..
62	17	..habran de ser..	.. habran de hacer..
71	10	.. 20 mn..	.. 20 segundos..
71	23	.. 5°C 1°C	.. 15°C 1°C.
72	10	.. -20°C..	.. -20°C 1°C.
72	17	..48 horas, en cá- maras..	..48 horas, a 5°C 1°C, y posteriormente en cá- maras..
76	10	..gérmenes viables serán..	..gérmenes, serán..
79	25	..caldo lactoso..	..caldo lactosado..
83	15	..anhidrida..	..anhidra..
84	3	..pensaban..	..pesaban..
90	26	..Honston..	..Houston..
90	26	..100 ml..	..100 mV..
91	12	..ácido hidroacético.	..ácido tricloroacé- tico..
160	27	..utensilio..	..utensilios..
172	18	..fenómenos..	..fenómeno..
174	18	..sólo..	..sola..
177	26	..incremente..	..incrementa..
XXXV	1	l.log. n° g <sup>é</sup> rm. prot./gr..	..log. n° g <sup>é</sup> rm. lipol./gr..
XXXV	2	.. GERMENES PROTEOLITICOS..	..GERMENES LIPOLITI- COS..

ABREVIATURAS

N -----Nitrógeno  
TCA -----Acido tricloroacético  
Aas. -----Aminoácidos  
PM -----Peso Molecular  
NPN -----Nitrógeno no proteico  
AN -----Nitrógeno amínico



INDICE

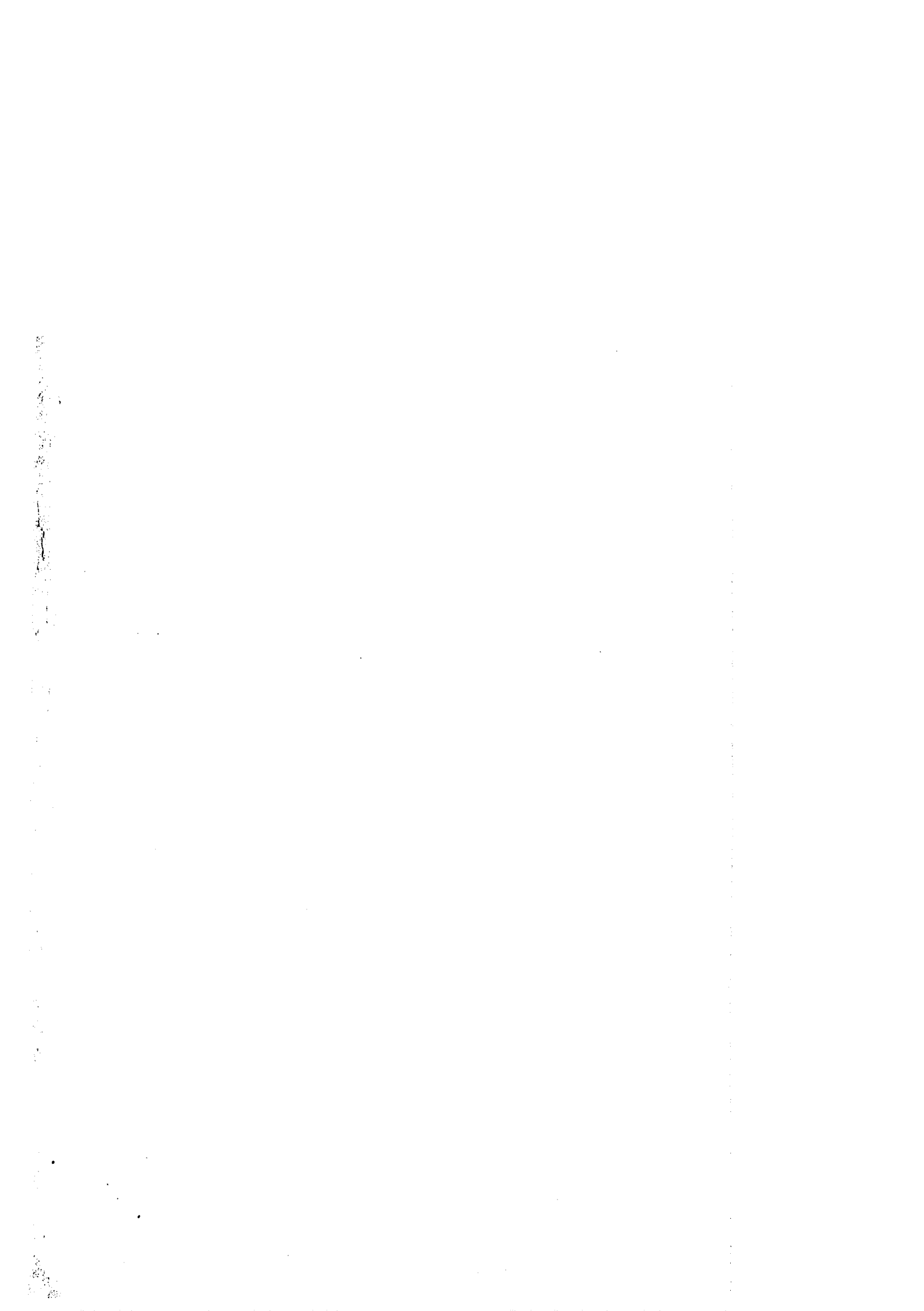
	Pág.	
1	OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL TRABAJO	1
2	INTRODUCCION	
2.1.	Características del queso Manchego	5
2.2.	Maduración de quesos	6
2.2.1.	Aspectos bioquímicos	6
2.2.2.	Aspectos microbiológicos	16
2.3.	Importancia microbiana en la tecnología quesera	35
2.3.1.	Gérmenes acidófilos	36
2.3.2.	Gérmenes de acción proteolítica	37
2.3.3.	Gérmenes de acción lipolítica	46
2.4.	Congelación de quesos	51
2.5.	Influencia de la congelación de cuajadas sobre la microflora que participa en la maduración.	57
2.6.	Gérmenes psicrófilos	67
3	MATERIALES Y METODOS	
3.1.	Material objeto de la experiencia	71
3.2.	Características técnicas de las instalaciones frigoríficas	73
3.2.1.	Túnel de congelación	73
3.2.2.	Cámara de conservación	73
3.3.	Tomas de muestras	74
3.4.	Técnicas de control de calidad	75
3.4.1.	Control bacteriológico	75
3.4.1.1.	Enumeración de gérmenes viables	76

	Pág.	
3.4.1.2.	Enumeración de gérmenes con función lipolítica	77
3.4.1.3.	Enumeración de lactobacilos	77
3.4.1.4.	Enumeración de gérmenes con función proteolítica	78
3.4.1.5.	Enumeración de gérmenes Coliformes	79
3.4.2.	Control bioquímico	80
3.4.2.1.	Determinación del pH	80
3.4.2.2.	Determinación de acidez	81
3.4.2.3.	Determinación de la humedad	81
3.4.2.4.	Determinación de lactosa	81
3.4.2.5.	Determinación de Nitrógeno total	84
3.4.2.6.	Determinación de Nitrógeno soluble en cloruro sódico al 5%	84
3.4.2.7.	Determinación de caseínas por medio de electroforesis en acetato de celulosa	84
3.4.2.7.1.	Equipo instrumental	85
3.4.2.7.2.	Método	86
3.4.2.8.	Extracción de la grasa	87
3.4.2.9.	Determinación de ácidos grasos libres	87
3.4.2.10.	Determinación de la actividad de agua	88
3.4.2.11.	Detección de minerales por espectrofotometría de absorción atómica	90

		Pág.
3.4.2.11.1.	Equipo Instrumental	90
3.4.2.11.2.	Preparación de las muestras	91
3.4.2.11.3.	Método	91
3.4.2.12.	Determinación de la dureza	95
3.4.2.12.1.	Equipo instrumental .	96
3.4.2.12.2.	Método	96
4.	RESULTADOS Y COMENTARIOS	
4.1.	Tratamiento estadístico de los Resultados	97
4.2.	Análisis iniciales	99
4.3.	Análisis periódicos	99
4.3.1.	Análisis microbiológicos	101
4.3.1.1.	Determinación de gérmenes via- bles	101
4.3.1.2.	Determinación de lactobacilos	105
4.3.1.3.	Determinación de Coliformes	109
4.3.1.4.	Determinación de gérmenes lipó- líticos	112
4.3.1.5.	Determinación de gérmenes pro- teolíticos	115
4.3.2.	Análisis bioquímicos	118
4.3.2.1.	Valores relacionados con la hu- medad	119
4.3.2.1.1.	Determinación de la humedad por desecación	119
4.3.2.1.2.	Determinación de la actividad de agua	122
4.3.2.2.	Valores relacionados con la aci- dez	126

		Pág.
4.3.2.2.1.	Determinación de pH	126
4.3.2.2.2.	Determinación de acidez	126
4.3.2.3.	Modificaciones de las protef <u>i</u> nas	132
4.3.2.3.1.	Protefna total	132
4.3.2.3.2.	Protefna soluble en cloruro sódico al 5%	135
4.3.2.3.3.	Determinación de la degrada- ción caseínica: relación $\beta/\alpha_s$	141
4.3.2.4.	Determinación de grasa	148
4.3.2.5.	Contenido en ácidos grasos	148
4.3.2.6.	Determinación de la dureza	154
4.3.2.7.	Determinación de minerales	157
5.	DISCUSION	159
6.	CONCLUSIONES	189
7.	BIBLIOGRAFIA	194
8.	FIGURAS	I

1. OBJETIVOS Y FINALIDAD DEL TRABAJO.



El queso Manchego es uno de los quesos españoles con más aceptación, tanto en España como en el extranjero y con una gran posibilidad de ampliación de mercado, pudiendo competir perfectamente con los demás quesos existentes de difusión internacional.

Actualmente se comercializan dos tipos de queso Manchego, dependiendo de la procedencia de la leche utilizada para su fabricación: el queso tipo Manchego, elaborado a partir de mezclas de leche de oveja, vaca y cabra y el queso Manchego puro, que se elabora a partir únicamente de leche de oveja.

Según el Manual de Estadística Agraria, elaborado por la Secretaría Técnica del Ministerio de Agricultura, los datos referentes a la producción de leche de vaca, oveja y cabra en los últimos cinco años son los siguientes:

	Vaca	Oveja	Cabra
1.975	4.984	231	289
1.976	5.212	227	288
1.977	5.354	235	289
1.978	5.590	231	286
1.979	5.661	205	292

En millones de litros

Así mismo, los datos que dicho Manual da, referentes a la elaboración de queso en España en el año 1.979 son:

-2-

	Vaca	Oveja	Cabra
Fresco	6.930	1.251	2.383
Blando	3.919	1.360	183
Duro no cocido	46.274	24.662	717
Duro cocido	2.084	2.232	545
Pasta azul o veteado	12	138	-
Fundido	13.320	-	-
Especial	191	-	-

En Tm.

Respecto del comercio exterior del queso español elaborado con cualquier tipo de leche, el Ministerio de Agricultura obtiene las siguientes cifras:

	<u>Importaciones</u>	<u>Exportaciones</u>
1.975	12.712	333
1.976	13.463	786
1.977	15.321	794
1.978	32.613	1.088
1.979	26.626	3.262

En Tm.

Se desprende de estos datos, la insuficiente producción de leche de oveja y cabra respecto de la de vaca, con la consiguiente disminución en la fabricación y elaboración de los quesos procedentes de aquellos tipos de leche.

Por otro lado es bien sabido que la fabricación de queso

Manchego no es uniforme a lo largo del año, ya que la producción de leche de oveja es oscilante, siendo escasa e incluso nula en los meses de Julio, Agosto y Septiembre. Existen después en los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre una intensificación progresiva, siendo a partir de Enero, cuando ocurre el verdadero aumento en la producción. La máxima producción se mantiene más o menos estacionaria durante los meses de Marzo, Abril y Mayo, sufriendo en Junio una brusca caída para quedar prácticamente nula en los tres meses de verano.

El objetivo fundamental de este trabajo, será el estudiar la congelación de cuajadas en épocas de alta producción de leche de oveja, como un medio posible de mantener abastecido el mercado de quesos Manchegos de forma continua durante todo el año.

Se estudiará el efecto de la temperatura de congelación y los diferentes tiempos de conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ ., sobre los principales componentes de la cuajada y sobre la degradación de dichos componentes a lo largo de la maduración posterior, así como el efecto de dichas temperaturas sobre los cambios ocurridos en ciertos parámetros (pH, acidez, humedad, etc...), directamente relacionadas con dicha degradación.

Así mismo, se estudiará la variación numérica ocurrida en los diferentes grupos de microorganismos con acción similar sobre el sustrato en el que se encuentran a todo lo largo de la maduración y la influencia que sobre dicha variación pueden tener los diferentes períodos de conservación al estado congelado. Se estudiarán también los efectos sobre la población microbiana total y los Coliformes, como gérmenes indicadores de contaminación fecal.

Y por último, se intentará correlacionar dichas variaciones microbianas con los cambios ocurridos en los componentes bioquímicos, durante las sucesivas fases de la maduración global del lote testigo y los lotes conservados a baja temperatura, tomando las medias obtenidas para las variables a correlacionar, de todos los lotes en cada control realizado en cada maduración, Igualmente se estudiarán dichas correlaciones a lo largo de las diferentes conservaciones al estado congelado, tomando las medias de todos los controles de maduración para cada lote analizado.

163

2. INTRODUCCION

### 2.1. CARACTERISTICAS DEL QUESO MANCHEGO.

De todos los quesos elaborados en España, es el queso Manchego el que mejor responde a características específicas, siendo su gran extensión y consumo lo que permite calificarle como el típico queso español.

Compañía C. y col (1.979), después de recoger datos del I Concurso Provincial de Ciudad Real y de análisis efectuados por destacados técnicos en este queso, da como cifras medias en la composición de un queso Manchego artesanal: agua 36,2 %, materia nitrogenada 26,25 %, grasa 32,39 %, y cenizas 5,32 %.

El queso Manchego se considera incluido entre los de pasta prensada y dura. El peso medio de un queso normal, es de 2 a 3 Kg. con una forma cilíndrica de 8 a 9 cm. de altura y aproximadamente 20 cm. de diámetro. La corteza de color amarillo paja pálido, tiene impresiones de los moldes o "pleitas" en las superficies laterales y de la "flor" en las caras planas. La pasta es firme, de color blanco marfil o blanco amarillento y cuando se elabora artesanalmente tiene numerosos ojos.

Su valor nutritivo es grande, ya que cien gramos de queso proporcionan entre 350 y 400 calorías.

En su elaboración industrial se cuaja normalmente a 30°C. de temperatura, durante 45 a 60 minutos. A continuación, se corta hasta gránulos del tamaño de un guisante por medio de una lira y se calienta agitando hasta que los granos de la cuajada adquieren la debida consistencia. Se deja reposar 10 a 15 minutos y se

extrae el suero, moldeándose la cuajada con una presión gradual durante ocho horas aproximadamente pudiendo alcanzarse al final, 10 Kg/Kg. de queso. A continuación, el queso se sala durante 43 horas y se procede a madurar en salas a temperatura de 16°C. a 18°C. y humedad relativa de 80 % a 85 %, invirtiendo diariamente los quesos la primera semana y luego cada dos o tres días.

En las fábricas en que se procede normalmente a la pasteurización de la leche, se suele inocular con fermentos adecuados en proporción del 2 %, 30 ó 40 minutos antes de añadir el cuajo. Con esto, se trata de reestablecer en parte la flora destruída por el tratamiento térmico y conseguir una cierta acidez antes de proceder a la coagulación de la leche. ( Matallana, S. 1960).

Actualmente existen numerosos estudios encaminados a conocer la flora microbiana específica de éste u otros tipos de quesos fabricados con leche pasteurizada, a fin de elaborar el fermento adecuado que añadido a la leche pueda reestablecer esta flora, que en definitiva será la que proporcione las cualidades típicas de cada queso.

## 2.2. MADURACION DE QUESOS.

### 2.2.1. Aspectos bioquímicos.

Un queso en maduración es un sistema, donde se establecen numerosos equilibrios y se entrecruzan múltiples rutas de degradación.

La maduración es por tanto un proceso típico y particular de cada clase de queso y los cambios químicos que conducen a la transformación de la cuajada fresca en el queso final, son catalizados por multitud de enzimas que pueden proceder de tres fuentes principales: del cuajo u otra preparación enzimática de origen vegetal o animal; de los microorganismos que crecen dentro del queso o en su superficie; de la leche misma.

En el curso de la maduración se van acumulando en grado diverso, los numerosos contribuyentes a su "bouquet" (péptidos, aminoácidos libres, aminos, amoníaco, cetonas, ácidos grasos libres...). Estos compuestos generalmente ausentes o en bajas concentraciones en la leche original, surgen como consecuencia de las transformaciones metabólicas sufridas por los compuestos mayoritarios de la leche (lactosa, triglicéridos y proteínas, especialmente caseínas).

En todas estas transformaciones en las que por supuesto, los enzimas originarios del cuajo o de la leche tienen un papel relevante, adquieren especial importancia los sistemas enzimáticos microbianos, capaces de transformar una cuajada inconsistente en una masa homogénea con olor y sabor característicos. La lactosa se transforma casi completamente en ácido láctico, la grasa es hidrolizada en ácidos grasos aunque esta transformación sólo adquiere real importancia en los quesos blandos, mientras que las proteínas van a sufrir grandes e importantes cambios. Sin embargo, para que ocurran todas estas actividades metabólicas, es necesario que en la maduración de los quesos se den los siguientes factores:

- 1.- Factores físicos: Adecuado grado de dispersión de la grasa y de la caseína, particular consistencia del queso etc.

2.- Factores químicos: Calcio retenido en la cuajada, contenido en agua y sal, etc...

3.- Factores microbianos: Son los auténticos agentes maduradores que proceden del ambiente, de la cuajada o han sido añadidos con el fermento.

4.- Factores bioquímicos: Son los enzimas del cuajo y de los microorganismos que intervienen activamente en la madura--ción y las vitaminas que influyen en el desarrollo de aquellos.

5.- Factores ambientales: Temperatura, humedad y venti--lación de las cámaras de fermentación, donde se va a madurar el queso, cuyas condiciones habrán de ser apropiadas para cada clase.

En todos los quesos, la maduración habrá de ser lenta, a través de toda la masa. Al principio de ésta, la multiplicación de los fermentos es muy activa y el número de gérmenes llega a al--canzar valores muy elevados. Sus enzimas exocelulares comienzan a transformar la lactosa en ácido láctico, pero a los pocos días de comenzada la maduración, el 95 % de los gérmenes lácticos se lisan y liberan al medio una gran cantidad de enzimas que hacen que la proteína se degrade hasta la aparición de aminoácidos. Eta maduración se llama maduración primaria y es sufrida en gene--ral por los quesos grandes y los que maduran a temperaturas muy bajas.

En los quesos pequeños o muy acuosos, puede existir además una maduración secundaria que actúa junto con la primaria y en ocasiones puede llegar incluso a superarla. Esta maduración con--siste en la transformación de la proteína hasta amoníaco y se realiza normalmente del exterior al interior del queso. Algunos, co--mo los quesos frescos, no sufren ningún tipo de maduración.

Sin duda el ácido láctico y el cloruro sódico que se encuentran al principio en la cuajada, contribuyen al sabor del queso pero su misión fundamental, consiste en servir de base a los distintos sabores y aromas originados por la descomposición del ácido láctico, lactatos, citratos, proteínas y grasas. La formación del aroma y sabor, así como la textura y el aspecto exterior típico del queso, son los fines fundamentales del proceso de maduración en el curso del cual, se producen una serie de modificaciones importantes:

1.- Glicolisis. La lactosa se convierte casi completamente en ácido láctico, el cual desaparecerá parcial o totalmente en el curso de la maduración.

2.- Protelisis de la caseína como componente fundamental de la cuajada.

3.- Lipolisis. Es la hidrólisis de la materia grasa, variable según el tipo de quesos.

4.- Formación de la corteza.

5.- Descenso de la humedad.

1.- Glicolisis.

Durante la maduración, la lactosa desaparece ya casi desde el principio en la mayor parte de los quesos a excepción en general, de los quesos blandos donde puede persistir durante largo tiempo.

Algunos autores como Lenoir J. (1.963b) han comprobado una transformación rápida y otros observan su persistencia durante varios meses, Swartling P. y col. (1.953) y Nakanishi T. y col. (1.958). Parece ser que la permanencia o no de la lactosa en el queso, está influida por el tratamiento térmico de la leche y de la cuajada, además de otros factores y aquellos quesos tratados a

altas temperaturas, fermentan con mayor rapidez que los tratados a bajas temperaturas, Jiménez S. (1.978).

Esta hidrólisis rinde dos azúcares, D-glucosa, D-galactosa, siendo la primera alimento energético para los gérmenes, que la fermentan mucho más rápidamente que la segunda.

El producto final de las homofermentaciones es el ácido láctico y los gérmenes responsables de la misma son, Streptococcus, Streptobacterium (Lactobacilos mesófilos) y Thermobacterium (Lactobacilos termófilos). La capacidad de producción de ácido láctico de dos especies termófilas (Str. thermophilus y L. bulgaricus), a elevadas temperaturas (37°C. y 55°C.), ha sido estudiada por Costamagna L. (1.976b) quien demostró que a 55°C, dichas especies son capaces de crecer e incluso producir cantidades normales de ácido. En las heterofermentaciones, además del ácido láctico aparecen el ácido carbónico, etanol y ácido acético como productos finales, siendo originados dichos procesos por los Leuconostoc y las beta-bacterias.

Como consecuencia de la formación de ácido láctico, existe un descenso del pH que retrasa la putrefacción, al impedir el desarrollo de los gérmenes contaminantes. Con ello se favorece la implantación de una flora beneficiosa y particular de cada tipo de queso, que llevará a cabo junto con la degradación proteica y lipolítica, una transformación de los lactatos en ácido propiónico, ácido acético y anhídrido carbónico. En algunos quesos como el Emmental, la formación del ácido propiónico tiene gran importancia para la producción del aroma característico del queso.

Algunos grupos de bacterias lácticas, actúan sobre el ácido cítrico de la leche y simultáneamente con el ácido láctico originan diacetilo, el cual dará lugar al aroma característico de los quesos frescos como Gervais, Petit Suisse, etc... Kornacki K. y col (1.977) y otros autores, estudian la influencia de las bacterias lácticas en las cualidades organolépticas del queso.

La intensidad de la glicolisis varía entre los distintos tipos de quesos. En los quesos tipo Edam, Gouda, etc..., es mucho menor que la que se produce en aquellos como el Cheddar, que sufren una cierta maduración inicial de la leche. En estos quesos se puede proceder a una fermentación láctica de la leche a 10°C., habiéndose inoculado la noche anterior con 1 cc. de fermentos lácticos por cada litro de leche. Se realiza así una maduración previa de la leche durante 10 a 12 horas, a la temperatura mínima de crecimiento de las bacterias lácticas y esto mejora notablemente la calidad de éstos tipos de quesos.

## 2.- Proteolisis.

Los cambios ocurridos en las proteínas son los más importantes y característicos de la maduración, ya que afectan a la textura, según De Jong L. (1.976) y al sabor del queso, según Shahní K.M. (1.976). Estas características típicas de cada uno, le son conferidas por los ácidos grasos, aminos y amoníaco, producidos en parte por la hidrólisis de la caseína, después de una serie de transformaciones enzimáticas. Esta caseína puede ser desdoblada sólo parcialmente, ya que en algunos quesos aparece con ligera o ninguna transformación.

De modo general se puede decir, que las enzimas microbianas que intervienen en la proteolisis del queso son:

- Proteasa natural de la leche. Su actividad máxima se sitúa a un pH entre 8 y 9. Se inactiva al pH del queso fresco.

- Actividad proteolítica del cuajo, que se manifiesta en la zona del pH de los quesos, es decir, entre 5 y 6. El cuajo descompone la caseína en productos intermedios, los cuales bajo la acción microbiana, experimentan a continuación una degradación más pronunciada.

- Proteasas microbianas. Carboxipeptidasas, aminopeptidasas di y tri peptidasas específicas e inespecíficas, que actúan en condiciones diversas de pH según su procedencia.

Además de la concentración de enzima y de sustrato, la velocidad de la proteólisis depende de los factores siguientes:

- Temperatura. La hidrólisis de la caseína es mucho más lenta a medida que se va bajando la temperatura, siendo a 0°C la mitad que a 20°C.

- Humedad. La velocidad de la maduración es tanto mayor, cuanto mayor cantidad de agua tenga el queso; por ello la solubilización de la caseína, es más rápida al principio de la maduración que al final.

- Acidez. Un medio muy ácido retrasa generalmente la proteólisis especialmente si el pH se sitúa por debajo de 5,5.

- Grasa. La digestión proteica es tanto mayor cuanto menor cantidad de grasa tengan los quesos.

- Concentración de cloruro sódico. La acción del cloruro sódico es retardante de la proteólisis, dependiendo de su concentración.

El "grado" de degradación proteica viene medido por el llamado "índice de maduración", que es la cantidad de N soluble disuelto con relación al N total. En este N soluble, está incluido el N proteico precipitable en TCA ( $\alpha$ -lactoalbúminas,  $\beta$ -lactoalbúminas, seroalbúmina, polipéptidos y péptidos de alto y bajo peso molecular) y el N no proteico que se solubiliza perfectamente en TCA y se determina de modo fácil en el sobrenadante (Aas. urea...). Los aminoácidos pueden en algunos casos y cuando la maduración es suficientemente larga, ser degradados en ácidos grasos, aminos y amoníaco, siendo estos dos últimos compuestos, también detectables como N no proteico. Todos estos últimos componentes de la degradación proteica contribuyen al "bouquet" de los quesos y les confieren aroma y sabor. En algunos casos, sin embargo, cuando la maduración es excesivamente larga y se encuentra dirigida por reacciones enzimáticas mal encaminadas, pueden producirse resultados desagradables e incluso sustancias tóxicas, con desaminaciones y pérdida de N en forma de amoníaco y desprendimiento de CO<sub>2</sub>, obteniéndose así quesos de mala calidad. Un ejemplo de este tipo de malas transformaciones, son las originadas por Clostridium. La medición del N no proteico, por lo tanto, daría una idea de la "profundidad" de la degradación proteica.

En quesos blandos como el Limburger, Camembert o Cabrales casi toda la caseína inicial se convierte en péptidos de alto pM. y polipéptidos, dando valores muy altos de N soluble al final de la maduración. Esta gran descomposición de la caseína, es la que se ha pensado como autora principal de la blandura de los quesos. En quesos duros como el Cheddar, Emmental e incluso el Manchego,

la solubilización proteica no sobrepasa generalmente un 40% del total.

Los enzimas del cuajo son los que fundamentalmente producen la descomposición inicial de la caseína, para dar péptidos de alto pM y polipéptidos. A continuación y sin despreciar totalmente la acción del cuajo, son las enzimas microbianas, las que actúan con péptidasas, decarboxilasas y desaminasas para dar péptidos de bajo pM y aminoácidos, que en algunos casos pueden ser degradados a ácidos grasos, aminas y amoníaco, Visser F.M.W. y col. (1.977).

En los quesos duros, son preferentemente los gérmenes lácticos, los microorganismos que realizan la proteólisis. Liberan pequeñas cantidades de proteinasas extracelulares, pero su acción se debe sobre todo a la liberación de proteinasas intracelulares, debido a la lisis de las células bacterianas. En los quesos blandos o rápidamente madurados, la mayor parte de la proteólisis se debe en cambio a las proteinasas extracelulares, liberadas por una variedad de gérmenes (mohos) que crecen en superficie constituyendo la flora superficial, Piergiovanni L. y col. (1.978).

La evolución de la materia nitrogenada, ha sido estudiada en diferentes tipos de quesos por diversos autores: Lenoir J. (1.963a) en queso Camembert; Ritter W. y col. (1.966); Garmer J. y col. (1.962); López Lorenzo P. y col. (1.962); Albonico F. y col. (1.967); Silvermann G.J. (1.954); Reville W.J. (1.978) en queso Cheddar; West D.W. y col. (1.976); Poznanski S. y col. (1.965) en queso Edam; Creamer L.K. (1.970) en queso Gouda; Klimovski I.I. (1.959) en queso Edam; Harper W. y col. (1.956) en queso Provolone;

Marcos A. y col. (1.976b), (1.978) y Fernández Salguero (1.975) en quesos De la Serena y De los Pedroches. En queso Manchego la evolución de la materia nitrogenada ha sido estudiada, principalmente por Ramos M. y col. (1.976); Marcos A. y col. (1.976a) (1.978) Ordóñez J.A. y col. (1.980 a)

### 3.- Lipólisis.

Los triglicéridos que componen la materia grasa, se hidrolizan liberando ácidos grasos, los cuales se acumulan en el medio incrementando la acidez de éste. Estos ácidos grasos, intervienen en el aroma del queso así como sus productos de degradación.

Esta hidrólisis de la materia grasa, se realiza a través de las enzimas procedentes de los propios microorganismos, o bien de las lipasas contenidas en la leche. Estas tienen distinto grado de especificidad y su pH óptimo varía entre 6, 5 y 9, activándose su acción hidrolítica con los cambios bruscos de temperatura y la agitación.

La hidrólisis de la materia grasa es muy limitada en los quesos de pasta dura, siendo mucho mayor en los quesos de pasta azul y de pasta blanda. En los quesos en cuya fermentación intervienen los mohos en gran cantidad, éstos representan una abundante fuente de lipasas.

En el queso Manchego, la hidrólisis de las grasas es un factor muy importante en la producción del sabor, por la liberación de ciertos ácidos grasos, como el caprílico, caproico, capríco y otros. Estos ácidos grasos unidos a otros como el butírico, desarrollan el sabor picante de los quesos añejos que es desagradable.

dable cuando se rebasa el grado normal de maduración.

### 2.2.2. Aspectos microbiológicos.

Los gérmenes son los auténticos artifices del proceso de maduración y juegan un papel fundamental en la elaboración de los quesos.

En la industria quesera, los microorganismos son indispensables especialmente para los procesos ocurridos durante la maduración, principal punto de la fabricación de los quesos.

Durante el proceso de desuere, la contracción de la cuajada, dará lugar a la expulsión de mayor o menor cantidad de suero, según la intensidad de la acidificación, y ésta habrá sido producida por los gérmenes lácticos y el cuajo.

Durante la maduración se desarrollan una gran cantidad de microorganismos, mohos y levaduras que a expensas de los sustratos que encuentran en la cuajada, fabrican sustancias que incrementan la digestibilidad del producto y le confieren el aroma y sabor característicos. Estas reacciones enzimáticas varían específicamente de unos quesos a otros, así como los microorganismos que intervienen en cada una de ellas.

Sin embargo, la microflora puede ocasionar algunas veces, procesos de deterioro importantes, cuando en el queso se encuentran en gran número microorganismos perjudiciales.

Por esto, y desde un punto de vista industrial, bromatoló

gico y sanitario, los microorganismos que participan en la maduración del queso, pueden clasificarse en:

- Beneficiosos, ya que son en todas ocasiones fermentadores útiles del queso.

- Colaboradores en fermentaciones útiles, pero pudiendo dar origen ocasionalmente a acciones perjudiciales.

- Peligrosos, por originar procesos metabólicos de deterioro, o incluso procesos infecciosos y tóxicos en los consumidores.

En el primer grupo se encuentran los gérmenes considerados acidófilos: estreptococos, lactobacilos y Leuconostoc. Esta es la llamada flora láctica. Unos son considerados homofermentadores, pues sólo originan ácido láctico a partir de la lactosa, mientras que otros son además productores de anhídrido carbónico, hidrógeno, alcohol, etc... y son catalogados como heterofermentadores.

En el queso Manchego, el estreptococo predominante es S. lactis. Éste aparece en los primeros días de la maduración, pudiendo estar acompañado en menores ocasiones por S. lactis var. diacetilactis.

Diversos autores como Ordóñez J.A. y col. (1.978 B) Martínez Moreno J.M. (1.976) y Compairé C. y col (1.979), coinciden en la ausencia de S. cremoris en el queso Manchego. Según Perry K.D. (1.961) y Dawson D.J. y col. (1.957), este microorganismo suele encontrarse asociado a S. lactis en casi todos los tipos

de quesos; sin embargo, no ha podido aislarse de modo general en el queso Manchego, si bien se piensa que el hábitat natural del que procede, podría ser el mismo que el de S. lactis. Núñez M. y col. (1.979), tampoco lo han conseguido aislar del queso Cabrales, ni Ordóñez J.A. y col. (1.980) en queso Roncal, cuyas características son muy similares al Manchego; si bien Devoyod J.J. y col. (1.969), si lo han encontrado en queso Roquefort.

Estos gérmenes proceden del medio ambiente, contaminado primero a la leche y después a la cuajada, siendo posible encontrarlas en grandes cantidades en los quesos de fabricación artesanal y los fabricados industrialmente con leche sin pasteurizar. En los quesos fabricados con leche pasteurizada proceden en gran parte del fermento utilizado. Román Piñana M. (1.975), los ha encontrado siempre como flora dominante a lo largo de toda la maduración, tanto en el interior como en la superficie del queso. Sin embargo, otros autores como Massó J. (1.974) o Compairé C.col. (1.979), los encuentran en gran número al principio de la maduración para dar paso posteriormente a un crecimiento masivo de los lactobacilos. Ducastelle A. y col. (1.965) en queso St. Paulin, han encontrado que constituyen la parte esencial de la flora microbiana. Su número tiende a disminuir en el curso de la maduración y después de unos diez días, no se encuentra más que una quinta parte de la población láctica enumerada en la cuajada. En el queso Vacherin, los estreptococos mesófilos constituyen la mayor parte de la flora láctica total, pudiendo desarrollarse muy bien a pesar del fuerte contenido en sal, Sozzi T. y col. (1.973). Devoyod J.J. (1.969) en queso Roquefort, considera que constituyen la flora dominante a lo largo de toda la maduración, encontrándose siempre cepas "poco acidificantes". Estas están asociadas a gérmenes que estimulan su crecimiento (Hansénula,

S. faecalis...) y a factores de crecimiento (Aas. esenciales etc.), encontrados en el medio, liberados de la lisis de los microorganismos por la acción de la sal. Núñez M. y col. (1.979), los encuentran como flora dominante en el queso de Cabrales, tanto en la superficie como en el interior del queso durante la fabricación, salado y primera maduración. En la segunda maduración, los lactobacilos, levaduras y mohos, dominan en el interior del queso y los micrococos en su superficie. En otros quesos fabricados con leche de oveja, como el queso Bryndza, Prekoppová J. (1.976), observa que constituyen a las veinticuatro horas de fabricación el 98% de la flora total, decreciendo después gradualmente hasta el final de la maduración (ocho a nueve días).

En la autólisis de las bacterias lácticas, además de la acidificación del medio con la disminución del pH, interviene como factor importante la concentración de cloruro sódico, ya que los estreptococos son bastante sensibles a ella. Bie R. y col. (1.975) en quesos noruegos, observan que la permanencia de éstos en salmuera seca, provoca una mayor destrucción de las bacterias lácticas, así como mayor digestión proteica debido a la liberación de las enzimas intracelulares.

Los estreptococos metabolizan la lactosa para transformar la en ácido láctico desde los primeros días de la fabricación, hasta que el pH alcanza un valor aproximadamente de 5, lo que ocurre normalmente al mes de iniciada la maduración. A partir de este momento comienzan a lisarse, liberando en el medio endoenzimas proteolíticas que contribuirán a la producción de aminoácidos y sustancias metabólicas que colaboran en la producción del aroma característico. Según Massó Lago J. (1.974), en el queso Manchego alcanzan un número máximo a los treinta días, que es del orden

de  $10^8$ . En cambio los lactobacilos en este momento, constituyen una fracción de la población de  $10^2$  a  $10^3$  veces menor. Prosiguen un lento crecimiento y a los treinta días igualan en número a los estreptococos, manteniéndose luego ambos en un orden de  $10^7$  hasta pasados dos meses de maduración.

La acidificación de la cuajada, rápida primero debido a los estreptococos y más lenta después por la acción de los lactobacilos, provoca una disminución del pH del medio, lo suficientemente grande, para inhibir el desarrollo de la flora contaminante indeseable, como las Salmonellas, Brucellas, esporulados y Escherichia coli, pudiendo éstos llegar a perder completamente su capacidad de multiplicación.

Es importante resaltar aquí por tanto, la obligatoriedad que se ha dado en muchos países a la pasteurización de la leche con la que se va a fabricar los quesos, cuando éstos van a sufrir un proceso madurativo inferior al que se considera suficiente como para que la flora indeseable se haya destruido totalmente. A la acción inhibitoria de la acidez del medio se suman también favoreciéndola, las elevadas concentraciones de cloruro sódico, los lactatos y determinadas enzimas.

Los lactobacilos termófilos, se incluyen entre los fermentos empleados en la elaboración de quesos de pasta cocida. Los lactobacilos mesófilos, constituyen la flora principal en la última fase de maduración en los quesos de pasta prensada no cocida y en algunos de pasta cocida, tanto en quesos elaborados con leche cruda, como pasteurizada. Al igual que los estreptococos, son tan abundantes en el medio ambiente de las queserías, que algunos autores no consideran necesaria su adición a los fermentos, incluso

trabajando con leche pasteurizada.

Según Ordóñez J.A. y col. (1.978 b) Núñez M. (1.976) y otros autores, sólo se han detectado en queso Manchego, L. casei y L. plantarum. La presencia de estas dos especies por otra parte, es normal en otros tipos de quesos según Feagan J.J. y col. (1.959); Ordóñez J.A. y col. (1.980 a) y Burgos J. y col (1.971). Parece ser que L. casei se instala más fácilmente en el queso que L. plantarum, pero si éste está presente en la leche, pasa al queso y persiste ordinariamente.

Los lactobacilos han sido estudiados en muchos tipos de quesos: Devoyod J.J. y col (1.970 b) en queso Roquefort; Johns C.K y col. (1.959); Perny K.D. y col. (1.960) en queso Cheddar; Syrjan sen H. (1.965) en queso Edam; Sharpe E. y col. (1.956) en queso Siltton; Ducastelle A. y col. (1.965) en queso St. Paulin; Sozzi T. y col. (1.973) en queso Vacherin; Núñez M. y col. (1.979) en queso Cabrales, etc...

El desarrollo de los lactobacilos comienza cuando los estreptococos lácticos ya no pueden seguir creciendo en el medio debido a la acidez de éste. Las células se lisan y liberan en muchos casos sustancias estimulantes para los lactobacilos, Branen A.L. y col. (1.969); Devoyod J.J. (1.969); Libudzise Z. (1.976); Branen A.L. y col (1.970). Éstos inician entonces su desarrollo, pudiendo llegar a constituir al final de la maduración una parte muy representativa de la población microbiana del queso. Sin embargo en algunos tipos de quesos como el St. Paulin, Ducastelle A. y col. (1.965), han encontrado que los lactobacilos no están presentes más que en un número muy débil y prácticamente insignificante en las cuajadas y los quesos muy jóvenes, tendiendo siempre

a multiplicarse a lo largo de la maduración, pero sin que su número llegue nunca a ser importante si se le compara con la población microbiana total. Lo mismo ha encontrado Devoyod J.J. (1970) en el queso Roquefort. Este autor ha encontrado que la mayoría de las cepas aisladas al principio de la fabricación, pertenece a la especie L. casei. Esta especie, exigente respecto de los nutrientes que necesita para su crecimiento se ve favorecida en general, por las vitaminas del grupo B y por péptidos que provienen del hidrolizado de proteínas y no se desarrolla en un medio con 10% de cloruro sódico. Por el contrario, las cepas que crecen en la superficie después del salado (L. plantarum), son capaces de desarrollarse en presencia de ésta misma concentración de cloruro sódico. El salado provoca por tanto una ligera disminución del número de lactobacilos, así como una selección entre ellos. Después del salado la flora total del queso Roquefort, está principalmente constituida por levaduras y micrococos, más resistentes a la sal que los lactobacilos.

Dentro del grupo de los gérmenes lácticos, es necesario tener en cuenta también, la presencia del género Leuconostoc. Estas son bacterias lácticas heterofermentativas, caracterizadas por una fermentación gaseosa de los azúcares, con producción además del ácido láctico, de CO<sub>2</sub>, diacetilo, acetona y otros ácidos volátiles que contribuyen a la formación del aroma. Son bacterias poco acidificantes comparadas con los estreptococos y los lactobacilos y también son inhibidos como los primeros, cuando el pH se acerca a 5.

Núñez M. (1.976) ha aislado de quesos Manchegos artesanales e industriales, ciento noventa y cinco cepas del género Leuconostoc, clasificadas como L. dextranicum, L. paramesenteroides,

L. mesenteroides, L. lactis y L. cremoris. Parece ser que las aptitudes tecnológicas de los Leuconostoc no están muy claras. Algunos autores como Overcast W.W. y col. (1.952), opinan que debido a su carácter heterofermentativo son capaces de producir, ojos e incluso cuando su número es excesivamente grande, agrietamiento en el queso Cheddar. Esto sin embargo, podría ser beneficioso en algunos tipos de quesos como el Roquefort, ya que favorecería el desarrollo de Penicillium; Devoyod J.J. (1.970). En el queso Vacherin, la existencia de pequeños ojos no se considera defecto y son debidos seguramente a la presencia del 10% de las cepas lácticas aisladas.

Ordóñez J.A. y col. (1.978b) opinan que la aparición de pequeños ojos en el interior de la masa del queso Manchego, podría ser muy bien debido a la presencia de bacterias de este género. Sin embargo Núñez M. y col. (1.979) encuentran en queso Cabrales, que la población de Leuconostoc permanece siempre por debajo de  $10^7$  gérmenes/gramo, lo que se considera insuficiente para jugar un papel importante en la apertura del queso.

Otro grupo de bacterias consideradas lácticas, está constituido por el género Pediococcus. Dichos gérmenes sin embargo, aunque han sido estudiados en algunos tipos de quesos como el Cheddar por Fryer T.F. y col. (1.966), no se consideran de gran valor tecnológico, debido quizás a su dificultad para desarrollarse incluso a bajas concentraciones de cloruro sódico. En el queso Manchego han sido estudiados por Núñez M. (1.976), clasificándose todas las cepas encontradas como P. pentosaceus.

En el grupo de gérmenes considerados como colaboradores en fermentaciones útiles, pero que pueden dar lugar a acciones

perjudiciales, se pueden incluir a los enterococos.

Se trata de gérmenes muy ubicuos de procedencia fecal o ambiental, betahemolíticos, con buena resistencia a temperaturas incluso de 60°C durante 30 mn. y con capacidad de multiplicación en medios clorurados y con sales biliares. Poseen resistencia a la penicilina a concentraciones relativamente elevadas y persisten durante mucho tiempo en anaerobiosis a pH superiores a 5.

Los enterococos se han estudiado bajo dos puntos de vista diferentes: como microorganismos indicadores de contaminación fecal por Brooks D.E.J. (1.974) y por su intervención en la formación del aroma.

Se admite generalmente la actividad metabólica de algunas cepas de enterococos, que dan lugar a productos metabólicos productores del aroma; bajo este punto de vista han sido estudiados en el queso Cheddar por Dahlberg A.C. y col. (1.943). Sin embargo y a pesar de que por esta propiedad pudieran considerarse beneficiosos, se les achaca en muchas ocasiones, la responsabilidad de los procesos infecciosos originados por el consumo de alimentos intensamente contaminados por estos gérmenes.

Se encuentran en casi todos los quesos, habiéndose aislado por Devoyod J.J. y col. (1.970a) en queso Roquefort, Jensen J. P. y col. (1.973, 1.975a) en queso Cheddar, Bovikinia V.S. (1969) en queso soviético, etc..., hallándose en algunos de estos quesos como el Cheddar, valores de hasta  $10^7$ - $10^8$  gérmenes/gramo.

En el queso Ulloa, Ordóñez J.A. y col. (1.977 a) observan un aumento en la tasa de enterococos progresivo a lo largo de toda la maduración, lo que concuerda con las experiencias de Kosikowski F.V. y col. (1.948) en el queso Cheddar y se opone a las conclusiones de Stadhouders J. (1.960), el cual afirma que la proliferación de enterococos no tiene lugar más que durante la elaboración del queso y no después durante la fermentación acidoláctica.

Ordóñez J.A. y col. (1.978 b) observan que de las ciento cincuenta y siete cepas de enterococos que aíslan de queso Manchego, un 80% pertenecen a la especie S. faecalis var. faecalis. Otros autores sin embargo, como Schemidt R.H. y col. (1.974); Masso Lago J. (1.974) y Núñez M. y col. (1.979), encuentran como especie predominante de los quesos estudiados por ellos a S. faecium.

Los estreptococos fecales, se han utilizado en algunas ocasiones como aceleradores de la maduración, añadiéndolos al fermento y de esta manera se han obtenido buenos resultados.

Finalmente en el grupo de gérmenes que pueden causar deterioro, se encuentran los Coliformes y en particular E. coli, Achromobacter, Flavobacterium, Pseudomonas, bacilos no esporulados, hongos, levaduras y las bacterias consideradas patógenas, responsables de las enfermedades infecciosas como son estafilococos coagulasa positivos y Clostridium.

Todos estos gérmenes son considerados de contaminación exógena.

Los productos lácteos pueden ser también portadores de otros tipos de gérmenes, que proceden directamente del ganado y se transmiten a través de la leche ordeñada. Estos son: Mycobacterium, Brucella, Salmonella, etc... responsables de las enfermedades transmitidas al hombre por contaminación endógena, y por tanto altamente patógenos.

Los coliformes son bacterias que se desarrollan entre 16°C y 40°C, siendo su crecimiento muy rápido a partir de 20°C. Alais Ch. realizó una experiencia en sesenta muestras de leche ordinaria procedentes de una explotación industrial, con 52 coliformes/cc. como término medio. Conservaba una parte de la leche a 16°C y otra a 21°C durante 24 horas. La leche mantenida a mayor temperatura, presentaba un número de coliformes del orden de  $60 \times 10^7$ , mientras que la otra parte de la leche conservada a 16°C, sólo era de  $10^6$  coliformes/co.

Frank J.F. y col. (1.977), realizaron experiencias de cultivos de E. coli, con diferentes concentraciones de bacterias lácticas y diferentes temperaturas en leche descremada, observando que la supervivencia de E. coli es mucho menor a menor temperatura de incubación (21°C frente a 32°C) y mayor concentración de bacterias lácticas (2,0% frente a 0,25%), debido al incremento de acidez ocurrido en el medio por el metabolismo de las bacterias acidolácticas, al cual son extraordinariamente sensibles los gérmenes coliformes; Hasono A. y col. (1.977).

Los coliformes se incluyen dentro de la familia Enterobacteriaceae, gérmenes en su mayoría, huéspedes normales del intestino de los mamíferos y por tanto su presencia en gran número en la leche, puede atribuirse a una contaminación fecal. En esta fami-

lia compuesta por bacterias Gram negativas, se incluyen además de los coliformes (fermentadores de lactosa con producción de gas), otras bacterias como Salmonella, Shigella, Serratia y Proteus (no fermentadoras de lactosa aunque si de otros azúcares). Dentro de los coliformes, las dos especies más comunes en la leche y productos lácteos son Escherichia coli y Aerobacter aerógenes. Estas bacterias son perjudiciales para los quesos frescos si se encuentran en gran cantidad, ya que provocan el hinchamiento de la pasta. Son poco sensibles a los antibióticos. Bester B.H. (1.976), inoculó leche con una concentración de células de Enterobacter aerógenes de  $1,23 \times 10^7$  /ml., observando que esto causaba hinchamiento por producción de gas, incluso cuando el queso en fabricación estaba aún bajo prensa. El contaje de estas bacterias disminuía rápidamente y desaparecía a las siete u ocho semanas. La leche inoculada con E. coli ( $7,8 \times 10^6$  /ml.), no causaba en principio este típico defecto, pero los organismos llegaban a alcanzar un número de  $1 \times 10^9$  gér./gr., causando después de doce semanas el abombamiento cuando el número de E. coli era todavía de  $2,8 \times 10^5$ /g.

Goicoechea A. y col. (1.979), observaron que a lo largo de la maduración del queso tipo Manchego, el número de coliformes disminuye progresivamente, llegando a desaparecer en algunos lotes de quesos. Este resultado es imputable a dos causas esenciales: disminución del pH, provocado por un aumento notable del número de gérmenes lácticos, especialmente en los primeros días de la maduración y una disminución en la actividad del agua. No observan sin embargo una influencia directa de la concentración salina sobre el número de coliformes.

Martínez Moreno, J.L. y col. (1.976) que estudian quesos

Manchegos artesanales e industriales, observan que en ambos tipos de quesos se alcanzan conteos máximos en la primera semana, del orden de  $10^6$ - $10^8$ /gr. En todos los quesos industriales, la población a los treinta días es inferior a  $10^2$ /gr., sin embargo en nueve de los diez quesos artesanales estudiados, los coliformes a los treinta días superan los  $10^4$ /gr.

Esta disminución en el número de coliformes, mucho más rápida en los quesos industriales que en los fabricados artesanalmente, se explica por los autores mediante dos causas: la consideración de que en los quesos de fabricación industrial, la población microbiana es mayor, debido al mayor tiempo transcurrido entre la recogida de la leche y la elaboración del queso.

Esto hace que el porcentaje de estreptococos lácticos/flora total de la leche de los quesos industriales, de 51% frente a 10,9% en la leche de quesos artesanales, ocasione una rápida disminución del pH que afecte a los coliformes. Grillenberg, G. y col. (1.979) encuentran también en quesos Emmental, mayor porcentaje de bacterias lácticas en los fabricados industrialmente, que en los fabricados de modo artesanal en todos los estadios de la maduración. Por otra parte, los quesos industriales sufren una deshidratación debido al recalentamiento de la cuajada que no se efectúa en el queso artesanal. El contenido en agua queda por tanto reducido a un 51,46% frente a 59,57% en estos últimos y esta disminución en la humedad, puede considerarse también como un factor que influye en la mayor desaparición de los coliformes en los quesos que se fabrican por procedimientos industriales. Todos estos resultados coinciden con los estudios realizados por Stadhouders, J. y col. (1.966).

Ordóñez J.A. y col. (1.978b) en queso Manchego, observan un número de coliformes inferior a  $10^5$ /gr. desde el primer mes de la maduración, desapareciendo casi completamente durante el proceso. Massó Lago J. (1.974) llega a los mismos resultados tras observar una serie de ondas de variación numérica, atribuibles quizás a la liberación de sustancias estimulantes del crecimiento por ciertas bacterias.

Los coliformes han sido muy estudiados en diferentes tipos de quesos: Dommet T.W. (1.970, 1.974, 1.975) y Gillies A.J. (1.973) en queso Cheddar; Fryer T.F. (1.975) en queso Gouda; Stephanova-Kondratenko M. (1.964) en queso Kashkaval, etc...

Galzin M. y col. (1.970) en queso Roquefort, destaca que en la superficie del queso, el número de coliformes disminuye constantemente volviéndose despreciable después del salado, siendo esta desaparición más lenta en el centro que en la superficie.

Mourgues R. y col. (1.977) demostraron en la Estación Experimental de Jouy en Josas, que en quesos de pasta blanda fabricados a partir de leche pasteurizada, el número de coliformes existentes durante la maduración está en relación directa con el número de ellos presentes en la leche inicial y demostraron que una contaminación inicial, incluso débil de la leche en gérmenes coliformes, puede llevar en el curso de la maduración a una multiplicación enorme difícilmente compatible con las normas de higiene ( $10^6 - 10^8$  en algunos casos). Los coliformes que se desarrollan en la maduración y conservación por el frío de este tipo de quesos, pertenecen en su mayoría a la especie E. hafniae. Estas bacterias son conocidas por su aptitud a desarrollarse a temperaturas relativamente bajas, y se consideran bacterias psicrófilas.

Las cepas enteropatógenas de E. coli, desaparecen mucho antes que las de E. hafniae en la conservación a 4 grados centígrados.

Existe un máximo en el desarrollo de E. coli enteropatógenas, seis horas después de añadido el cuajo, disminuyendo luego los gérmenes en el curso de la maduración, tanto más rápidamente cuanto más acidificante sea el fermento utilizado.

Desde el punto de vista sanitario, los quesos pueden vehicular algunos gérmenes considerados como patógenos, cuyo crecimiento en la leche depende de la temperatura y en ocasiones de la acidez del medio.

-A 37°C el crecimiento de los gérmenes es rápido salvo para M. tuberculosis, que se desarrolla muy lentamente. Un queso Camembert, cuya leche de fabricación estuviera infectada, contendría bacilos tuberculosos vivos aún después de tres meses. Sin embargo en un queso de pasta cocida, donde la temperatura de calentamiento de la cuajada (55°C - 30 a 40 mn.) es muy inferior a la pasteurización clásica, dicho tratamiento junto con una maduración suficientemente larga, es bastante para destruir completamente el bacilo tuberculoso.

- A 15°C continúan multiplicándose, pero muy lentamente.
- Por debajo de 10°C, no hay crecimiento.
- A 5°C, la conservación prolongada no provoca destrucción apreciable.

Las Salmonellas pueden resistir durante mucho tiempo, incluso a temperaturas de conservación de -20°C. En el queso Manchego, los serotipos toxiinfecciosos más frecuentes son S. typhimurium y S. enteritidis. Estos son los denominados "poco adapta-

dos al hombre". También pueden aparecer algunos de los adaptados a la especie humana, como S. typhi y S. paratyphi, causantes de las fiebres tifoideas. Estos últimos no resisten normalmente los medios ácidos (ph: 4,6-4,8), pero en ocasiones pueden aparecer cepas acidotolerantes.

Respecto de las Brucellas se puede decir que, los tres tipos de Brucellas conocidas, son patógenas para el hombre y pueden encontrarse en la leche: Brucella melitensis albergado en la leche de cabra, Brucella abortus bovis en la leche de vaca y Brucella abortus suis en la leche de cerda. La más peligrosa es sin duda la Brucella melitensis, agente causal de la fiebre ondulante o melitococia. Este agente patógeno puede encontrarse también en la leche de vaca.

Las Brucellas sin embargo, son microorganismos infecciosos con bastante sensibilidad a las influencias ambientales (calor, salinidad del medio y especialmente acidez), lo que quiere decir que cuando la tecnología es correcta, sobre todo si la contaminación de la leche no es excesiva, las Brucellas son generalmente eliminadas en los primeros quince días de maduración.

En el caso de los estafilococos, si el pH no desciende por debajo de 5 (acidificación insuficiente), el número de gérmenes queda inalterado ó incluso puede incrementarse a lo largo del tiempo.

Martínez Moreno J.L. y col. (1.976) aisló cuarenta y seis cepas de estafilococos de leche de oveja y queso Manchego artesanal. Los estafilococos coagulasa positivos representaron el 5% de los aislamientos; los coagulasa negativos el 22% y los microco

cos el 73% restante. Dada la escasa importancia numérica de los estafilococos coagulasa positivos y su rápida desaparición en el queso, especialmente cuando las bacterias lácticas predominan desde los primeros estadios de la maduración y dada también la escasa actividad proteolítica, lipolítica y la extraordinaria sensibilidad al pH de los coagulasa negativos, no se considera a este grupo con capacidad tecnológica suficiente, como para participar en la maduración del queso Manchego.

Todos estos resultados coinciden en general con los obtenidos por Devoyod J.J. (1.969), quien trabajando con queso Roquefort observa una mayor desaparición de los estafilococos coagulasa negativos en la superficie del queso respecto del interior, donde pueden permanecer hasta diez días después de la maduración. Los estafilococos desaparecen rápidamente, debido también a la influencia de la sal en queso Cabrales; Núñez M. y col. (1.980).

Otros muchos autores, han estudiado también la variación de estafilococos en la leche y productos lácteos: Luquet F.H. (1.968); Thatcher F.S. y col. (1.960); Tuckey S.L. y col. (1.964).

Con relación a Clostridium, casi nunca se ha encontrado en queso Manchego, a parte de C. botulinum, otro germen de este género más que C. perfringens. Las esporas son termorresistentes y no se destruyen, incluso a temperaturas de pasteurización. Se trata de un germen muy ubicuo, que puede encontrarse en el suelo, polvo, agua, alimentos crudos y en las heces de algunos animales. Uno de los más peligrosos es Clostridium tyrobutyricum, causante de la denominada "hinchazón butírica", frecuente en los quesos de pasta cocida. Debido a la termorresistencia de las esporas, se recomiendan las técnicas de bacterofugación para su eliminación,

cuando se sospechan contaminaciones importantes, aunque los *Clostridium* no resisten una elevada acidez, lo que supone su posible inhibición por los fermentos lácticos.

Existe por último, un grupo de microorganismos con actividades proteolíticas y lipolíticas importantes, que son los micrococos. Estos han sido estudiados en diversas clases de quesos: Alford J.A. y col. (1.950) en queso Cheddar; Devoyod J.J. (1.969) en queso Roquefort; Langsrud T. y col. (1.973) en queso Emmental etc... En queso Manchego han sido estudiados por: Ortiz de Apodaca M.J. y col. (1.979); Martínez Moreno J.L. (1.976); Núñez H. y col. (1.976); Román Piñana M. (1.975)...

Ortiz de Apodaca M.J. y col. (1.979), encuentran que *M. lactis* es la especie más abundante en el queso Manchego (alrededor del 60%), cifra más o menos coincidente con la encontrada por Ordóñez J.A. y col. (1.977) para el queso tipo Ulloa y Ordóñez J. A. y col. (1.980) para el queso de Roncal. Ducastelle A. y col. (1.965) en queso St. Paulin detectan un porcentaje mayor, alrededor del 75% de *M. Lactis*.

No existe concordancia de todos los autores acerca de la permanencia de los micrococos en el queso. Para unos, como Ordóñez J.A. y col. (1.977) desaparecen al poco tiempo de comenzar la maduración, ya que después de veinticinco días no pueden ser detectados. Román Piñana M. (1.975), los detecta en número poco importante desde el principio de la maduración en quesos Manchegos parafinados, quedando más o menos constantes a lo largo de ella. Sin embargo para otros como Devoyod J.J. y col. (1.966), la permanencia puede ser de hasta seis meses en queso Roquefort, debido a la gran contaminación a través de la salmuera.

La leche ordeñada asépticamente no contiene microorganismos de este tipo, por tanto los micrococos del queso proceden del aire, piel, polvo y fundamentalmente de la salmuera.

Devoyod J. J. y col. (1.969) observan en la superficie del queso Roquefort, que la mayor parte de la flora está constituida por los micrococos que son aportados en grandes cantidades por la sal, teniendo en esta parte del queso condiciones óptimas para su desarrollo. En el centro del queso sin embargo, no es más que diez días después del salado, cuando los micrococos se vuelven dominantes en relación a los estafilococos.

Román Piñana M. (1.975), trabajando con quesos Manchegos no parafinados, observa un aumento importante en el número de estos microorganismos justo después del salado, hasta el primer mes antes de retornar a las débiles concentraciones iniciales ( $0,5 \times 10^3$  gérmenes/ml.), considerando por tanto que los micrococos no juegan un papel demasiado importante en estos tipos de quesos.

Núñez M. y col. (1.980) encuentran en queso Cabrales, que los micrococos quedan constantes en el interior del queso y proliferan activamente en su superficie durante la primera maduración. Durante la segunda maduración, aumentan tanto en el centro como en la superficie, donde constituyen la flora dominante, para disminuir fuertemente al final de la maduración.

### 2.3. IMPORTANCIA MICROBIANA EN LA TECNOLOGIA QUESERA.

Sin restar importancia a los enzimas aportados por el cuajo y allos que forman parte de la leche, son los endo y exoenzimas microbianos los que catalizan principalmente las transformaciones.

Sin embargo los gérmenes no actúan generalmente solos, sino formando grupos de acción enzimática semejante sobre los componentes de la cuajada y del queso. Así por ejemplo: los enzimas proteolíticos, además de los que provienen del cuajo y de la leche misma, proceden en cada determinado momento de un grupo heterogéneo de microorganismos, que van variando su actividad metabólica, a medida que avanza la maduración. En el caso de los estreptococos, que son considerados flora dominante al principio de la maduración, tienen en este momento prioritariamente un papel acidificante, ya que transforman intensivamente la lactosa en ácido láctico; sin embargo y a la vez que realizan este papel, liberan al medio enzimas exocelulares que actúan directamente sobre la materia nitrogenada. A medida que avanza la maduración y cuando el pH es lo suficientemente bajo, las células se lisan y entonces su acción proteolítica se intensifica por la liberación de endoenzimas. El poder proteolítico en este momento supera la capacidad de producir ácido láctico y su acción metabolizante ahora, es por tanto diferente de la que tenían al principio.

Es más lógico por tanto, hablar en cada estadio de la maduración de grupos de gérmenes con la misma acción enzimática y la repercusión que el número de ellos tiene sobre los cambios bioquímicos ocurridos en el queso. Esto es en parte lo que se va a tratar de analizar en este trabajo.

Hablaremos por tanto de gérmenes acidófilos, gérmenes de acción proteolítica y gérmenes de acción lipolítica.

### 2.3.1. Gérmenes acidófilos.

Se consideran gérmenes acidófilos, las bacterias capaces de producir ácido láctico a partir de la lactosa. Este proceso puede ser una homofermentación (sin producción de CO<sub>2</sub> fundamentalmente, además de ácido acético, etanol, etc...)

Según Marth E.H. (1.963), las bacterias lácticas homofermentativas son los estreptococos ( S. lactis y S. cremoris principalmente), Streptobacterium (lactobacilos mesófilos) y Thermobacterium (lactobacilos termófilos). Las bacterias lácticas heterofermentativas están constituidas por los Leuconostoc y las betabacterias.

La misión fundamental de los gérmenes acidófilos, consiste en transformar la lactosa en ácido láctico, consiguiendo con ello rebajar el pH en la medida suficiente, en que pueda ser destruida la flora indeseable.

El papel acidificante de los estreptococos lácticos y el de los lactobacilos, ha sido estudiado desde hace bastante tiempo por muchos autores como Evans A. y col (1.914), (1.918); Naylor J. y col. (1.958), etc..., Algunos investigadores como Usajewicz I. y col. (1.976), han encontrado que cultivos de estreptococos fecales ( S. faecalis, S. bovis) pueden influir directamente en la producción de ácido por S. lactis, intensificándola, así como en su actividad proteolítica, aunque estos mecanismos no están totalmente interpretados.

La diferente resistencia de las dos especies (S. lactis y S. cremoris), mayor en el segundo que en el primero, permite crear condiciones adecuadas para que proliferen determinados organismos y se implante una flora con intervención directa en la formación del aroma.

Respecto de los lactobacilos se puede decir, que los heterofermentativos, cuyo ritmo de proliferación es menor que el de los homofermentativos, son nefastos en la industria, pues debido a la producción de CO<sub>2</sub>, pueden provocar agrietamiento e hinchamiento de los quesos, lo que rebaja notablemente su calidad.

#### 2.3.2. Gérmenes de acción proteolítica.

Los gérmenes de acción proteolítica son aquellos que liberan al medio proteinasas, que descomponen la materia proteica, fundamentalmente las caseínas y dan lugar a péptidos más sencillos, aminoácidos y amoníaco.

Se han estudiado por diversos autores medios selectivos para su detección y aislamiento: Martley F.G. y col. (1.970); Frazier W.C. y col. (1.928); Zaadhof K.J. y col. (1.967); Bovikinia V.S. (1.969); Frazier W.C. (1.926); siendo los medios de agar adicionados de caseinato cálcico, los que han dado mejores resultados. Las bacterias proteolíticas se reconocen por los halos originados a su alrededor debido a la digestión de la caseína y han sido estudiados entre otros por: Baribo L.E. y col. (1.952), Gale E.F. (1.940), Lusiani G. y col. (1.971), así como ha sido estudiada también la influencia del medio y la temperatura sobre dicha actividad proteolítica: Christophersen J. y col. (1.952).

Los gérmenes que intervienen principalmente en la proteo-

lisis del queso a lo largo de toda la maduración, son sin lugar a dudas los estreptococos y los lactobacilos.

La actividad proteolítica de las bacterias lácticas ha sido estudiada por: Bottazi V. (1.965); Cowmann R.A. y col. (1967) y (1.968); Desmanzeaud M. y col (1.970); Dolezalek J. (1.966); Jespersen T.N. (1.966); Kikuchi T. y col. (1.973) y (1.974); Law B. A. y col. (1.974); Ohmiya K. y col. (1.968, 1.969, 1970aby1972) Röpp M. (1.969); Sato Y. y col. (1.965); Tofte Jespersen N.I. (1.966); ZaLasKo, M.V. y col. (1.969)

Dolezalek J. (1.966), incuba cultivos puros en leche descremada estéril de S. lactis, S. diacetylactis, L. helveticus y L. casei con temperatura óptima, durante treinta días, observando una mayor actividad proteolítica de los lactobacilos frente a los estreptococos. Dentro de estos últimos, S. diacetylactis, fue considerado el más similar en poder proteolítico a los lactobacilos. La cantidad de nitrógeno solubilizado, fue de 1-2% para los estreptococos, mientras que el incremento para los lactobacilos fue de 4-5%, presentando los lactobacilos termófilos mayor actividad proteolítica que los mesófilos.

Por otro lado Röpp M. (1.969), observaba en cultivos puros sobre leche descremada, que la hidrólisis de la caseína fue mayor para L. acidophilus, seguido de L. bulgaricus, L. helveticus, L. casei; Dilayan Z.K. y col. (1.978) sin embargo, clasifican en orden decreciente de actividad sobre la caseína a L. helveticus, L. casei y L. plantarum, expresando la actividad proteolítica en unidades DO y dando 0,037 para L. helveticus; 0,028 para L. casei; 0,016 para L. plantarum; 0,010 para S. bovis y 0,007 para S. lactis. De cualquier forma, la actividad proteolítica

sobre la caseína, es siempre mayor para los lactobacilos que para los estreptococos.

A menudo ocurre sin embargo, que dar el "ranking" de actividad proteolítica entre especies puede ser peligroso, ya que diferencias existentes entre cepas de una misma especie, pueden ser incluso mayores que entre especies distintas, siendo en general la diferencia fisiológica entre dichas cepas, la resistencia variable frente a la temperatura y el óptimo de pH al que actúan sus actividades enzimáticas.

Moller-Madsen A. y col. (1.976), estudian cultivos puros de S. lactis, S. diacetilactis y S. cremoris, observando que todas las cepas tienen actividad proteolítica parecida (1,2-1,8 de NPN en filtrado, después de veinte horas de incubación a 30°C); las cepas son actividades proteolíticas a pH óptimos próximos a la neutralidad y la acidez se dividen en tres grupos: de alta, media y baja actividad (>10%; 4-10% y <4% respectivamente), correspondiendo la mayor actividad proteolítica a las cepas más productoras de ácido, S. cremoris.

Aún más, puede ocurrir que la extrapolación de la actividad proteolítica, medida en sistemas de leche a sistemas de queso no tenga ningún valor, debido a la existencia en éste, de condiciones subóptimas en algunos casos para la actividad enzimática.

Varios estudios, donde los lactobacilos mostraron una extensa hidrólisis de la caseína de la leche, no han podido ser posteriormente confirmados en sistemas de quesos, Tittsler R.P. y col. (1.948); Payens A.J. (1.958); Stadhouders J. (1.960). Pa recería por tanto lógico evaluar la actividad enzimática de los

los gérmenes proteolíticos en sistemas modelos de quesos fabricados asépticamente a partir de cuajadas, donde sólo interviene el cuajo como elemento coagulante y a las que son añadidas posteriormente las bacterias ó los extractos enzimáticos que queremos estudiar. Estos sistemas poseerán por tanto propiedades perfectamente controladas; O'Keefe R.B. y col. (1.976a) Perry K.D. y col. (1.964); Reiter B. y col. (1.967).

La actividad proteolítica efectiva total en el queso, puede ser medida por los contajes celulares totales, la actividad de los diferentes enzimas proteolíticos bajo las condiciones de estudio, el tiempo y grado de la lisis celular y la influencia de la concentración de sustratos formados por otros agentes (p.e. el cuajo).

Singh A. y col. (1.972) en cuajadas acidificadas directamente sin cuajo y maduradas con mezclas de estreptococos, observaban muy poca digestión de caseína. La adición del cuajo a cuajadas calentadas y no calentadas, dió una degradación detectable de la caseína después de veinticuatro horas de almacenamiento y principalmente de  $\alpha s_1$  caseína. Por otro lado Ohmiya K. y col. (1970 ab) observaron, que cuando a las cuajadas fabricadas asépticamente se les añadían bacterias lácticas como fermento, la autólisis celular comenzaba a los doce días de maduración, con la consiguiente liberación simultánea de proteasas y peptidasas intracelulares. Estas atacaban principalmente la  $\alpha s_1$  caseína.

El cuajo es por tanto el principal agente de la digestión de la caseína entera, así como la  $\alpha s_1$  caseína, si bien en este último caso no es el único.

Parece ser que la concentración de la sal y el bajo contenido en humedad de los quesos, son los responsables de la lenta hidrólisis de la caseína.

Reiter B. y col. (1.969), fabricaban cuajadas asépticas control, con leche calentada y no calentada y almacenada en refrigeración tres meses, observando que contenían la misma cantidad de N soluble en agua, mientras que la cantidad de aminoácidos, fue superior en las cuajadas fabricadas con leche no calentada que en las calentadas. Probablemente la fosfatasa alcalina de la leche, sea la responsable de la liberación de aminoácidos en las cuajadas asépticas control y su alteración por el tratamiento térmico se traduzca en una menor liberación de aminoácidos. Ahora bien, cuando a dichas cuajadas se les incorporaba S. cremoris como fermento, los niveles de aminoácidos detectados fueron mucho mayores. De esta manera los autores demostraron que la liberación de aminoácidos en el queso, es causada principalmente por la acción de las peptidasas de las bacterias del fermento, alcanzándose la máxima actividad peptidásica intracelular, cuando se destruye el 90% de la población.

En los quesos, son mucho más abundantes los microorganismos cuya actividad proteolítica se limita casi exclusivamente a degradar compuestos de bajo peso molecular, (obtenidos principalmente por la acción del cuajo) para dar aminoácidos. A estas conclusiones han llegado también Desmanzeaud H.J. y col. (1.979) en quesos de pasta prensada, O'Keefe R.B. y col. (1.976, 1.978) en queso Cheddar y Visser F.M.W. (1.977) en queso Gouda. Sin embargo, estudios de la actividad caseolítica de extractos enzimáticos intracelulares de doce cepas de estreptococos y lactobacilos, por medio de técnicas de espectrofotometría y electroforesis, han dado como resultado, que todos poseen un sistema enzimático caseolítico.

pero con variaciones en extensión e intensidad, cuya acción proteolítica lleva a la aparición de compuestos de baja movilidad electroforética y compuestos no precipitables en TCA. La  $\alpha$  y  $\beta$  caseína son hidrolizadas, aunque lo es más fácilmente la  $\alpha$  caseína; Carini S. (1.969). Los extractos intracelulares de los estreptococos parecen causar mayores concentraciones de compuestos solubles en TCA, pero menores alteraciones en el comportamiento electroforético de la caseína, que los lactobacilos. Estos parecen tener mayor capacidad par degradar la caseína entera que los estreptococos; Ordóñez J.A. y col. (1.980 a) Dilanyan Z.K. y col. (1.978).

En cualquier caso el papel proteolítico de los lactobacilos, que constituyen la flora dominante al final de la maduración en los quesos de pasta cocida, consiste principalmente en desaparecer en el curso de la misma, con la consiguiente liberación de enzimas intracelulares (carboxipeptidasas, aminopeptidasas y dipeptidasas), que llevarán a la liberación de aminoácidos y productos susceptibles de constituir los elementos del aroma y sabor. La actividad proteolítica de los lactobacilos ha sido muy estudiada: Bottazzi V. (1.965); McDonald I.J. (1.955); Annibaldi S. (1.962); Dolezalek J. (1.966); Sato Y. y col. (1.965); Ohmiya K. y col. (1968) Tomaszewska J. (1.978).

Las diferentes cepas del género *Lactobacillus* poseen un sistema proteásico endocelular, caracterizado por una actividad máxima a valores de pH próximos a los de los quesos en curso de maduración. Cowmann R.A. y col. (1.967); Schmidt R.H. (1.972) y Krishnan C.P. y col. (1.974) dan un pH óptimo de 7,0 para la actividad proteásica intracelular de *S. lactis*, *L. dextranicum* y *L. casei*. Sin embargo Baribo L.E. y col. (1.952) y Brandsaeter E. y col. (1.956), dan una actividad proteolítica máxima de *L. casei* a un pH

de 6 y temperatura máxima de 40-45°C. Los enzimas sintetizados poseen una actividad de tipo exopeptidásica y liberan preferentemente compuestos de bajo peso molecular. Según Sato Y. y col. (1965), las máximas actividades de las proteasas intracelulares de L. bulgaricus y L. casei se alcanzan durante la fase de crecimiento logarítmico, es decir, a las cuarenta y ocho horas de incubación. Numerosas cepas poseen una actividad proteásica debida en parte a la presencia de enzimas de superficie; Tourneaur C. (1.972). Núñez M. (1.976), sin embargo, en quesos Manchegos artesanales e industriales, encuentra una escasa actividad proteolítica de las dos especies dominantes de lactobacilos: L. casei y L. plantarum.

Por otro lado, el rápido aumento en la proteólisis de un medio de crecimiento inoculado con bacterias del fermento, se debe lógicamente a la existencia de proteasas extracelulares.

Sasaki R. y col. (1.959), purifican una enzima extracelular de S. lactis con un pH óptimo de 8,5 y una gran estabilidad al calor. La enzima parece exigir para su actividad, grupos sulfhidrilos. Por otro lado Baribo L.E. y col. (1.952), aíslan una proteasa intracelular de S. lactis que posee máxima actividad entre 40-50°C. Según Krishnan C.P. y col. (1.974), la actividad proteásica intracelular de S. cremoris tiene su pH óptimo a 6,5 a 40°C. Según Maret R. y col. (1.978), la actividad proteolítica de las bacterias lácticas mesófilas (S. cremoris, S. lactis, S. diacetylactis...) se manifiesta sobre todo en la zona de pH entre 4,6-7,0.

Zanf W.C. y col. (1.954), estudian mediante técnicas de titulación la actividad peptidásica intracelular de células rotas de S. lactis. El máximo de hidrólisis fue observado a pH de 7,0 a

a 8,5. La enzima calentada a 55°C durante 30 mn. a pH de 7,0 no tuvo ningún efecto. Rabier D. y col. (1.973) purifican una dipeptidasa de pM: 50 daltons de S. thermophilus, cuya máxima actividad sitúan a pH 7,5 y 50°C de temperatura.

Además de los estreptococos lácticos, los estreptococos fecales participan también en la maduración de los quesos.

Sozzi T. y col. (1.975), encuentran queso Vacherin que los enterococos son numéricamente los microorganismos más representativos, con un poder proteolítico muy importante en el curso de la maduración. A idénticos resultados llegan Ordóñez J.A. y col. (1.977 a) en el queso Ulloa, quienes han demostrado la actividad proteolítica de S. faecalis, el cual parece que actúa sólo sobre la caseína.

Según Schmidt J.L. y col. (1.972), S. faecium y S. durans, poseen proteasas endocelulares con pH óptimo a 7,5 y óptimo secundario entre 5,5 y 6. Se ha aislado también por parte de Shugart L.R. y col. (1.964) una proteasa exocelular de pH óptimo 7,6 a 35°C.

En algunas ocasiones, la actividad proteolítica de los enterococos y probablemente también de las levaduras, son factores estimulantes para el crecimiento de los lactobacilos. Devoyod J. J. y col. (1.971) en queso Roquefort encuentran que la transformación de la caseína en péptidos por parte de S. faecalis y la acción fermentadora de la lactosa por parte de las levaduras, contribuyen al desarrollo de L. casei aportando al medio, péptidos, y vitaminas indispensables, que normalmente no se encuentran en la leche.

Las bacterias del género *Leuconostoc*, no se han considerado nunca fuertemente proteolíticas.

Tokita F. y col. (1.976), han estudiado el sistema proteolítico intracelular de *L. citrovorum* observando que la producción de proteasa aumenta mucho en la fase logarítmica de crecimiento, alcanzando el máximo a las veinticuatro horas de incubación. De todas las cepas de *Leuconostoc* aisladas por Núñez M. (1.976) en queso Manchego (*L. lactis*, *L. cremoris*, *L. dextranicum*, *L. mesenteroides* y *L. paramesenteroides*), la que daba mayores valores de N soluble en ácido fosfotúngstico era *L. mesenteroides*, no considerándose de todas formas ninguna de ellas con una actividad proteolítica notable.

Los micrococcos son gérmenes también, cuyas actividades proteolíticas pueden ser tomadas en consideración, si bien no son las más importantes en la maduración de los quesos. Según Baribo L.E. y col. (1.952), los extractos celulares de *M. freudenreichii* son proteolíticos sobre sustratos de caseína, pero extremadamente lábiles en las condiciones normales de maduración de los quesos, no teniendo ningún efecto sobre los cambios ocurridos en el NPN y AN; Stadhouders J. (1.960) Por el contrario, algunas cepas de *M. caseolyticus* pueden liberar una metaloproteasa exocelular muy activa sobre las caseínas, cuyo pH óptimo es de 7,40 (Desmanzeaud M.J. y col. 1.972), con lo que sólo podría intervenir eficazmente al final de la maduración.

### 2.3.3. Gérmenes de acción lipolítica.

Menos información aún se posee sobre el poder lipolítico de los gérmenes que intervienen en la maduración de los quesos, excepto en los madurados por mohos. Existen trabajos sobre la actividad lipolítica de las bacterias: Alifax R. (1.972); Alford J.A. col(1.961); Carini S. y col. (1.972); Singh A. y col. (1.973, 1.975 y 1.976a) Umemoto Y. y col. (1.975); Rajorhiac G.S.col(1980) y sobre los medios de cultivo apropiados para su detección y aislamiento; Brandl E. (1.970); Fryer T.F.col(1967a) Sierra G. (1.957) Umemoto Y. (1.969); pero todas estas experiencias aclaran poco, respecto del verdadero papel lipolítico de las bacterias en la maduración de los quesos.

De una manera general se puede decir que los microorganismos, realizan la lipólisis del cuerpo graso en tres etapas. En una primera etapa, existen una serie de reacciones de hidrólisis sobre los triglicéridos. Hay una liberación de ácidos grasos volátiles, butírico principalmente. En una segunda etapa, puede haber liberación de ácidos grasos de cadena larga, saturados e insaturados. Estos últimos pueden dar lugar en una tercera etapa y mediante reacciones de oxidación a compuestos como peróxidos, hidroperóxidos, compuestos cetónicos y aldehídos.

Muchas de las bacterias aerobias fuertemente proteolíticas, son a la vez lipolíticas. Las lipasas de los microorganismos psicrófilos pueden intervenir en la maduración de los quesos y resistir en muchas ocasiones las temperaturas de pasterización, aún cuando éstas no sean resistidas por los propios gérmenes. Pseudomonas es un género con especies lipolíticas como P. fluorescens, según Brandl E. y col. (1.973) y P. Fragi, según Singh A. y col(1973). También se han hallado especies lipolíticas de Achromobacter, Al-

calígenes y *Micrococcus*; Seitz E.W. (1.974), *Propionibacterium*, posee también especies lipolíticas como *P. shermanii*, si bien algunos autores como Knaut T. y col. (1.974) consideran a *P. freudenreichii* como la especie más lipolítica. Carini S. y col. (1.971), demuestran la fuerte actividad lipolítica de algunas especies de bacterias propiónicas (*P. shermanii*, *pentosaceus*...), aislando una lipasa no específica capaz de hidrolizar todos los ácidos grasos de los glicéridos, dando compuestos secundarios y produciendo ácidos volátiles, ácido isobutírico y diacetilo en diversas cantidades según las cepas.

Según Alifax R. (1.975), las bacterias del grupo coliforme, también pueden poseer actividades lipolíticas; sin embargo, la mayor parte de los enzimas de estos grupos, ejercen una hidrólisis sobre la materia grasa de los quesos muy escasa, ya que su permanencia en los mismos debido a la acidificación progresiva es muy corta.

Reiter B. y col. (1.967, 1.969), opinan que el queso Cheddar las lipasas bacterianas son menos importantes que en la leche y su contribución a la lipólisis en el queso, no tiene ninguna significación.

En los quesos duros, no madurados por hongos, la mayor parte de la lipólisis bacteriana es ejercida por las bacterias lácticas; Fryer T.F. y col. (1.967); Oterholm A. y col. (1.968); Yu J.H. y col. (1.975). Umanskii M.S. y col. (1.974), estudian cultivos de bacterias lácticas en leche, llegando a la conclusión de que *S. diacetylactis* presenta mayor actividad lipolítica, seguido de *L. lactis*, *L. helveticus* y *S. thermophilus*.

Stadhouders J. y col. (1.973) sin embargo, estudiando las actividades lipolíticas de los estreptococos lácticos, confirman que éstos, tienen una débil capacidad de hidrolizar los triglicéridos, a excepción de aquellos cuyos ácidos grasos sean de cadena corta como la tributirina, que es en general hidrolizada por todas las especies. Los estreptococos lácticos no liberarían por tanto, ácidos grasos más que a partir de una materia ya modificada.

En general la acción lipolítica de los estreptococos fecales, se considera superior a la de los estreptococos lácticos y se ha podido demostrar la actividad lipolítica de algunas cepas de S. faecalis, para la cual es necesaria la presencia de algunos aminoácidos, Chander H. y col. (1.972) y Chander H. y col. (1.975).

Martínez Moreno J.L. (1.976) sin embargo, en queso Manchego considera que la actividad lipolítica de S. lactis, como estreptococo más abundante en este queso, cuyo pH óptimo es aproximadamente de 5,0, no contribuye a desarrollar de modo importante el sabor típico del queso. De todas las cepas de lactobacilos aisladas, ninguna tiene consideración importante tampoco, respecto de la actividad lipolítica.

Ortiz de Apodaca M.J. y col. (1.979) trabajando con queso Manchego, aíslan cepas de micrococos con una actividad lipolítica, nueve veces superior a la de los estreptococos lácticos, y poder de degradación superior al de éstos, ya que pueden actuar también sobre los triglicéridos de cadena larga. Con esto llegan a la conclusión, de que los micrococos en este queso tienen una participación más activa en la lipólisis en el curso de la maduración,

puesto que superan en actividad a las bacterias lácticas consideradas como los gérmenes más abundantes en estos tipos de quesos. La actividad lipolítica de los micrococos ha sido estudiada también en queso Cheddar. Según Veisseyre R. (1.975), M. freudenreichii poseería una lipasa intracelular cuyo pH óptimo de acción se sitúa entre 8,0-8,5.

Sin embargo en los quesos blandos, madurados por mohos la actividad lipolítica desarrollada por éstos, tiene realmente importancia. Los sistemas enzimáticos de los mohos han sido estudiados desde hace tiempo por diversos autores: Alifan R. (1.975<sup>a</sup>) Wilcox J.C. y col. (1.955), Harper W.J. y col. (1.956), Lamberet G. y col. (1.972), Lamberet G. y col. (1.976 a y b), Nelson W.O. (1.953), Dluzewski M. (1.963) etc...

P. roqueforti, principal hongo madurado de los quesos azules, libera progresivamente ácidos grasos por medio de dos lipasas; Niki T. y col. (1.966). Después de la purificación parcial por precipitación con sulfato amónico, demuestran que la actividad enzimática es máxima a pH: 8,0 y a 37°C de temperatura, siendo el mejor sustrato, la grasa de mantequilla. Esta lipasa es termolábil y se inactiva a 50°C después de 10 mn., P. caseicolum, posee también un sistema lipásico termolábil con lipasas endo y exocelulares, aisladas por Lamberet G. y col. (1.976 a y b) cuyo pH óptimo de acción está entre 9,0-9,6.

Tsujiisaka Y. y col. (1.973), purifican una lipasa termolábil localizada en el interior de paredes celulares de Geotrichum candidum, que a diferencia de las lipasas alcalinas de Penicillium actúa de manera óptima a pH entre 5,7-7,0 aunque puede ser estable a pH entre 4,3 y 9,8. Su optimicidad al pH de los

quesos en maduración, la hace especialmente interesante en la lipólisis de los quesos blandos.

#### 2.4. CONGELACION DE QUESOS.

La utilización más general del frío en la industria quesera está basada fundamentalmente en la conservación del producto ya madurado en régimen de refrigeración.

Yubero Cárcamo A. (1.960), hace un estudio de las condiciones que debe reunir el queso Manchego para su conservación por el frío y explica el estado de maduración, la edad, el estado de la corteza y otra serie de características que se tienen que dar en dicho queso, para asegurar una buena conservación en las cámaras frigoríficas hasta su puesta a la venta.

El problema más importante que se plantea en la conservación de los quesos en régimen de refrigeración, es el mantenimiento de una temperatura y humedad relativa adecuadas en los locales, con el establecimiento de una atmósfera homogénea por medio de corriente de aire controlada. Si ésta es demasiado rápida y no suficientemente húmeda, pueden aparecer accidentes de fabricación ("gèrce" o grieta del Gruyère).

Actualmente, se han ensayado métodos de congelación de cuajadas y quesos frescos en muchos países, siendo ya una práctica cada vez más común: Oehen V. y col. (1.964) en queso Emmental; Kapac-Parkacev N. y col. (1.967) y Pettinau H. y col. (1.973) en queso blanco de leche de oveja; Shannon C.W. (1.975) en queso Cheddar; Costamagna L. (1.976) en quesos Mozzarella y Strachchino, etc...

De una manera general se puede decir que las bajas temperaturas producen en los quesos, tres efectos muy importantes:

- a) Congelación del agua.
- b) Retraso de las reacciones químicas.
- c) Prevención del crecimiento microbiano.

a) Congelación del agua

La congelación del agua en el producto, influencia fuerte mente la calidad del mismo, aunque sólo sea por el efecto físico de la formación de cristales de hielo. Estos pueden distorsionar la estructura interna del queso y volverlo granuloso o pastoso, una vez que ha sido descongelado.

Una congelación rápida, da como resultado la formación de cristales de hielo extremadamente pequeños, lo que podría ser apropiado para paliar en alguna medida este efecto. Tiersonnier D. (1.970) que estudia la congelación de cuajadas de leche de cabra en estaciones de alta producción, considera que ésta ha de ser rápida en túnel a  $-35^{\circ}\text{C}/-40^{\circ}\text{C}$  con una temperatura en el núcleo de  $-20^{\circ}\text{C}$  y para un tiempo de conservación no superior a seis meses. Considera este autor, que la congelación lenta en cámara ventilada a  $-25^{\circ}\text{C}$  no es recomendable, ya que los quesos fabricados a partir de cuajada congelada de esta manera, son de menor calidad. Edmons D. B. y col. (1.968), congelan rápidamente en nitrógeno líquido cuajadas cottage, encontrando cualidades organolépticas muy insatisfactorias. Observaban estos autores que las cuajadas congeladas lentamente, presentaban como principales defectos una textura farinácea.

El punto de congelación de los quesos varía con el tipo y la edad, así como con la humedad y el contenido en sal de los quesos. Richards E. (1.967), congela quesos Cheddar y Leicester con una humedad de 10-15% y los conserva a  $-17, 8^{\circ}\text{C}-20, 6^{\circ}\text{C}$ , observan

do que existen menores daños físicos, cuando el queso posee menor porcentaje de humedad. Los quesos grandes también podrían dañarse organolépticamente, mientras que los pequeños se conservaban sin grandes alteraciones, debido quizás a que el procedimiento de congelación rápida se realiza mucho mejor en estos últimos.

Auquéz Michel M. (1.974) congela rápidamente queso de cabra en túnel a  $-35^{\circ}\text{C}$ - $40^{\circ}\text{C}$ , almacenando posteriormente en cámaras a una temperatura de aproximadamente  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante cuatro o cinco meses.

b) Retraso en las reacciones químicas.

Las reacciones químicas en el sustrato congelado, son retardadas, pero no inhibidas. El factor limitante del almacenamiento de muchos quesos a baja temperatura, es el proceso de maduración, el cual es retrasado pero no detenido.

En los quesos conservados en congelación, la intensidad de las transformaciones bioquímicas disminuye con el descenso de la temperatura y crece con el grado de maduración de la muestra en el momento de la congelación.

Hôte-Baudart E. (1.969), utiliza tres temperaturas para la congelación de cuajadas de tipo Camembert:  $-15^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ . A  $-15^{\circ}\text{C}$  y a  $-20^{\circ}\text{C}$ , observa la existencia de una actividad enzimática notable, que es fuertemente disminuida en la conservación a  $-30^{\circ}\text{C}$ ., aunque no totalmente suprimida. Portmann A. (1970), congela quesos de leche de cabra y los conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante un año, observando sin embargo que éstos últimos no presentaban mejor calidad que los primeros, con lo que el autor establece que las temperaturas de conservación de las cuajadas es-

tarían aproximadamente entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Al ser las temperaturas aplicadas lo suficientemente bajas, como para considerar que gran parte de la actividad microbiana está al menos detenida, las variaciones ocurridas podrían ser achacables al contenido enzimático que existe en el momento de la congelación. Dicho autor congela un tercio de la muestra al estado de cuajada de dos días, otro tercio bajo forma de quesos semimadurados con quince días y otro tercio seis semanas después de la maduración, comprobando que las cuajadas más pobres en enzimas prácticamente sin modificar, contrariamente a los quesos de quince días y tres semanas, donde el desarrollo de los gérmenes ya había liberado enzimas proteolíticos y lipolíticos que continúan actuando lentamente durante la conservación.

Todos estos resultados coinciden perfectamente con las experiencias de Coppens R. (1.968) quién también congela (rápidamente en túnel a  $-55^{\circ}\text{C}$ ), tres lotes de quesos Camembert con 0-15 y 21 días de maduración, a  $-15^{\circ}\text{C}$  (2-6 meses),  $-20^{\circ}\text{C}$  (2-8 meses) y a  $-30^{\circ}\text{C}$  (2 meses-1 año). Después de la descongelación, los dos grupos de 0 y 15 días se someten a maduración, durante tres semanas aproximadamente. Organolépticamente, todos los quesos que se almacenaron a  $-15^{\circ}\text{C}$  eran insatisfactorios. A esta temperatura la proteólisis no sigue su curso normal, y los quesos congelados antes de madurar fueron los más aceptables, pero los de 15 y 21 días mostraron una serie de defectos que aumentaban con el tiempo de almacenamiento y que fueron más marcados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para Auquez Michel M. (1.974), Portmann A. (1.969, 1.970) y Portmann A. y col. (1.966 a y b), trabajando en congelación de quesos procedentes de leche de cabra, la congelación habrá también

de realizarse al estado de cuajada sin madurar, ya que ésto proporciona características organolépticas más satisfactorias.

No todos los tipos de quesos sin embargo, son propicios a la congelación antes de madurar. Así Ottogalli G. y col. (1.974<sub>a</sub>) trabajando con queso Provolone, observan que la congelación da mejores resultados cuando se aplica a quesos madurados, pudiendo conservarse luego perfectamente, durante cuatro meses. A idénticas conclusiones llegan Ottogalli G. y col. (1.973) al congelar queso Gorgonzola en diferentes estadios de la maduración (5,13,23 y 64 días) durante 10-20 días y 3-4 meses y Didienne R. y col. (1.978), en la congelación de queso St. Nectaire.

En ocasiones, la conservación de quesos a bajas temperaturas durante bastante tiempo, puede producir defectos por oxidación con la aparición de sabores extraños que rebajan la calidad organoléptica.

Portmann A. y col. (1.967 y 1.966), congelan quesos fabricados con leche de cabra y los conservan a  $-18^{\circ}\text{C}$   $-20^{\circ}\text{C}$  durante varios meses, observando la aparición en algunos lotes de sabores extraños, que dichos autores clasifican como de dos tipos.

- Gustos a óxido, sebo o gustos metálicos, que pueden resultar de la autooxidación de los ácidos grasos. Parece ser además, que la adición de sal a la cuajada antes de la conservación, aumenta el gusto a óxido.

- Gustos insípidos y gustos dulces. Según estos autores, pueden proceder de la degradación enzimática de las proteínas y la materia grasa por los microorganismos psicrófilos de contaminación

Y por lo tanto podrían evitarse utilizando leche de buena calidad bacteriológica.

Auquez Michel M. (1.974) observa también en quesos de leche de cabra conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  cinco meses, defectos de oxidación de la materia grasa.

Por otra parte Harper W.J. y col. (1.958), demostraron en conservaciones a  $-23^{\circ}\text{C}$  durante seis meses de quesos de leche de cabra, que presentaban un "bouquet" y aroma inferior al de los quesos testigo no conservados. Posiblemente durante la acidificación de la cuajada, los fermentos lácticos producen compuestos carbonilos que participan en el aroma característico de cada queso, llegando dichos autores a la conclusión de que en algunos de los quesos conservados, pudiera existir pérdida de estas sustancias y por tanto del "bouquet" respecto de los testigos.

c) Prevención del crecimiento microbiano.

La actividad de muchos microorganismos presentes en el queso congelado, es prácticamente nula a temperaturas por debajo de  $-10^{\circ}\text{C}$ , siendo la congelación en principio, un método idóneo para preservar el crecimiento microbiano.

2.5. INFLUENCIA DE LA CONGELACION DE CUAJADAS SOBRE LA MICROFLORA QUE PARTICIPA EN LA MADURACION.

La utilización de las bajas temperaturas en la conservación de alimentos, se basa en el hecho de que las actividades microbianas se pueden retardar o incluso inhibir a temperaturas inmediatamente por encima de las de congelación y generalmente detener a temperaturas por debajo del punto de congelación.

Las temperaturas de refrigeración previenen en general, el crecimiento de los organismos productores de intoxicaciones (excepto C. botulinum) y retardan el crecimiento de todos los que producen deterioro.

Las temperaturas de congelación en general, son suficientes para prevenir el crecimiento de todos los microorganismos, aunque algunos pueden crecer a un ritmo más lento.

Al considerar los efectos de la congelación sobre los microorganismos, es interesante tener en cuenta los siguientes cambios:

1.- Al disminuir la temperatura, el agua libre de las células se congela formando cristales de hielo extracelulares (si la congelación es lenta), e intracelulares (si la congelación es rápida), aunque en algunos casos puedan formarse ambos tipos de cristales. Debido a esta pérdida de agua por congelación, las células se deshidratan.

En principio se pensaba que la formación de hielo extracelular, destruía las células por compresión ó perforación de las mismas, pero después se ha visto que su modo de actuación es más fi-

sico-químico que mecánico, ya que la migración del agua intracelular hacia el exterior, produce una concentración de solutos en el sistema. Debido a esto, crece la velocidad de reacción a temperaturas justo inferiores al punto de congelación, varía el pH que puede oscilar entre 0,3-2,0 y se producen cambios en el equilibrio iónico de la fase líquida que afectan a las macromoléculas celulares como el DNA y las proteínas. Éstas se pueden desnaturar, desapareciendo algunos grupos sulfhidrilo que se desprenden de las lipoproteínas. Existe también una pérdida de gases citoplasmáticos como O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. En las células aerobias la pérdida de O<sub>2</sub> frena las reacciones celulares.

2.- Todas estas alteraciones metabólicas destruyen la célula desde su propio interior, sumándose a esta destrucción la realizada mecánicamente por los cristales de hielo intracelular, que actúan directamente sobre los orgánulos celulares y sobre las membranas, siendo esta destrucción tanto mayor cuanto mayor es el tamaño celular.

3.- Por último, la repentina caída de la temperatura, produce en los microorganismos un efecto de "choque térmico" que es más patente para los termófilos y mesófilos que para los psicrófilos, cosa lógica dado que para los primeros su temperatura habitual de crecimiento, sufre una caída mucho mayor que para los segundos.

Para Mazur P. (1.966), la respuesta microbiana a las bajas temperaturas parece entonces determinada principalmente, por la concentración de solutos debido a la cristalización extracelular y la cristalización intracelular.

La congelación rápida es un proceso que se puede conseguir por inmersión directa ó contacto indirecto de los alimentos con el refrigerante.

La congelación lenta es un proceso en el que la temperatura deseada, puede tardar en alcanzarse hasta setenta y dos horas.

Borgstrom G. (1.961) expone las ventajas e inconvenientes de ambos métodos:

<u>Congelación rápida</u>	<u>Congelación lenta</u>
1. Formación de pequeños cristales intracelulares.	Formación de grandes cristales extracelulares.
2. Bloquear o suprimir el metabolismo celular.	Trastornar el metabolismo
3. Exposición breve a factores adversos.	Larga exposición.
4. Sin adaptación a las bajas temperaturas.	Adaptación gradual.
5. Choque térmico.	Sin efecto de choque.

El efecto nocivo de las bajas temperaturas sobre los microorganismos, no es sin embargo el mismo en todos ellos, sino que depende de una serie de factores:

- Naturaleza del microorganismo. Se admite en general, que las bacterias Gram negativas son mucho más sensibles a la congelación que las Gram positivas y su factor de resistencia se encuentra en la diferente composición de la pared celular.

Algunos cocos Gram positivos (micrococos, estafilococos y estreptococos) y casi todas las formas esporuladas resisten la congelación; Christophersen J. (1.968). La mayor parte de las bacterias no esporuladas son sensibles a la congelación y su actividad metabólica ó es anulada ó es retardada por las bajas temperaturas y finalmente la mayor parte de los bacilos Gram negativos son destruidos por la congelación (E. coli, E. aerógenes). Las Salmonellas son menos resistentes que S. aureus y que las formas vegetativas de Clostridium.

Por otra parte, el estado fisiológico en que se encuentran los microorganismos cuando se someten a la congelación, es un factor también de especial influencia. Una bacteria que se encuentra en la fase de crecimiento logarítmico, se destruirá mucho más fácilmente que en otra fase, así como las formas vegetativas son mucho menos resistentes que las esporas.

Según Bretz H. (1.961), también la concentración inicial de células en el alimento está relacionada con su supervivencia y ésta será mayor, a mayor cantidad de células antes de la congelación.

- Temperatura de congelación y temperatura de almacenamiento. No existe un acuerdo general entre las temperaturas de congelación y almacenamiento. Algunos autores piensan que una temperatura excesivamente baja, no es forzosamente más destructi-

va que temperaturas como  $-1^{\circ}\text{C}$ - $5^{\circ}\text{C}$ , que pueden tener un efecto más letal. En este caso, la congelación rápida tendría otro motivo más en el que apoyarse ventajosamente sobre la lenta, ya que se reduciría el tiempo de exposición a estas temperaturas mucho más nocivas. Cowmann R.A. y col. (1.965), congelan cultivos celulares de estreptococos lácticos sobre un medio de caseína, extracto de levadura y glucosa por dos procedimientos: una congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante treinta minutos y una congelación rápida por inmersión en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Los cultivos fueron posteriormente descongelados en baños controlados termostáticamente a  $+24^{\circ}\text{C}$ , durante siete minutos. Las medidas de supervivencia microbiana por contajes celulares totales en medios adicionados de agar, así como las medidas de su actividad proteolítica, mostraron que la congelación y el almacenamiento a  $-196^{\circ}\text{C}$ , son mucho más eficaces para conservar la viabilidad y capacidad proteolítica de las células, permaneciendo en valores muy elevados hasta el sesentaavo día del almacenamiento. Para otros autores sin embargo es al contrario, siendo tanto mayor el efecto destructor cuanto más baja es la temperatura.

Todos los autores sin embargo parecen estar de acuerdo en que la destrucción de gérmenes es tanto mayor, cuanto más largo es el tiempo de conservación a bajas temperaturas; Maleszewski J. (1.973); Palmer H. y col. (1.969).

- Sustancias protectoras. Existen algunas sustancias en los alimentos como los azúcares, grasa, etc..., que sirven de protección a los microorganismos retardando su destrucción.

- Descongelación y velocidad de ésta. Existen varias tendencias contradictorias en lo que se refiere a la velocidad de

de descongelación.

Para algunos autores, cuanto más rápida sea la descongelación mayor es el número de células supervivientes. Para Fennema O. (1.966), la descongelación lenta es capaz de producir muchos más perjuicios que la rápida, sin embargo no está muy claro que esto sea así. Para otros, la descongelación rápida sólo es aconsejable para aumentar la supervivencia de algunas esporas de hongos, pero es completamente desaconsejada para bacterias, y finalmente, algunos autores piensan que la velocidad de descongelación no tiene ningún efecto.

Además de los factores propios de los microorganismos, la supervivencia microbiana a bajas temperaturas depende de otros factores que afectan directamente a los alimentos, tales como la actividad de agua. Este agua disponible, lógicamente al realizarse la congelación, se va transformando en hielo y por tanto los gérmenes que sean capaces de crecer a bajas temperaturas, lo habrán de ser a bajos niveles de actividad de agua.

Normalmente es aconsejable no volver a congelar los alimentos una vez que hayan sido descongelados.

Durante la congelación existen una serie de modificaciones en la textura del alimento que facilitarían posteriormente la invasión microbiana hacia las partes más profundas del mismo. Durante la descongelación y particularmente, si ésta es lenta, se puede producir una multiplicación bacteriana que acelerará los procesos alterativos, especialmente si el alimento está muy modificado por el proceso de congelación. Lógicamente la repetición sucesiva de estos fenómenos, puede acabar destruyendo completamen

te la textura y la apariencia del alimento. La congelación además, determina la destrucción de muchos organismos termófilos y algunos mesófilos, que conduce al producirse la descongelación a una menor competencia entre los supervivientes. La alteración de los alimentos congelados y descongelados es siempre mucho mayor que la de los frescos y el tiempo de conservación posterior, lógicamente mucho menor, no ocurriendo esto en la congelación y descongelación de cuajadas de queso Manchego.

El problema de la supervivencia microbiana adquiere especial importancia cuando la congelación se realiza en las primeras etapas de la fabricación (salado, etc...) y no al final de la maduración. En estas primeras fases, los microorganismos no han hecho más que comenzar su acción bioquímica y las alteraciones irreversibles en su metabolismo pueden comprometer la buena marcha de la maduración, una vez que la cuajada descongelada inicia este período; Speck M.L. y col (1.977).

Se trata por tanto de conseguir que el proceso de congelación de cuajadas antes de madurar, interrumpa en la medida de lo posible los procesos metabólicos de los microorganismos beneficiosos y su crecimiento, destruyendo a aquellos desfavorables o patógenos, mucho más sensibles a la congelación.

Así, no existiendo lesiones metabólicas muy graves en los microorganismos maduradores de los quesos, los supervivientes podrán reanudar posteriormente sus actividades bioquímicas en el queso en maduración, una vez que éste ha sido descongelado.

Como ya se ha mencionado anteriormente, existen numerosos trabajos que estudian las variaciones bioquímicas en la maduración de los quesos fabricados con cuajadas congeladas a partir de

leche de oveja y cabra.

Sin embargo los estudios realizados sobre el efecto de la congelación en los microorganismos de leche y de las cuajadas sometidas a maduración posterior son muy escasos. Algunos como el realizado por Ottogalli G. y col. (1.974a) en quesos italianos Gorgonzola y Provolone, estudian el comportamiento frente a la congelación de los microorganismos más importantes tecnológicamente en la fabricación de estos quesos: S. thermophilus, P. roqueforti y los responsables del hinchamiento precoz (E. coli), cuando se inoculan en leche pasteurizada y en cuajadas fabricadas asépticamente, llegando a la conclusión de que las especies más sensibles son S. thermophilus y E. coli y la mortalidad mayor en la cuajada que en la leche. En cualquier caso los resultados son muy similares a los obtenidos por estos autores, cuando observan el comportamiento de estos gérmenes en cuajadas normales sometidas a congelación; Ottogalli G. y col. (1.973).

Otros autores, Yaygin H. (1.977), congelan leche de oveja cruda y pasteurizada para la fabricación de yogur en la época de baja producción de leche. Ésta se congela a dos temperaturas:  $-35^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante diez meses. Se observó que la temperatura de congelación no ejercía diferencias muy significativas en los contajes bacterianos después del almacenamiento y que en ambos casos éstos descendían, de  $5,81 \times 10^7/\text{ml}$ . en leche cruda a  $3,08 \times 10^7/\text{ml}$ . en leche congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  y de  $2,6 \times 10^4/\text{men}$  en leche pasteurizada a  $1,39 \times 10^4/\text{men}$  en leche pasteurizada congelada a  $-35^{\circ}\text{C}$ .

Didienne R. y col. (1.978), congelan queso St. Nectaire a  $-30^{\circ}\text{C}$  y efectúan contajes bacterianos (estreptococos lácticos,

Leuconostoc, lactobacilos, micrococos) y de levaduras, observando que todos ellos disminuían con la congelación, pero después de la descongelación y en la maduración posterior, la evolución era normal. Sin embargo el decrecimiento de algunos organismos indeseables como los coliformes, continuaba a lo largo de toda la maduración, como si su metabolismo se hubiera alterado por las bajas temperaturas de modo ya irreversible. A resultados parecidos se llega en congelación de queso tipo Manchego: Peláez M.C. (1.978), donde los coliformes desaparecen rápidamente, durante los primeros días, mientras que en los quesos testigos no congelados, la desaparición es más lenta y no se realiza totalmente hasta los cuarenta y cinco días.

Quesos Cheddar y Leicester almacenados a bajas temperaturas, muestran una disminución progresiva en el contenido bacteriano, aunque al cabo de diez meses de conservación, éste puede ser grande aún; Richards E. (1.967).

Mucho más numerosos sin embargo, son los trabajos realizados sobre congelación de bacterias lácticas con vistas a su utilización como fermentos en queserías: Keogh B.P. (1.970); Gilliland S.E. y col. (1.974); Accolas J.P. y col. (1.969); Birkkjaer H.E. y col. (1.976); Lablee J. y col. (1.978); Mietton B. y col. (1.978), etc..., y el estudio del comportamiento de dichas bacterias en cultivos puros, sometidos a congelación: Accolas J.P. y col. (1.970); Martins J.F.P. (1.976); Morichi T. (1.974); Asuntunyan R.S. y col. (1.974), etc...

El Sadek G.M. y col. (1.975), cultivan S. lactis y S. cremoris, aislados de diferentes queserías y los someten a congelación, seguida de refrigeración durante más de dieciseis semanas,

comprobando que S. lactis era más resistente a la congelación y conservaba mayor actividad acidificante que S. cremoris.

Jabarit A. (1.970,1.971), demuestra en cultivos mixtos de S. lactis-L. helveticus, por un lado y S. thermophilus-L. acidophilus por otro, que los lactobacilos son en general más sensibles a la congelación que los estreptococos, pero al llegar a temperaturas suficientemente bajas (-20°C), la resistencia fisiológica de los estreptococos disminuye y la desproporción de porcentajes se vuelve casi despreciable a -35°C-40°C.

Rousseaux P. y col. (1.968) en quesería Gruyère, utilizan suspensiones concentradas de S. thermophilus-L. helveticus, demostrando que esto producía una mayor acidificación inicial del queso, así como una mejora en la apertura y textura del mismo, al final de la maduración.

Mitic S. (1.976), al congelar suspensiones celulares de L. bulgaricus en medios con un 10% de sacarosa, observa que sólo sobreviven el 1%; sin embargo Imai M. y col. (1.975), conservando a temperaturas de congelación cepas de L. bulgaricus, L. acidophilus y L. casei durante siete a ochenta y cinco días en un medio con 10% de leche descremada, 5% de sacarosa, 0,9% de cloruro sódico y 1% de gelatina, comprueba que el porcentaje de células destruidas es muy escaso, así como la actividad láctica de las cepas. Para éstos autores, L. helveticus es mucho más sensible a la congelación, aunque capaz de reestablecerse pronto.

## 2.6. GERMENES PSICROFILOS.

Se definen como psicrófilos según la Norma F.I.L., aquellos organismos capaces de crecer y desarrollarse en diez días a  $7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  en Plate Count Agar (triptona, extracto de levadura, glucosa y agar). Para algunos autores, el término de "psicrófilos" se aplica más generalmente a aquellos organismos capaces de crecer entre  $0-7^{\circ}\text{C}$  y producir colonias visibles en siete días, pero teniendo una temperatura óptima de crecimiento alrededor de  $20^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo actualmente, está cada vez más extendido el término "psicrotrófico" para definir aquellos organismos que, independientemente de cual sea su temperatura óptima de crecimiento, son capaces de desarrollarse a temperaturas de refrigeración (aproximadamente  $5^{\circ}\text{C}$ ), ó inferiores.

La mayoría de los gérmenes psicrotróficos son bacilos Gram negativos, principalmente del grupo de las Pseudomonadáceas: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcalígenes*, *Achromobacter*. Menos frecuentemente existen algunas cepas dentro de los géneros: *Escherichia*, *Aerobacter*, *Proteus*, *Samonella*, *Clostridium*, *Shigella*... También pueden existir algunas cepas de *Micrococcus*, *Streptococcus*, y *Bacillus*.

Los gérmenes psicrotrófos tienen importancia en la industria láctea, debido a que constituyen la flora dominante en las leches refrigeradas crudas, almacenadas durante cierto tiempo. Dichos gérmenes psicrotrófos, producen enzimas lipolíticas y proteolíticas que provocan una maduración excesiva de la leche, aparición de sabores extraños y anomalías cuando es conservada largo tiempo. Si esta leche es utilizada posteriormente en quesería, dado que dichas enzimas son en muchos casos resistentes a la pasterización,

además de modificar la aptitud de la leche para la coagulación y hacer difícil el papel de los fermentos lácticos, provocan defectos organolépticos en los quesos, sabores a rancio (lipólisis) o amargos (proteólisis); Cousin, M.A. y col. (1.977 a y b). Debido a que son microorganismos en su mayoría telúricos o procedentes del medio ambiente, se confirma una vez más, la existencia de una relación estrecha entre la buena o mala calidad bacteriológica de la leche y la buena o mala calidad de los productos preparados a partir de ella.

El papel de los microorganismos psicrótrofos en la industria láctea, ha sido estudiado por varios investigadores: Thomas S.B. (1.966); Kunchat W. (1.970); Dumont J.P. y col (1977); Busse M. (1.969), así como las actividades lipolíticas: Nashif S.A. y col. (1.953 a y b); Law B.A. y col. (1.976) y proteolíticas: Peterson A.C. y col. (1.960); Kozlova L.A. (1.974), de dichos microorganismos.

Cousin M.A. y col. (1.977 b), fabricaron quesos Cheddar con leche pasteurizada inmediatamente antes de la fabricación del queso (I), almacenada una semana a 4,4°C antes de pasteurizar (II) e inoculada con *Pseudomonas* y *Flavobacterium* y almacenada una semana a 4,4°C antes de pasteurizar (III). Los contajes de psicrófilos en II y III aumentaron de  $5 \times 10^2$ /ml. a  $2,5 \times 10^8$ /ml. durante el almacenamiento, así como los valores de Nitrógeno no proteico en II y III respecto de los de I, lo que indica que hubo un aumento en la proteólisis de la leche. Dichos autores observaron también que mientras que la microflora original de la leche degrada preferentemente la  $\alpha$  caseína, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* atacan la  $\alpha$  y  $\beta$  caseína, mientras que las proteínas del suero, no fueron afectadas por dicha proteólisis. El tiempo de fabricación del

queso en el caso III, fue menor, con lo que se obtuvo una cuajada más firme, observandose en este caso, defectos de rancidez sólo al cabo de un almacenamiento de 6 meses a 4,4°C. Law B.A. y col. (1.979) en el queso Cheddar, no observan sin embargo variaciones en la producción y calidad del mismo, debido a la actividad proteolítica de las bacterias psicrófilas presentes en la leche de fabricación, que había sido almacenada durante 72 horas a 7,5°C.

Debenkelar, N.J. y col. (1.977), estudiando por cromatografía la degradación de las caseínas de la leche, observaron que la actividad proteolítica de las capas psicrófilas de *Pseudomonas*, *Alcalígenes*, *Micrococcus* y *Lactobacillus*, va decreciendo de mayor a menor, en ese orden. En este caso tampoco se vieron afectadas las proteínas del suero.

Desde hace bastante tiempo, se sabe que los microorganismos psicrófilos, son incapaces de crecer a temperaturas algo superiores a su óptimo de crecimiento y que temperaturas relativamente elevadas los destruyen o al menos disminuyen fuertemente su capacidad de producir enzimas. Weckbach L.S. (1.975) y Weckbach L.S. y col. (1.977), estudian el comportamiento de los microorganismos psicrófilos sometidos a la acción del calor. Leche cruda que contiene  $10^2$ ,  $10^4$  ó  $10^6$  *Pseudomonas*/ml., se calienta a 72-79°C, 15"; 88°C, 10" ó 95°C menos de 5" y luego se almacena a 7°C durante 14 días. Observaban, que cuando la leche contenía  $10^6$  microorganismos/ml., éstos disminuían a 10/ml. inmediatamente después del tratamiento por el calor, aumentando posteriormente cuando se almacenaba a 7°C a  $10^4$ /ml., después de 7 días y  $10^6$ /ml. después de 14 días. La mayor temperatura con el menor tiempo de exposición en ella, era el método más efectivo, para la destrucción de dichos microorganismos psicrófilos.

Los mecanismos del psicofilismo no se conocen por completo. Según algunos autores como Jay J.M. (1.973), es probable que la capacidad de crecer a bajas temperaturas esté bajo control genético y que las cepas o especies de psicrófilos que corresponden a géneros fundamentalmente mesófilos, hayan sufrido algún proceso de mutación o selección, determinado por las bajas temperaturas.

1060

3. MATERIALES Y METODOS.

### 3.1. MATERIAL OBJETO DE LA EXPERIENCIA.

Los quesos utilizados en la realización de este trabajo, fueron elaborados a partir de 1.400 litros de leche de oveja de raza manchega, obtenida por ordeño mecánico y enfríada hasta su procesamiento entre 5°C y 8°C. Su fabricación se llevó a cabo en una quesería de la región Central de Madrid.

A su llegada al laboratorio, se realizaron análisis de muestras homogéneas tomadas de esta leche, dando una acidez de 20ºD; grasa, 7%; extracto seco, 16,20%; rendimiento 20,9%. La leche había sido pasteurizada en la fábrica a una T de 72°C durante 20 mn.

Se fabricaron 80 quesos, con un peso total de 292,6 Kg, El tiempo de cuajada fue de 15 mn. a una T de 31°C, cortándose el grano, hasta el tamaño de una judía. Se utilizó cuajo "Marshall" 1/100.000 de los laboratorios Miles Martín. Los quesos fueron prensados posteriormente durante dos horas y colocados en salmuera (20,50%) a temperatura de 13°C durante cuarenta y ocho horas, al cabo de las cuales se llevaron al secadero cuatro días a una temperatura de 13°C y una humedad del 65%.

Con los ochenta quesos frescos, se hicieron los siguientes lotes:

Lote nº 1. Quesos testigo.

Se tomaron ocho quesos, que fueron madurados normalmente, en una sala con temperatura de 5°C  $\pm$  1°C y humedad relativa 84% efectuándose controles, el día de fabricación y a los 2, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 días.

Lote nº 2. Desde la fábrica donde se elaboraron los que--

Los quesos hasta el Instituto del Frío, éstos fueron transportados en un camión isoterma a temperatura del  $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , habiendo sido envasados individualmente en sacos de polietileno y embalados en cajas de cartón rizado.

Una vez en el Instituto, se procedió a la congelación de todos ellos en túnel a  $-40^{\circ}\text{C}$ , realizándose la toma de temperatura en la parte más interna de los quesos con termopares de cobre Constatan, conectados a un registrador Honeywell mod. Brown.

Posteriormente los quesos fueron trasladados a una cámara de conservación con temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  y humedad 97%, donde se hicieron nueve lotes de seis quesos cada uno, manteniéndose en dicha cámara durante 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 y 360 días respectivamente.

Después de los diferentes períodos de conservación, los lotes de quesos fueron transportados al estado congelado hasta la fábrica, donde se procedió a su descongelación gradual por un período de 48 horas, en cámaras de maduración con temperatura de  $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y H.R. de 84%.

Cada uno de los lotes fue posteriormente madurado en dichas cámaras, tomándose muestras para su análisis a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 días de maduración.

### 3.2. CARACTERISTICAS TECNICAS DE LAS INSTALACIONES FRIGORIFICAS

#### 3.2.1. Túnel de congelación.

La congelación se efectuó rápidamente, en un túnel de 4 m. x 1,5 m. y 2,5 m. de altura con un volumen de 15 m<sup>3</sup>. y capacidad de 500 Kg. Dicha cámara de congelación está aislada con poliestireno extruído, con un espesor en la pared de entrada de 11 pulgadas en 3 capas: 4 + 4 + 3; en la pared frontal de 10 pulgadas en 2 capas: 5 + 5 y 14 pulgadas en tres capas de 5 + 5 + 4. En el suelo, el aislamiento tiene un espesor de 12 pulgadas en tres capas de 4 + 4 + 4 y en el techo de 13 pulgadas: 5 + 4 + 4. Está preparado para alcanzar temperaturas entre -30°C y -50°C. La velocidad del aire es variable entre 3 m/seg. y 15 m/seg.

La instalación frigorífica es de expansión directa con R-22 como fluido frigorígeno. El compresor es de doble salto con 6 cilindros (4 en baja y 2 en alta). La potencia frigorífica es de 9.300 Kcal/h., evaporando a -60°C y condensando a +35°C. El condensador enfriado por agua tiene 6,8 m<sup>2</sup>. de superficie, mientras que la superficie del evaporador es de 92,6 m<sup>2</sup>.

#### 3.2.2. Cámara de conservación.

La cámara donde se conservaron los quesos, tiene unas dimensiones de 4 m. x 2 m. y 3 m. de altura con un volumen de 24 m<sup>3</sup>. y capacidad variable. Está aislada con poliuretano, de espesor en la pared de entrada: 7 pulgadas en 2 capas de 4 + 3; en la pared frontal: 9 pulgadas en 2 capas de 5 + 4 y en las paredes laterales: 7 pulgadas en 2 capas de 4 + 3 y 5 pulgadas en 2 capas de 3 + 2. En el suelo el espesor del aislamiento es de 8 pulgadas en 2 capas de 4 + 4 y en el techo de 9 pulgadas en 2 capas de 4 + 5. Las temperaturas que se pueden alcanzar son de

-20°C a -30°C y la H.R. es de 95-100%. La circulación del aire es natural o forzada con un coeficiente de recirculación variable entre 10 y 30.

La transmisión es indirecta por medio de etilenglicol que actúa de fluido frigorígeno, el cual a su vez es enfriado por Freón 22. Dicha cámara da servicio a otras 3 cámaras de conservación, siendo por tanto el compresor de doble salto, de 4 cilindros con 3 en baja y 1 en alta. La potencia frigorífica es de 9.240 Kcal/h., evaporando a -47°C y condensando a +35. La superficie del condensador es de 9 m<sup>2</sup>., la de los serpentines es de 21,4 m<sup>2</sup>. y el ventilador para la circulación forzada del aire tiene 30,5 m<sup>2</sup>.

### 3.3. TOMA DE MUESTRAS.

Los quesos eran trasladados desde la cámara de maduración hasta el laboratorio en un contenedor isoterma y allí se procedía a la toma de muestras según la Norma FIL IDF 50 1.969. Con ayuda de un cuchillo de acero inoxidable de punta fina y previamente flameado, se tomaba de la parte central de cada queso un trozo del mismo, de peso aproximado 50 g. que se introducía en el interior de una placa de Petri estéril. A partir de esta muestra se procedería a realizar todos los análisis bacteriológicos. Asimismo de cada queso se separaba una parte destinada a la realización de las pruebas bioquímicas y otra parte destinada a la determinación de la dureza por medio de la célula de Kramer.

### 3.4. TECNICAS DE CONTROL DE CALIDAD.

Las pruebas de control tanto bacteriológico como fisicoquímico, se realizaron en todos los lotes de quesos fabricados a partir de una única cuba de leche inicial, así como en la cuajada recién salida de la prensa y después de cuarenta y ocho horas de saladero.

#### 3.4.1. Control bacteriológico.

Todos los análisis bacteriológicos, se realizaron bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar modelo TELSTAR tipo A11-10.

De cada una de las muestras, de peso aproximado 50 g., tomadas en las condiciones anteriormente descritas, se recogían asépticamente alrededor de 20 g. y se homogeneizaban con 180 ml. de solución Ringer estéril diluida al cuarto, en un vaso de batidora Omni-Mixer (mod. Sorvall) durante 3 mn. a velocidad 5 del aparato. De esta mezcla inicial, que representa la dilución al 10% , se tomaba con pipeta estéril 1 ml., el cual era llevado a un tubo de ensayo con 9 ml. de solución Ringer estéril, mezclándose bien con ayuda de un agitator de la marca "Cenco". La nueva dilución así formada es al 1%. La pipeta se lavaba posteriormente, pasándola 2 veces por alcohol y 3 veces por agua destilada hervida. Con ella se tomaba 1 ml. de la dilución al 1% para llevarlo a otro tubo con 9 ml. de solución Ringer y formar así la dilución al 0,1%. De nuevo se realizaban las operaciones de lavado, y así sucesivamente se iban creando las diluciones al 0,01%, 0,001%, etc.

Una vez formadas todas las diluciones, se tomaba de cada una de ellas con pipeta estéril y siempre de la más diluída a la más concentrada, 1 ml. para depositarlo en una placa de Petri, cuya tapase entreabría ligeramente cerca de la llama. Esta operación se realizaba por duplicado para obtener dos placas sembradas por dilución, utilizándose la misma pipeta para todos los tubos.

Posteriormente se vertían en cada placa, aproximadamente 15 ml. de cada uno de los medios selectivos de agar enfríados entre 40°C y 50°C. Estos medios de cultivo en placa para la enumeración de gérmenes viables serán detallados más adelante, así como la técnica utilizada para la detección en tubos de gérmenes coliformes.

#### 3.4.1.1. Enumeración de gérmenes viables.

El medio de cultivo utilizado es el descrito por la Norma FIL-IDF 1.958 para el recuento de gérmenes en leche líquida y leche en polvo. Se escogió este método, porque ha sido el que ha dado mejores resultados, debido al tamaño de las colonias y la transparencia del medio. Consta de 5 g. de triptona; 2,5 g. de extracto de levadura; 1 g. de dextrosa; 10 ml. de leche descremada y 1.000 ml. de agua destilada: Dicho medio se repartía en botellas y se esterilizaba a 121°C durante 15 mn., guardándose hasta el momento de su utilización a temperatura ambiente.

El tiempo de incubación para las placas con este medio fue de 72 horas a una temperatura de 30°C. Todas las placas fueron incubadas en estufa Memmert mod. Edesthal Rost frei. No se consideraban más que las placas, cuyo número de colonias estaba comprendido entre 30 y 300.

#### 3.4.1.2. Enumeración de gérmenes con función lipolítica.

De todos los medios de agar estudiados para la detección de microorganismos lipolíticos, el que dió mejores resultados fue el Agar Tributirina propuesto por Anderson (1.934). La adición de glicerín-tributirina al medio, en concentración de 1% facilita la localización de colonias lipolíticas, por la aparición de un halo claro, que corresponde a la hidrólisis de la tributirina por dichos microorganismos.

El medio de cultivo, compuesto de 5 g. de peptona; 3 g. de extracto de levadura; 12 g. de agar y 1.000 ml. de agua destilada, se repartía en tubos a razón de 15 ml. en cada uno, antes de proceder a la esterilización a 121°C durante 15 mn. Después se añadía en cada tubo con pipeta estéril, la glicerín-tributirina en la concentración arriba señalada, mezclándose fuertemente en agitatos hasta que la solución quedaba turbia. El medio enfriado a 45°C, se vertía en las placas previamente inoculadas con 1 ml. de la dilución correspondiente.

Después de una incubación de 72 horas a 30°C se hacía el recuento de gérmenes lipolíticos, considerándose solamente las placas en que el número de colonias estaba comprendido entre 30 y 300.

#### 3.4.1.3. Enumeración de lactobacilos.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento selectivo de lactobacilos fue el Agar según Rogosa M. y col. (1.951). Dicho agar, consta de 10 g. de peptona de caseína; 5 g. de extracto de levadura; 20,0 g. de D-glucosa; 6 g. de dihidrogenofosfato potásico; 20 g. de citrato amónico; 1 g. de monooleato de polioxietilensorbiteno; 15 g. de acetato sódico; 0,575 g. de sulfato mag

nésico, 15 g. de Agar y 1.000 ml. de agua destilada. Este medio de cultivo se consideró el apropiado, debido a que contiene todos los nutrientes específicos requeridos para el óptimo crecimiento de los lactobacilos, como son, alta concentración en acetato, manganeso y hierro, así como un bajo valor de pH que suprime notablemente el crecimiento de la flora acompañante. Por otro lado, la forma de realizar las siembras dejando el inóculo entre dos capas de medio, proporciona un ambiente pobre en oxígeno que facilita el crecimiento de los lactobacilos, gérmenes anaerobios facultativos y dificulta el de los gérmenes aerobios que pudieran desarrollarse. Este medio no se esterilizaba, siendo únicamente hervido durante 2 ó 3 mn. en agitación continua.

Una vez sembrado el inóculo sobre una capa de unos 10 ml. de medio en cultivo enfriado y solidificado, se vertía otra cantidad aproximadamente igual encima con el fin de crear una cierta atmósfera de anaerobiosis para los gérmenes. Después del enfriamiento de las placas, éstas eran invertidas para su incubación que se realizaba durante 4 días a 30°C. Solamente se tenían en cuenta las placas cuyo número de colonias se comprendía entre 30 y 300.

#### 3.4.1.4. Enumeración de gérmenes con función proteolítica.

Para hacer el recuento de gérmenes proteolíticos se utilizó el medio SMCA (Standard Methods Caseinate Agar) propuesto por Martley F.G. y col. (1.970). Dicho medio posee una ventaja respecto de los métodos tradicionales standard (SMA: Standard Methods Agar) adicionados de un 10% de leche descremada estéril; en estos últimos donde también se puede hacer recuento de los gérmenes totales, el reconocimiento de las bacterias proteolíticas se realiza por adición después de la incubación de las placas, de

una protefna precipitante (cloruro mercúrico ácido) que produce una zona de aclaramiento alrededor solamente de las colonias proteolíticas. Cuando se utiliza el medio SMCA, es decir, SMA + casein. sódico, la incubación de las placas durante 48 h. a 30°C, proporcionaba halos de precipitación únicamente alrededor de las colonias proteolíticas y éstas serán por tanto fácilmente reconocibles. La composición del medio es la siguiente: SMA (digerido pancreático de caseína: 5,0 g.; extracto de levadura: 2,5 g.; glucosa: 1,0 g.; agar: 15,0 g.), caseinato sódico 10,0 g.; citrato trisódico hidratado 4,41 g.; 1.000 ml. de agua destilada. Una vez que el medio era esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 mn., se le añadían 20 ml. de una solución estéril 1 M de cloruro cálcico hexahidratado, agitándose fuertemente. El medio de cultivo así preparado se vertía en placas de Petri estériles que una vez solidificadas se incubaban en posición invertida, durante 48 h. a 30°C. Después de esta incubación las placas eran sembradas con 1 ml. del inóculo que se extendía sobre la superficie del agar con ayuda de un asa de siembra estéril. Las placas volvían a ser incubadas y pasadas otras 48 h. a 30°C, se contaban como colonias proteolíticas aquellas alrededor de las cuales, aparecía una zona de aclaramiento o un halo de proteolisis.

#### 3.4.1.5. Enumeración de gérmenes coliformes.

Para el recuento de gérmenes coliformes, se siguió la técnica descrita por la Norma FIL IDF 73 J.974. Dicha Norma recomienda la utilización del caldo lactoso, con bilis al 2% y verde brillante, debido a que la posesión de sales biliares inhibe el crecimiento de los microorganismos Gram positivos, creando así un medio adecuado para el desarrollo de los gérmenes Escherichia y Aerobacter. Dicho medio era repartido en tubos provistos de cam-

pana Durham a razón de 10 ml. por tubo, esterilizándose posteriormente en autoclave, durante 15 mn a 121°C.

La muestra era preparada de modo distinto a como se hacía para los demás recuentos bacteriológicos. Se tomaban aproximadamente 5 g. de queso en condiciones estériles y se llevaban a 45 ml. de una solución estéril de citrato sódico al 5%, homogeneizándose durante 3 mn. a velocidad 5 del aparato. De esta dilución al 10%, se tomaban 10 ml. con pipeta, llevándose a un frasco con 90 ml. de solución Ringer. Se preparaba así la dilución al 1%. De aquí se pasaban de nuevo 10 ml. a otro frasco con 90 ml. de solución Ringer, obteniéndose así la dilución 0,1% y así sucesivamente. En cada fase se utilizaba una nueva pipeta estéril. A continuación se tomaba de la dilución mayor a la menor, 1 ml. de cada tubo, llevándose a tubos conteniendo 10 ml. de caldo de cultivo estéril. Se sembraban 3 tubos por dilución para obtener por triplicado 0,1 g. de muestra; 0,01 g.; 0,001 g. y así sucesivamente. Después de una incubación de 48 h. a 30°C se tomaba muestra con asa de siembra estéril, de los tubos que mostraban crecimiento independientemente de la producción o no de gas, para llevarla a nuevos tubos con 10 ml. de medio. Esta resiembra se mantenía nuevamente en estufa, durante 48 h. a 30°C, considerándose positivo únicamente, los tubos con aparición de gas. El cálculo del número de coliformes por gramo de muestra se hacía mediante las tablas del número más probable (NMP).

#### 3.4.2. Control bioquímico.

##### 3.4.2.1. Determinación del pH.

Se tomaban 10 g. de queso homogeneizándose con 100ml.

de H<sub>2</sub>O destilada. La mezcla se calentaba y después de filtrar se recogían 50 ml. midiéndose el pH en un pH- metro Radiometer 22 con 2 electrodos, uno de vidrio y otro de calomelanos.

3.4.2.2. Determinación de acidez.

Se siguió el método de la AOAC (1.960) modificado.

Del filtrado preparado para la determinación del pH se tomaban 50 ml., a los que se añadía fenolftaleína al 2% como indicador. La valoración se hacía con hidróxido sódico 0,1 N y la acidez se expresaba en ácido láctico, teniendo en cuenta que 1 ml de hidróxido sódico 0,1 N corresponde a 0,009 g. de ácido láctico.

3.4.2.3. Determinación de la humedad.

Se siguió la Norma FIL IDF 4 1.958.

Se pesaban 20 g. de arena en cápsula de níquel o aluminio, secándose la cápsula con arena y el agitador en estufa a 105°C hasta peso constante. A continuación se enfriaba en desecador y se pesaba. Se colocaban rápidamente 3 g. de la muestra, anotándose el peso exacto y triturando cuidadosamente la masa del queso en la arena con ayuda del agitador. A continuación se introducía en estufa a 105°C haciéndose pesadas intermedias hasta conseguir un peso constante.

3.4.2.4. Determinación de lactosa.

Se siguió la Norma FIL-IDF-43 L.967.

Se tomaban 10 g. de queso, homogeneizándose en 400 ml. de agua destilada caliente (60 - 70°C) durante 2 mn pasando el

contenido a un matraz aforado de 500 ml.

Se añadían 5 ml. de una solución de sulfato de cinc heptahidrato al 30%, mezclando suavemente y añadiendo a continuación 5 ml. de una solución de ferrocianuro potásico trihidratado cristalizado al 15%.

Después de enfriado el contenido del matraz se completaba hasta el aforo y una vez cerrado se mezclaba.

A continuación se filtraba y se tomaban con una pipeta, 25 ml. de una solución de sulfato de cobre pentahidrato al 7% y 25 ml. de una solución de tartrato alcalino preparada como se especifica más adelante, llevándolo todo a un vaso de precipitado de 400 ml. La muestra se calentaba hasta ebullición, añadiendo a continuación 100 ml. del filtrado de la muestra. El calentamiento se detenía 6 mn. después de recomenzada la ebullición.

Todo el contenido del vaso, se trasvasaba con ayuda de chorros de agua caliente a un crisol filtrante preparado como se detalla más adelante, realizándose una aspiración media. El filtrado es de color azul.

Una vez enjuagado el crisol, se secaba a  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 30 mn. y se pesaba.

Para el ensayo en blanco se sustituirán 10 g. de queso por 10 ml. de agua destilada.

Solución de tartrato alcalino: Disolver 350 g. de tartrato de sodio- potasio tetrahidrato y 100 g. de Hidróxido sódico en agua destilada completando hasta 1.000 ml. Después de un reposo de dos días en frasco tapado se filtra.

Preparación del crisol filtrante: Se lavaba el crisol con ácido nítrico diluido al 15-20% en peso, enjuagándolo después con agua caliente y 10 ml. de alcohol etílico al 96%. Se secaba el crisol a  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 30 mn. y después de enfriado se pesaba.

Para el cálculo de resultados se corregía, masa de óxido cuproso encontrado en el análisis de la muestra, restándole el resultado del ensayo en blanco. Se buscaba mediante las tablas dadas en la Norma FIL-IDF-43 1.967, la cantidad de lactosa anhidrida o hidratada correspondiente a la masa corregida de óxido cuproso y se encontraba el contenido en lactosa anhidrida o hidratada en % de la muestra mediante la fórmula:

$$\frac{50.000 \times A}{V \times B} \times 0,99$$

donde:

A = masa de lactosa encontrada en la tabla, expresada en gramos.

B = masa en gramos de la muestra de ensayo.

V = volumen del filtrado utilizado expresado en ml.

0,99 = factor de corrección para compensar el error de volumen que resulta de la presencia de materia grasa y proteína de la muestra.

3.4.2.5. Determinación de nitrógeno total.

Se siguió la técnica de Ferrer Falcón L. (1.957).

Se pesaban aproximadamente 2 g. de queso sobre papel de filtro y se introducían en matraz Kjeldahl. Se añadían 20 ml de ácido sulfúrico, 5 g. de sulfato potásico y 1 g. de sulfato de cobre deshidratado en estufa, como catalizadores. Después de agitar para evitar la carbonización, se disponía a fuego lento 5 mn. y luego a fuego vivo hasta el viraje a color verde. Se dejaba enfriar y se pasaba a destilar.

3.4.2.6. Determinación de nitrógeno soluble en cloruro sódico al 5%.

Se siguió la técnica de Dyer W.J. y col. (1.950)

Se pesaban aproximadamente 3 g. de queso, depositándose en un vaso de batidora enfriado entre 0°C y 2°C. A continuación, se añadía conservando la relación 1/10 - 1/20 una cantidad correspondiente (aproximadamente 60 ml.) de solución salina, previamente enfriada y se homogeneizaba 1½ mn. a velocidad 5 del aparato.

Se repartía todo el homogeneizado, en 2 tubos que se centrifugaban 30 mn. a 3.000 r.p.m. Del sobrenadante, que se recuperaba en matraz enfriado, se tomaban 30 ml. con pipeta, anotando el peso exacto, pasándose a un matraz Kjeldahl para comenzar dicho método.

3.4.2.7. Determinación de caseínas por medio de electroforesis en acetato de celulosa.

3.4.2.7.1. Equipo instrumental.

Para realizar la electroforesis, se utiliza una Cubeta Microzona Beckman Mod. R-100 con dos cámaras para el Buffer, separadas o aisladas una de otra durante el proceso electroforético, pero comunicadas al quitar el puente automáticamente, por un sifón regulador de nivel, el cual asegura contra un posible corto circuito. La corriente entra por dos bornes que atraviesan el cuerpo de la cubeta hasta un par de electrodos de platino

La capacidad total de las dos cámaras es de 265 ml. a 285 ml. de la solución Buffer.

La aplicación de las muestras se realizaba con un aplicador de muestras Microzona de Beckman, el cual recoge por acción capilar entre las finas laminillas paralelas del vástago 0,25 ml. de la muestra.

Las membranas de acetato de celulosa utilizadas eran de la marca Sartorius Membranfilter.

La fuente de alimentación utilizada fue Beckman Duostat, Mod. RD-2 con un voltaje de 110 V y una intensidad de corriente de 4 mA.

Las bandas fueron medidas por densitometría con un aparato Chromoscan MK-II (Joyce, Lobl and Co. Ltd, Gateshead).

#### 3.4.2.7.2. Método.

Para la preparación de la muestra se siguió el método de Pierre y col. (1.970), aunque la cantidad de muestra fue adaptada al caso particular de este queso, según Ramos M. y col. (1.976). Se raspaban 3,6 g. del interior de la muestra, homogeneizándose con 30 ml. de agua destilada en un Omni-Mixer durante 2 mn. a velocidad 5. Después de eliminar la grasa sobrenadante, el pH se llevaba a 4,6, centrifugándose a continuación a 3.000 r.p.m. durante 5 mn. El residuo era dispersado en 5 ml. de urea 7 M. El pH se llevaba a 7 y después de añadir 20 ml. de tetracloruro de carbono para extraer todos los restos de grasa, se agitaba en centrífuga a 3.000 r.p.m. durante 5 mn. Las caseínas así dispersas en la urea, estaban ya dispuestas para su aplicación en la membrana.

La composición del buffer de la cubeta es 1,84 g. de ácido dietilbarbitúrico; 10,30 g. de dietilbarbiturato sódico; 1.000 ml. de agua destilada. La fuerza iónica es de 0,05.

La tira de acetato de celulosa, sobre la que se iba a realizar la aplicación posteriormente, había de estar sumergida en el buffer más urea 5 M, un mínimo de media hora, antes de meterla en la cubeta. Pasado este tiempo se introducía entre dos secantes para quitar el exceso de buffer y se colocaba la muestra con el aplicador. La fuente de alimentación era conectada a la cubeta y ajustado el voltaje y la intensidad de corriente, manteniéndose durante dos horas y media.

Para la tinción y fijación de las tiras, se utilizaba negro amido 10 B, sumergiéndolas en el colorante de 7 a 10 mn. Después se hacían 3 lavados sucesivos de 10 mn con ácido acético

al 5% y se agitaba la membrana en una solución deshidratadora de alcohol etílico (99,5%) durante 1 mn. Se colocaba la membrana sobre la placa de vidrio y se pasaba el limpiador, introduciéndose de 3 a 5 mn. en la solución transparentadora de ciclohexanona y etanol en un porcentaje 22/78 respectivamente. Después de dejarla escurrir, se secaba a 80°C, colocándola posteriormente en agua tibia unos minutos para despegarla de la placa de vidrio y una vez seca se introducía en una funda de plástico para su conservación y posterior densitometría.

Las  $\alpha_s$  y  $\beta$  caseínas de oveja, utilizadas como patrones para la identificación de las bandas y sometidas a las mismas condiciones de electroforesis que las muestras a analizar, fueron cedidas amablemente por la doctora Mercedes Ramos quien consiguió aislarlas por electroforesis en Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico, en un trabajo presentado como comunicación al 75 Aniversario de la Real Sociedad Española de Física y Química (1.978).

#### 3.4.2.8. Extracción de la grasa.

Se pesaban aproximadamente 30 g. del producto, en un cartucho, taponado con algodón hidrófilo, mezclándolos con éter etílico-éter de petróleo al 50%. El cartucho se introducía en el cuerpo intermedio del Soxhlet, manteniéndolo una media de 6 horas, sin que la temperatura del baño pudiera superar nunca los 50°C. Una vez arrastrada toda la grasa, se recuperaba el éter en un rotavapor.

#### 3.4.2.9. Determinación de ácidos grasos libres.

Se empleó el método de Mehlenbacher V y col. (1.955).

Se tomaban aproximadamente 7 gramos de grasa, a los que se añadían 75 ml. de alcohol etílico y unas gotas de fenolftaleína, valorando la mezcla con hidróxido sódico 0,25 N.

Los resultados que se dan en porcentaje de ácido oleico, son obtenidos mediante la fórmula.

$$\frac{\text{ml de álcali} \times N \times 28,2}{\text{Peso grasa}}$$

#### 3.4.2.10. Determinación de la actividad de agua.

La forma más corriente de expresar la disponibilidad de agua para el crecimiento microbiano y el desarrollo bioquímico es la denominada "actividad de agua" ( $a_w$ ), que es una medida de la presión parcial que ejerce el agua en el alimento, e indica su grado de retención.

La actividad de agua se define como:

$$a_w = \frac{\% \text{ H.R.E.}}{100} = \frac{P}{P_o}$$

donde:  $a_w$  = actividad de agua

% H.R.E. = humedad relativa en el equilibrio

P = presión de vapor que ejerce el agua en el alimento a la temperatura de equilibrio del sistema.

$P_o$  = presión de vapor del agua pura a esa temperatura de equilibrio.

Para la determinación de la actividad de agua se ati-

lizó el método de Kvaale O. y col. (1.963).

Se preparaba una serie de soluciones saturadas de diversas sales, disolviéndolas en agua destilada a 40°C. Dichas soluciones eran las siguientes:

Sulfato de zinc heptahidrato ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	90,5%
Citrato sódico pentahidrato ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$ )	91,5%
Cloruro bórico dihidrato ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	92,5%
Tartrato sódico dihidrato ( $Na_2C_4H_4O_6 \cdot 2H_2O$ )	94,5%
Nitrato potásico ( $KNO_3$ )	95,0%
Bromato sódico ( $NaBrO_3$ )	95,5%
Sulfato sódico decahidrato ( $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ )	97,5%
Nitrato de plomo ( $Pb(NO_3)_2$ )	98,5%
Fósforo disódico dodecahidrato ( $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ )	99,0%

Los valores a la derecha de las soluciones, representan las humedades relativas de equilibrio (H.R.E.) de los papeles test (test papers).

Se cortaban a continuación tiras de papel de filtro que se impregnaban en dichas soluciones, dejándolas luego secar a temperatura constante de 20°C, en el interior de placas de Petri que se mantenían en un desecador.

10 g. de muestra se colocaban en frascos con tapón de corcho introduciéndose en cada uno, las tiras de papel impregnadas de las sales y cerrándose herméticamente. La operación se realizaba por duplicado. Pasadas 24 h. a temperatura de 20°C, se observaba la humedad de las tiras, estableciéndose el valor de H.R.E. en aquella solución, por encima de la cual todas las

tiras estaban ya secas.

Dicho procedimiento que los autores han comparado con el método de interpolación gráfica, ofrece resultados bastante reproducibles para valores de H.R.E. por encima de 90,5%, aun dentro de los márgenes de error que se aceptan en todos estos métodos cuando se trabaja con valores muy altos de aw. Por otro lado, la simplicidad del método y el hecho de que no presuponga una destrucción de las muestras, supone una serie de ventajas que favorecen su elección.

#### 3.4.2.11. Detección de elementos metálicos por espectrofotometría de absorción atómica.

La determinación de elementos metálicos se realizó tanto en la leche de partida como en el suero, según Juárez M. y col. (1.979), así como en la cuajada prensada, salada, con 15 y 30 días de maduración directa, con el fin de obtener una idea del contenido en elementos mayoritarios (Na, K, Ca y Mg) y algunos de los oligoelementos (Fe, Cu, Zn y Mn) en dichos productos.

El contenido en muchos de estos elementos puede aumentar durante el proceso de fabricación y conservación de productos lácteos, por una simple contaminación con el material utilizado, lo que podría causar alteraciones en la calidad de conservación.

##### 3.4.2.11.1. Equipo instrumental.

Se usó un espectrofotómetro de absorción atómica Beckman, modelo 1248, provisto de compensador de deuterio, integrador y memoria con lectura analógica, mechero Autolam Bumer II y un registrador potenciométrico Honston de 100 ml. Los paráme---

tros de operación en el espectrofotómetro se expresan en la Tabla nº I

#### 3.4.2.11.2 Preparación de las muestras.

Para la realización de la técnica, se partió de una serie de disoluciones comerciales Merck (tritisol), conteniendo  $1.000\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los elementos a analizar, a partir de las cuales se prepararon por dilución, dos grupos de disoluciones patrón para la realización de las curvas de calibrado. La composición de las disoluciones patrón queda reflejada en las Tablas nº II y III

Cada disolución patrón contenía, además 1,2% de ácido hidroacético y 500 ppm de tricloruro de lantano, y se prepararon en  $\text{NO}_3\text{H } 1\text{N}$ .

#### 3.4.2.11.3. Método.

Para el análisis del Na, K, Ca y Mg en leche, se siguió el procedimiento de Brooks I.B. y col. (1.970), en el cual las proteínas de la muestra (5 ml) se separan por adición de ácido tricloroacético al 24% (50 ml.) y agua desionizada hasta un volumen de 100 ml, determinándose los metales en el suero ácido obtenido, fue de 1/10 en el caso del Ca y Mg y 1/20 en el caso del K y Na. Para analizar el Ca se añadieron  $500\mu\text{g/ml}$  de una disolución de tricloruro de lantano al 5% preparada a partir de óxido de lantano (5,56 g.), 5 ml. de agua, 25 ml. de HCl concentrado y agua hasta un volumen de 100 ml. El lantano tiene como finalidad la de acomplejar los iones interferentes.

Para el análisis de Fe, Cu, Zn y Mn se siguió la técnica de Murthy G.K. y col. (1.968), aunque omitiendo la adición

Características de  
la llama (Kg/cm<sup>2</sup>)

Características de la lám-  
para de cátodo hueco

<u>ELEMENTO</u>	<u>LONGITUD DE ONDA</u>	<u>AIRE</u>	<u>ACETILENO</u>	<u>REFERENCIA</u>	<u>INTENSIDAD</u> max. (mA)
Na	589,0	1,60	0,30	Beckman 910137	15
K	766,5	1,80	0,60	" 910297	30
Ca	422,7	1,60	0,75	" 909592	10
Mg	285,2	1,70	0,40	" 911344	20
Fe	248,3	1,70	0,50	" 909587	15
Cu	324,7	1,70	0,40	" 909590	5
Zn	213,9	1,90	0,40	" 911892	8
Mn	279,5	1,70	0,40	" 8197	25

TABLA I.

TABLA II

COMPOSICION DE LAS DISOLUCIONES PATRON PARA EL ANALISIS DE LOS  
ELEMENTOS Fe, Cu, Zn, y Mn.

<u>Solución</u>	<u>CONTENIDO EN mg/l</u>			
	<u>Fe</u>	<u>Cu</u>	<u>Zn</u>	<u>Mn</u>
A	1,0	0,1	1,0	0,1
B	2,0	0,2	1,2	0,2
C	3,0	0,3	1,5	0,3
D	4,0	0,4	2,0	0,4
E	5,0	0,5	2,5	0,5

Estas disoluciones se prepararon en  $\text{NO}_3\text{H}$  1N

TABLA III

COMPOSICION DE LAS DISOLUCIONES PATRON PARA EL ANALISIS DE LOS  
ELEMENTOS Na, K, Ca y Mg.

CONTENIDO EN mg/l

<u>Solución</u>	<u>Na</u>	<u>K</u>	<u>Ca</u>	<u>Mg</u>
1	0,6	2,0	2,0	0,2
2	0,9	3,0	3,0	0,3
3	1,2	4,0	4,0	0,4
4	1,5	5,0	5,0	0,5
5	2,1	7,0	7,0	0,7
6	3,0	10,0	10,0	1,0

de  $\text{ClNa}$  y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  para la determinación de Mn. Se incineraron 100 ml. de leche. Las cenizas eran disueltas en 2 ml. de  $\text{NO}_3\text{H}$  concentrado y la solución se evaporó a sequedad sobre una placa caliente. El residuo se disolvió calentando en  $\text{NO}_3\text{H}$  1N y se pasó cuantitativamente a un tubo de centrifuga de 10 ml. con tapón. Después de mezclado se centrifugó 10 mn a 1.800 r.p.m. para la separación de posibles partículas de sílice. La medición de Fe, Cu y Mn se hizo en el líquido sobrenadante. Para determinar Zn se realizaron diluciones posteriores (1/5 - 1/10).

Para realizar el análisis de elementos metálicos en las muestras de queso, se disolvían las cenizas de 5 gramos de queso, en 2 ml. de  $\text{NO}_3\text{H}$  concentrado, evaporando la solución sobre placa caliente. El residuo se disolvía en  $\text{NO}_3\text{H}$  1N haciendo diluciones 1/10 para determinar Fe y Mn, 1/50 para determinar Cu y 1/250 para determinar Zn. Para determinar Na, K y Mg se hacían diluciones en agua del orden 1/2.000, añadiendo posteriormente tricloruro de lantano en la proporción de 500 ppm.

#### 3.4.2.12. Determinación de dureza.

Como medida de la dureza y consistencia del queso, se utilizó la célula de Kramer (Kramer Shear cell.), desarrollado por Kramer A. y col. (1.951). Dicha célula es hoy día muy usada para el control de calidad de todos los productos alimenticios.

La respuesta mecánica del producto al ser sometido al ensayo con la célula de Kramer, se consideraba inicialmente como la resistencia al corte. Posteriormente algunos autores como Szczesniak A.A. y col. (1.963), han demostrado que dicha respuesta se debe inicialmente a la compresión, posteriormente al corte y por último a la extrusión, siendo por tanto difícil obtener

conclusiones claras de la influencia de cada uno de los componentes estructurales del producto. En queso se ha demostrado no obstante que la célula de Kramer, da unos valores tres o cuatro veces superiores a cualquier otro método de penetrometría, compresión o cizallamiento, sobre el mismo producto y probeta, siendo por tanto estos resultados más significativos; Goicoechea y col. (1.979).

#### 3.4.2.12.1 Equipo instrumental.

Para este trabajo, la célula de Kramer se adaptó a un Instron Food Testing Instrument mod. 1140, con los parámetros de medida definidos en la tabla siguiente:

- Velocidad de deformación	50 mm/mn
- Velocidad de la carta del registrador	50 mm/mn
- Cabezal de medida utilizado para medir la fuerza	500 Kg
- Rango	0-100 Kg

#### 3.4.2.12.2 Método.

La determinación se realizaba después de haber mantenido la muestra veinticuatro horas a 0°C o bien cuarenta y ocho horas a 0°C, si el producto había sido congelado.

Los ensayos se efectuaban sobre una probeta cilíndrica de queso de 45 mm. de diámetro y 25 mm. de altura, con un peso medio de  $49 \pm 1$  g., haciendo en cada uno, un mínimo de cuatro determinaciones. La variable a medir es la F max.: Kg/gramo del producto.

9661

4. RESULTADOS Y COMENTARIOS

#### 4.1. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Para la interpretación de resultados se ha efectuado un análisis de varianza, mediante una prueba F con un nivel de significación al 95%.

Para ello se ha partido de un planteamiento matemático que supone la influencia en cada una de las variables estudiadas, de dos factores: la congelación y conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , efectuada sobre los lotes de quesos, y la maduración a que posteriormente se someten los mismos.

De cada uno de dichos factores, se obtienen una serie de variantes: el factor congelación y conservación; presenta nueve diferentes tiempos en dicha conservación (30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, y 360 días), además del testigo que no se ha conservado (T); el factor maduración presenta seis tiempos de dicho proceso en los cuales se practican controles (15, 30, 45, 60, 90 y 120 días), además del control efectuado en el tiempo cero de maduración (M-0). Dichas variantes serán consideradas diferentes niveles, dentro de cada factor.

En el primer nivel de maduración (M-0) de todas las tablas que expresan los resultados de este trabajo, se encuentran en la primera casilla de la izquierda, los valores hallados para cada una de las variables en los lotes antes de congelar y en el resto de las casillas los valores para los lotes recién descongelados.

Para el análisis de los datos se ha supuesto un modelo teórico expresado por la siguiente ecuación:

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ijk}$$

donde:

$X_{ijk}$  = Késima observación correspondiente a la fila  $i$  de la columna  $j$

$\mu$  = media general

$\alpha_i$  = efecto específico de la variante  $i$  del factor maduración

$\beta_j$  = efecto específico de la variante  $j$  del factor congelación

$\epsilon_{ijk}$  = efecto residual (error al azar), de todos los factores no controlados, admitido como una variable aleatoria y perteneciente a la  $K$ -ésima observación.

Si no existe interacción entre ambos factores, el efecto estudiado es simplemente aditivo y supone:

$$(1) \quad \sum_{i=1}^n \alpha_i = 0 \quad \text{y} \\ \sum_{j=1}^n \beta_j = 0$$

Ahora bien, cuando se detecta interacción entre los factores, dicha ecuación se modifica, añadiendo un nuevo componente

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ijk} + \gamma_{ij}$$

donde

$\gamma_{ij}$  = efecto debido a la interacción de ambos factores sobre el conjunto  $ij$ .

En este caso, los supuestos de (1) ya no se cumplen.

Los resultados de la aplicación del análisis de varianza, para estudiar la existencia o no entre los factores, de interacción para cada una de las variables, vienen reflejadas en las tablas nº VI, VIII, X, XII, XIV, XVI, XVIII, XX, XXII, XXIV, XXVI, XXVIII, XXX, XXXII, XXXIV, XXXVI.

En las tablas donde se observan las medias de los valores encontrados para cada una de las variables en cada nivel de congelación y maduración, se expresa debajo de cada una, las diferencias significativas que presenta dicho dato, respecto de los otros que se encuentran en su misma fila (o nivel de maduración) y más abajo respecto de los que se encuentran en su misma columna (o nivel de conservación).

#### 4.2. ANALISIS INICIALES.

Los resultados de los análisis efectuados sobre una muestra de las cuajadas, inmediatamente después de su salida de la prensa, quedan reflejados en la tabla nº IV.

#### 4.3. ANALISIS PERIODICOS.

Los valores analíticos encontrados para cada una de las variables estudiadas, se agrupan en dos tipos de análisis: análisis bioquímicos y análisis microbiológicos.

En el primer grupo quedan incluidos los valores relacionados con la humedad, acidez, protefna, grasa y reología de los quesos. En el segundo grupo se incluyen los análisis efectuados para encontrar los valores de gérmenes viables, lactobacilos, coliformes, gérmenes proteolíticos y gérmenes lipolíticos, en cada uno de los lotes estudiados.

G. viables	Lactobacilos	Coliformes	Proteolíticos	Lipolíticos	pH	$\beta/\alpha_s$	$a_w$
7,37	3,42	4,18	5,26	5,24	5,99	1,03	0,990

Humedad	Acidez	Grasa	Ac. grasos	Prot. total	Prot. soluble	P. sol./P. total	Instron
44,33	0,30	11,94	0,37	14,41	3,45	23,97	0,95

**TABLA IV.- VALORES FISICOS, QUIMICOS Y MICROBIOLOGICOS DE LAS CUAJADAS RECIEN SALIDAS DE LA PRENSA.**

Los valores microbianos se expresan mediante el Log. n° de germ./gr. de muestra.

Los valores de Humedad, Grasa, Prot. total y Prot. soluble se expresan en % .

El valor de acidez, se expresa en % de ácido láctico.

El contenido en ácidos grasos libres, se expresa en % de ácido oleico.

#### 4.3.1. Análisis microbiológicos.

La flora microbiana para todas las determinaciones, viene expresada por el logaritmo del número de gérmenes por gramo de muestra.

##### 4.3.1.1. Determinación de gérmenes viables.

Los resultados de los análisis vienen reflejados en las tablas nº V y VI y en las figuras nº 1, 2 y 3.

De la tabla nº VI se desprende, que el lote que más se diferencia significativamente de los demás, es el testigo, ya que presenta diferencias con el C-30, C-90, C-120, C-150, C-180, C-240, C-300 y C-360.

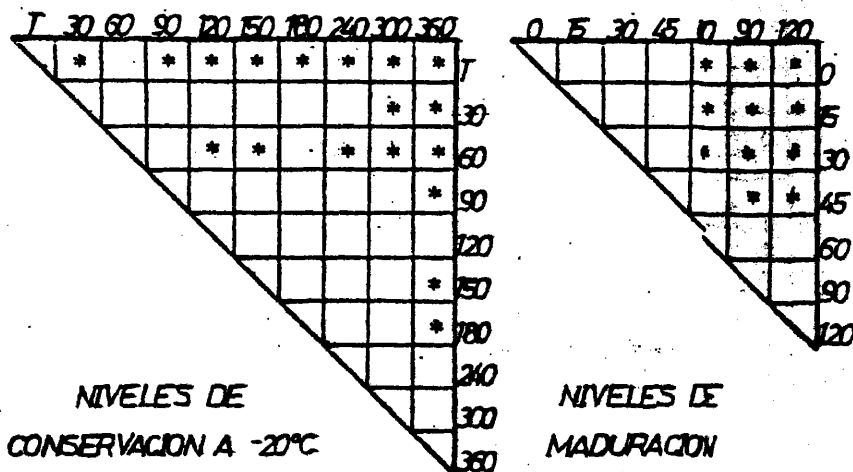
Dentro de los lotes congelados, aquellas cuajadas que tuvieron más tiempo de conservación (C-240, C-300 y C-360), son las que presentan mayores diferencias respecto de las otras, así como el lote con 60 días de congelación (C-60), que se diferencia del C-120, C-150, C-240, C-300 y C-360.

Existen diferencias significativas para los valores logarítmicos de gérmenes viables, entre las cuajadas antes de la congelación y después de la conservación al estado congelado, en todos los lotes a excepción del C-60, C-120 y C-150. En todos los casos hay una disminución en el número de gérmenes viables, menos en el caso de las cuajadas conservadas 30 días, en donde se puede observar un aumento después de la conservación (7,99---8,53). Dicha disminución en el número de gérmenes viables es observada también por Peláez C. (1.978) en queso tipo Manchego.

	T-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
M-0	7.99 ϕ-3,5,6 ninguno	8.53 ϕ ϕ-2	8.22 ϕ-1,6 5,6,7	7.70 1,2,3 ninguno	7.71 2,3 ninguno	7.95 ϕ-1,3,4,5 ϕ	7.48 1,2,3,6 ninguno	7.60 1,2,3,6 2,7	7.50 1,2,3,6 4,5	7.56 1,2,3,6 5,6,7
M-15	8.00 ninguno ninguno	8.42 5,8,9,10 ϕ-1	8.50 5,8,9,10 5,6,7	8.10 ninguno ninguno	7.27 2,3 ninguno	7.63 ninguno ϕ-4	7.53 3 ninguno	7.30 2,3 1,4,7	7.18 2,3 6	7.37 2,3 ninguno
M-30	8.34 ϕ-2,3,5 ninguno	7.74 3 1,2,6,7	8.54 ϕ-1 5,6,7	7.47 ϕ-1,3 ninguno	7.77 3 ninguno	7.42 1,3 ϕ-4,7	7.40 1,3 6	7.57 1,3 7	7.45 1,3 5	7.15 1,3 ninguno
M-45	8.56 ϕ ninguno	7.50 ϕ-5,6,7 1,2	8.12 ϕ 6,7	7.75 ϕ-7,8 ninguno	7.38 ϕ-2,6,10 ninguno	7.51 ϕ-2,5,7 1,5,6	7.62 ϕ-2,4,6 ninguno	7.84 ϕ-4 2,5,6,7	7.11 ϕ-70 1,6	7.26 ϕ-5,9 ninguno
M-60	8.26 ϕ ninguno	7.35 1,10 1,2	7.50 1,9,10 1,2,3	7.54 1,9,10 ninguno	7.59 1,6,9,10 ninguno	7.12 1,5,7 ϕ-6	7.62 1,6,9,10 ninguno	7.38 1,10 4,7	7.97 ϕ-2,6,8,10 1,3,6	6.84 ϕ-6,9 2
M-90	8.26 ninguno ninguno	7.18 ninguno 1,2,3	7.15 ninguno 1,2,3,4	7.50 ninguno ninguno	7.01 ninguno ninguno	7.22 ninguno ϕ-5	7.70 ninguno 3	7.37 ninguno 4,7	7.54 ninguno 2,4,5	6.83 ninguno 1
M-120	7.77 ninguno ninguno	7.12 ninguno 1,2,3	7.20 ninguno 1,2,3,4	7.10 ninguno ninguno	7.29 ninguno ninguno	7.46 ninguno 1,2,5,6	7.48 ninguno ninguno	6.93 ninguno ϕ	7.33 ninguno ninguno	6.78 ninguno 1

TABLA V.- EVOLUCION DEL NUMERO DE GERMINES VIABLES A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS, EXPRESADOS EN log n° germ./gr.

♦ FLODOS



NIVELES DE CONSERVACION A -20°C

NIVELES DE MADURACION

MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

7.826	7.720	7.702	7.667	7.428	7.378	7.26
-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a)

8.169	7.691	7.886	7.594	7.437	7.476	7.549	7.427	7.311	7.137
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

MEDIA GENERAL = 7.567

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VAJAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.5543E 01	6	0.9238E 00	12.146**
COLUMNAS	0.1098E 02	9	0.1220E 01	16.035**
INTERAC.	0.8984E 01	54	0.1664E 00	2.187**
ERROR	0.5324E 01	70	0.7606E-01	
TOTAL	0.3083E 02	139		

b)

TABLA VI.- GERMESES VIABLES.  
 a) Diferencia significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20° C.  
 b) Analisis de varianza.

De la tabla nº V se desprende, que no existen diferencias significativas en el lote testigo y en las cuajadas C-90 y C-120, para cada uno de los niveles de maduración, mientras que en el resto de los lotes congelados, los 15 (M-15), 30 (M-30) y 45 (M-45) días de maduración, se diferencian significativamente de los 60 (M-60), 90 (M-90) y 120 (M-120) días, con un descenso en el número de gérmenes viables. Dichas diferencias significativas para cada uno de los niveles de maduración, tomando todos los valores globalmente, se expresan en la tabla nº VI.

Los valores límites encontrados para el logaritmo de gérmenes viables (mínimo de 6,78 y máximo de 8,56), están dentro del rango hallado por otros autores: Núñez M. (1.978) en queso de Cabrales, encuentra valores logarítmicos entre 7 y 9; Ordoñez J.A. y col. (1.980 b) en queso de Roncal fabricado con leche cruda de oveja, encuentra unos valores logarítmicos de gérmenes viables, comprendidos entre 6 y 9; Ordoñez J.A. y col. (1.977 a) en queso Ulloa encuentra para un fabricante, gérmenes viables comprendidos entre 6 y 9 y para otro entre 5 y 9; Martínez Moreno J.L. y col. (1.976) en quesos Manchegos industriales fabricados con leche de oveja sin pasteurizar, los encuentran entre 7 y 10 al igual que Núñez M. (1.976) en quesos Manchegos industriales, pero a partir de leche de oveja pasteurizada; para Ordoñez J.A. y col. (1.978 a), quesos Manchegos fabricados con leche cruda y conservados en aceite de oliva, presentan unos valores logarítmicos de gérmenes viables entre 6 y 9, mientras que Roman M. (1.975), encuentra para quesos Manchegos parafinados y no parafinados, una flora total viable comprendida entre 7 y 10.

Por otro lado Devoyod J.J. (1.969) en queso Roquefort, encuentra en muestras tomadas del centro y la superficie del queso,

valores logarítmicos de gérmenes viables comprendidos entre 8 y 10, cuando los recuentos se realizaban antes del salado y entre 7 y 10 cuando se realizan después del salado. Mansour A. y col. (1.973) en quesos conservados en salmuera, observan un descenso de la flora microbiana total de 8,5 a 7,5, mientras que Sozzi T. y col. (1.972) en queso Vacherin, observan que la flora microbiana total puede alcanzar en sólo 20 días, valores logarítmicos máximos de hasta 10.

En el lote testigo, los gérmenes viables aumentan ligeramente al principio de la maduración, para alcanzar a los 45 días el valor máximo (8,56) y luego descender hasta el final, sin que estos cambios sean significativos en nuestra experiencia. Dichos resultados concuerdan con Galzin M. y col (1.970), que en queso Roquefort, encuentran también una disminución lenta pero constante de la flora total, y Jiménez S. (1.978) en queso Manchego.

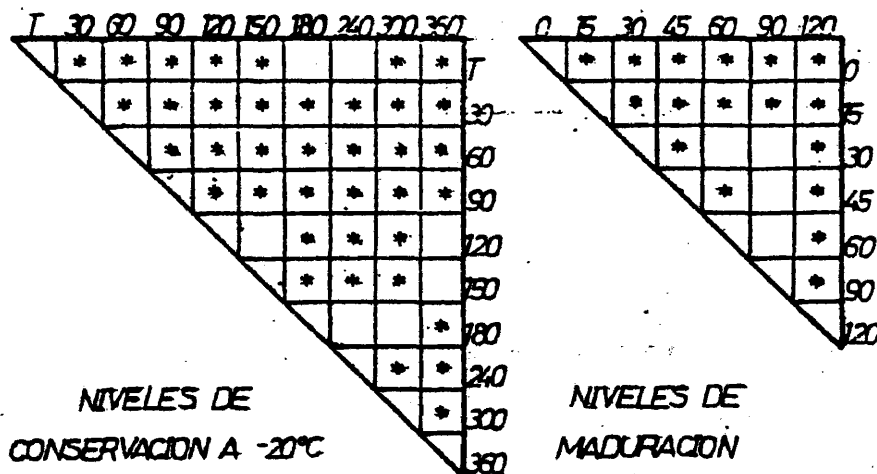
#### 4.3.1.2. Determinación de lactobacilos.

Los valores de lactobacilos encontrados en los diferentes análisis, vienen reflejados en las tablas nº VII y VIII y las figuras nº 4, 5 y 6.

En dichas tablas y figuras, puede verse que el lote de maduración directa se diferencia significativamente de los demás, a excepción de los lotes C-180 y C-240. En dicho lote se observa un aumento significativamente importante a los 15 días de maduración, (4,47 a 6,47) y de nuevo un posterior aumento a los 45 y 60 días.

	T-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
$\bar{X}$	4.47	5.64	4.31	4.57	3.55	3.52	2.92	4.25	5.29	5.36
M-0	2,5,6,7	9,10	2,7,9,10	2,5,6,7	3,6,7,8	3,5,7,8	5,6	7,9,10	1,2,4,10	1,2,4,9
$\bar{X}$	6.47	3.94	4.60	5.50	5.88	4.43	6.23	6.88	6.50	5.02
M-15	7,9	6	6	ninguno	1,5,7	3	1	1	1	1,3,4,7
$\bar{X}$	6.42	4.64	5.10	5.43	5.50	4.57	7.22	6.62	6.76	5.88
M-30	6	6	6	5	4	2	2,6	1	1	4
$\bar{X}$	6.77	4.50	5.00	6.66	5.60	5.53	7.28	6.86	6.61	5.82
M-45	2,3	1,4,7,8,9	1,4,7,8,9	1,2	7	7,8	2,3,5,6,10	2,3,6	2,3	7
$\bar{X}$	6.75	4.28	5.30	5.47	4.91	6.93	7.07	7.05	6.34	4.88
M-60	2,3,4,5,10	10	1,2,6,7,8,9	1,2,6,7,8,9	1,2,6,7,8,9	2,3,4,5,10	1,6,8	1,6,7	1,6	1,6,7,8,9
$\bar{X}$	6.49	3.33	5.34	6.26	6.14	6.00	6.72	6.67	7.12	4.92
M-90	4,7,8	6	6	1,5	4,6	5	1,8	17	1	1,3,4,7
$\bar{X}$	6.40	4.81	5.00	6.92	6.80	7.32	7.30	6.00	7.21	6.30
M-120	1,4,5	3	2	5	4	7,9	6,9	6,7	1,5	1
										todos

TABLA VII.- EVOLUCION DEL NUMERO DE LACTOBACILOS A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFE-  
RENTES LOTES CONSERVADOS, EXPRESADOS EN log. n° germ./gr.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

4.388	5.546	5.814	6.063	5.898	5.907	6.406
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a)

6.254	4.449	4.950	5.830	5.484	5.472	6.392	6.335	6.548	5.464
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

MEDIA GENERAL = 5.718

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VAJAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CLAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.4937E 02	6	0.8228E 01	286.855**
COLUMNAS	0.5888E 02	9	0.6544E 01	228.083**
INTERAC.	0.6001E 02	54	0.1111E 01	38.743**
ERROR	0.2008E 01	70	0.2868E-01	
TOTAL	0.1703E 03	139		

b).

TABLA VIII.- LACTOBACILOS.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20° C.  
 b) Analisis de varianza.

El lote conservado durante 30 días (C-30), presenta después de la descongelación un valor logarítmico de lactobacilos significativamente mayor que el que tenía antes de congelar, (4,47-5,64), para sufrir luego una caída y estar a lo largo de toda la maduración, en valores muy por debajo del lote testigo. Dichos resultados coinciden con los encontrados por Peláez C. (1.978) en quesos tipo Manchego.

En las tablas puede apreciarse que en el resto de los lotes congelados, los valores de lactobacilos se diferencian del testigo, encontrándose por debajo de éste en todos los casos, a excepción de los lotes C-180 y C-240, en que no existen diferencias significativas respecto del lote madurado directamente y del lote C-300, cuya media supera la del lote testigo.

Los valores que se encuentran de lactobacilos al terminarse el proceso de descongelación, indican según se muestra en la tabla nº VII, diferencias significativas respecto del lote antes de congelar, para los quesos C-30, C-120, C-150 y C-180, siendo mayores las cifras encontradas en el primer caso y menores en los tres últimos.

El incremento de lactobacilos a lo largo de la maduración, ha sido encontrado también por otros autores, como Tourneur C. (1.972), quien los encuentra en quesos de pasta cocida, multiplicándose activamente hasta el día 50 de la maduración y llegando a alcanzar valores de 9. Dicho aumento también ha sido encontrado por Sozzi T. y col. (1.973) en queso Vacherin y Naylor J. y col. (1.958), así como por Kikuchi T. (1.966) en queso Camembert. Núñez M. (1.978), observa un incremento de lactobacilos en el interior del queso de Cabrales comprendido entre 4 y 8 y

en la superficie entre 4 y 6 y Ordóñez J.A. y col. (1.980 b) en el queso de Roncal entre 4 y 8.

#### 4.3.1.3. Determinación de coliformes.

Los resultados encontrados para los gérmenes coliformes, están expresados en las tablas nº IX y X y las figuras 7, 8 y 9.

En el lote de maduración directa, existe una disminución importante en el número de coliformes, hallándose diferencias significativas, entre los valores encontrados para los quesos salados (5,04) y con 15 días de maduración (4,04), respecto de los 30, 45, 60, 90 y 120. Como puede apreciarse en la tabla nº X, dicho lote se diferencia significativamente de todos los demás, a excepción del lote C-60 y presenta un valor de su media significativamente mayor, que los valores medios del resto de los lotes congelados.

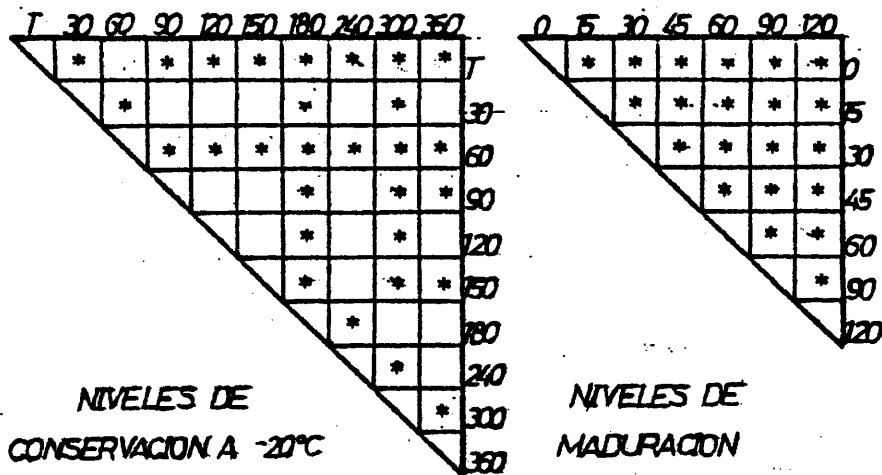
El número de gérmenes encontrados en los lotes recién descongelados, se diferencia significativamente del lote testigo en todos los casos, a excepción de los lotes C-30 y C-60 (tabla nº IX), observándose una disminución en dichos valores.

En la tabla nº X puede verse que existen diferencias significativas en todos los niveles de maduración y que las medias de dichos niveles van en constante disminución. Dichos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores como Stadhouders J. y col. (1.966), Cattaneo P. y col (1.978), Galzin M. y col. (1.970), etc... Mansour A. y col. (1.973) no los detectan en queso Roquefort, al igual que Núñez M. (1.976) y Román M. (1.975) en queso Manchego fabricado con leche pasteurizada,

	0-0	0-30	0-60	0-90	0-120	0-150	0-180	0-240	0-300	0-360
I	5,04	5,04	2,18	4,48	3,15	4,00	2,48	3,65	2,40	3,65
M-0	2,3	1,3	1,3	•	•	•	•-9	•-10	•-7	•-8
	•	•	•	•	•	•	•-3	•	•	•
I	4,04	2,04	4,00	2,16	2,65	2,20	1,60	2,48	0,79	1,39
M-15	2,7,9,10	1,3	2,7,9,10	ninguno	ninguno	ninguno	1,3	ninguno	1,3	1,3
	•	•	•	1	•-3	•	1,3,5,7	•	•	•-4
I	1,48	2,40	3,06	0,84	2,98	3,04	2,40	1,60	0,95	2,40
M-30	•-8	•-7,10	•-5,6	•-9	•-3,6	•-3,5	•-2,10	•-1	•-4	•-2,7
	1,2,7,5	•	•	1	4,5,6,7	•	•-1	1,3,6	•	•
I	1,20	1,20	1,84	2,18	1,30	2,04	1,65	1,65	4,70	1,39
M-45	3,4,5,6,9	3,4,5,6,9	•	•-6	•-10	•-4	•-1,2,8	•-1,2,7	•	3,4,6,7,8
	1,2,5,7	•	•	1	•-5	•	•-3	1,2,6,7	•	•-2
I	1,23	1,18	0,60	1,98	1,30	0,95	1,30	1,60	1,60	0,95
M-60	•-7	•-1,5,7	•	•	•-1,2,7	•-10	•-1,2,5	•-9	•-8	•-6
	•	•	•	1	•-4	•	•-2	1,2,6	•	•
I	1,48	0,48	1,40	1,60	0,48	0,60	0,48	0,48	2,04	1,18
M-90	•-4,3	1,3,4,9,10	•-1,4	1,3,4,9,10	1,3,4,9,10	1,3,4,9,10	1,3,4,9,10	1,3,4,9,10	•	•
	1,2,5,7	•	•	1	•-7	•	•-7	•	•	•
I	1,30	0,00	0,48	0,48	0,60	0,48	0,50	1,40	1,40	0,40
M-120	•-8,9	•	1,2,8,9	1,2,8,9	1,2,8,9	1,2,8,9	1,2,8,9	•-1,9	•-1,8	1,2,8,9
	•-5	•	•	1	•-6	•	•-6	1,2,4,6	•	•

• todos

TABLA IX.- EVOLUCION DEL NUMERO DE GERMENES COLIFORMES A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS, EXPRESADOS EN log. n° germ./gr.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

3.808    2.336    2.115    1.553    1.272    1.023    0.712

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 2.399   1.807   2.368   1.961   1.780   1.903   1.488   1.837   1.380   1.634

MEDIA GENERAL = 1.846

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VARIAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.1389E 03	6	0.2314E 02	645.195**
COLUMNAS	0.1247E 02	9	0.1385E 01	38.620**
INTERAC.	0.5602E 02	54	0.1037E 01	28.923**
ERROR	0.2511E 01	70	0.3537E 01	
TOTAL	0.2098E 03	139		

b)

TABLA X.- GERMENES COLIFORMES.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20° C.  
 b) Análisis de varianza.



probablemente debido a su destrucción por la pasteurización de la leche y ausencia de posterior contaminación. Devoyod J.J. y col. (1.968) sin embargo en queso Roquefort, si los encuentran, tanto en la superficie como en el centro del queso, pasando de valores próximos a 6, a valores casi nulos al comenzar la maduración.

Ordóñez J.A. y col. (1.980 b), observan una desaparición total de gérmenes coliformes en queso de Roncal a los tres meses de maduración, al igual que Núñez M. (1.978) en queso Cabrales, que encuentra valores máximos de 6 en la cuajada, para desaparecer posteriormente a los 15 días de maduración.

#### 4.3.1.4. Determinación de gérmenes lipolíticos.

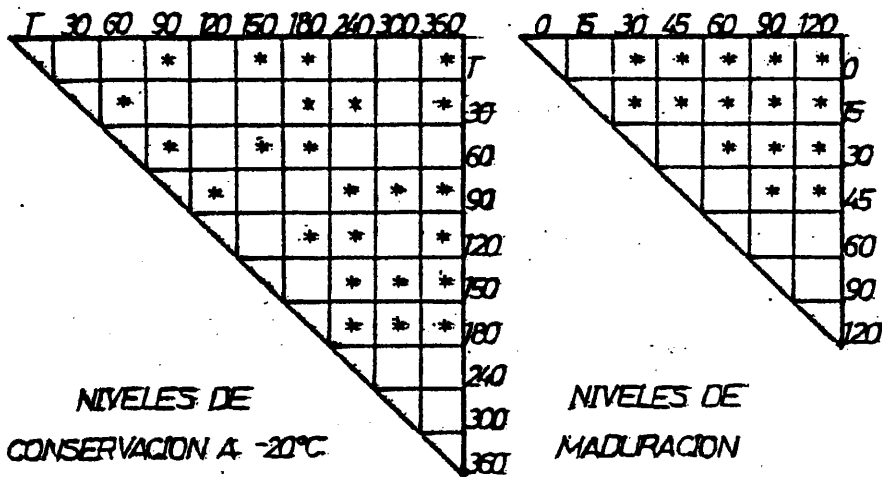
Los valores que se han hallado de gérmenes lipolíticos, están reflejados en las tablas nº XI y XII y figuras nº 10, 11 y 12

En el lote madurado directamente, puede observarse un incremento de la flora lipolítica a los 15 días de maduración, con un valor de 5,40, que se diferencia significativamente del correspondiente a la cuajada recién salida del saladero, (tabla nº XI). A dicho aumento le sigue una brusca disminución de gérmenes a los 30 días (4,18) para mantenerse luego hasta el final de la maduración, en valores que en general no se diferencian significativamente entre sí.

El lote testigo sólo se diferencia significativamente de los lotes C-90, C-150, C-180, y C-360, siendo las medias de estos lotes, superiores al control en los tres primeros casos, e inferiores en el último, (tabla nº XII).

	T-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
X	1,60	5,11	5,26	5,10	4,80	5,52	5,14	5,01	5,41	5,36
H-0	0	1,5	1,5	1,6	0-4,9	1,4,5,8	1,5	1,6,9	1,5,8	1,5
X	0-1	0-2	ninguno	5,6,7	2,5,6,7	0	5	0	4,5,6,7	0-2
H-15	5,10	5,21	5,00	5,15	5,15	4,08	5,15	5,55	5,20	5,11
H-15	ninguno	ninguno	8	ninguno	ninguno	8	ninguno	3,6	ninguno	ninguno
X	0-7	1,4,6,7	ninguno	0-4	0	1,4,5	5	0	5,6,7	0-2
X	4,18	4,47	3,65	4,00	4,21	4,08	5,18	4,50	4,92	4,02
H-30	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
X	3,7	1,2	ninguno	3,4,6	2,5,6,7	1,4,5	5	1,2,6,7	5,6,7	1,2,6,7
H-45	4,65	4,52	3,68	5,18	4,86	4,10	5,11	4,44	4,61	4,17
X	3,4,6,7	3,4,7	0-6	0-5,7	1,6,7,10	1,4,5,7,9	0-4	3,4,7	3,4,6,7	3,4,5,7
H-45	1,2	1,2	ninguno	3,6,7	2,5,6,7	0	5	1,2,6,7	1,5,6,7	1,2,6,7
X	4,56	4,16	4,50	4,98	4,24	4,61	4,46	4,18	3,71	3,72
H-60	9,10	9,10	9,10	5,8,9,10	4	9,10	9,10	4	0-5,8,10	0-5,8,9
X	1,2	1	ninguno	2,6,7	1,2,3,4	0-6	0	1,2,6,7	1,2,3,4	1,2
X	4,10	4,11	4,11	4,52	4,21	4,78	5,00	3,25	3,81	3,16
H-90	7,8,9,10	7,10	6,7,10	8,9,10	7,10	3,8,9,10	0-4,6	1,4,6,7	1,4,6,7	0-8,9
X	1,2	1,2	ninguno	0-7	1,2,3,4	1,4,7	5	0	1,2,3,4	1,2,3,4
H-120	4,93	4,18	4,42	4,70	4,24	5,10	5,17	3,96	3,30	3,12
X	8,9,10	7,8,9,10	7,8,9,10	8,9,10	6,7,8,9,10	5,8,9,10	0-1,4,6	0-9,10	0-8,10	0-8,9
H-120	1,3	1,2	ninguno	1,2,4,5	1,2,3,4	1,4,5,6	5	0	1,2,3,4	1,2,3,4

TABLA XI.- EVOLUCION DEL NUMERO DE GERMINES LIPOLITICOS A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS, EXPRESADOS EN log. n° germ./gr.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION-

5.082 5.282 4.594 4.573 4.359 4.233 4.252

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 4.531 4.680 4.375 4.960 4.648 4.384 5.145 4.344 4.443 4.243

MEDIA GENERAL = 4.675

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VALAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G+L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.2015E 02	6	0.3359E 01	62.172**
COLUMNAS	0.1096E 02	9	0.1217E 01	22.535**
INTERAC.	0.2251E 02	54	0.4168E 00	7.715**
ERROR	0.3781E 01	70	0.4168E-01	
TOTAL	0.5740E 02	139		

b)

TABLA XII- GERMENES LIPOLITICOS.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20° C.

b) Análisis de varianza.

Los valores de gérmenes con acción lipolítica encontrados al descongelar las cuajadas, son superiores en todos los casos a los lotes antes de congelar, hallándose diferencias significativas entre dicho lote (3,60) y todos los demás lotes conservados a bajas temperaturas (tabla nº XI ).

Si se observa en la tabla nº XII las diferencias entre los niveles de maduración, puede verse que las maduraciones de 0 y 15 días se diferencian significativamente de todas las demás, con valores superiores a ellas (media: 5,08 para M-0 y media: 5,28, para M-15). Existe luego una disminución progresiva en el número de gérmenes, con diferencias significativas entre los niveles intermedios y los niveles finales de maduración.

Los valores extremos encontrados para el logaritmo de gérmenes (5,55 de máximo y 2,96 de mínimo), concuerdan con los hallados por otros autores como Rossi J. y col. (1.974) en quesos Cacciotta, (entre 4 y 2 para la flora interna y entre 6 y 2 para la flora externa); Abou-Donia S.A. y col. (1.975 y 1.978) encuentran dichos gérmenes en valores de  $9,7 \times 10^4$  y  $4,28 \times 10^6$  y Mayayo M.A. y col. (1.976) en leche de oveja conservada a 5°C, encuentran valores de  $10^5$ - $10^6$ , si la leche es cruda y de  $10^3$ - $10^4$  si la leche es pasteurizada

#### 4.3.1.5. Determinación de gérmenes proteolíticos.

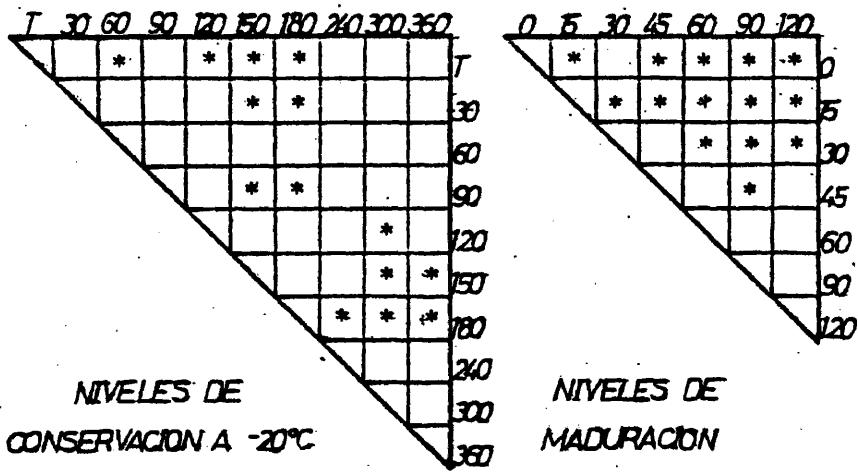
Los valores de gérmenes proteolíticos que hemos encontrado en nuestro trabajo, están expresados en las tablas XIII, XIV y en las figuras nº 13, 14 y 15.

En el lote madurado directamente, se puede observar un aumento significativamente importante de los valores logarítmicos

	C=30	C=60	C=90	C=120	C=150	C=180	C=240	C=300	C=360
X	2,95	4,40	5,13	4,05	5,22	5,31	4,90	3,70	5,12
H-0	ninguno φ-6,7	ninguno ninguno	ninguno φ-2	ninguno 2,3,7	ninguno ninguno	ninguno 4,5,6,7	ninguno 3,4,5	ninguno ninguno	ninguno φ2
X	5,46	5,66	5,14	5,13	5,14	5,43	5,52	4,66	4,91
H-15	4,9,10 φ	4,9,10 φ	1,2,3,7,8,9 φ-1	2,9,10 1,4,6	2,9,10 ninguno	4,9,10 φ-1	4,9,10 φ-1	φ-10 ninguno	φ-4,9 3,5,6,7
X	5,23	3,66	4,10	4,80	5,01	5,21	4,00	5,27	4,13
H-30	ninguno φ	ninguno ninguno	ninguno 1,2,7	ninguno 1	ninguno ninguno	ninguno φ-1	ninguno 1,2	ninguno ninguno	ninguno φ-4
X	4,13	3,80	4,00	4,39	4,29	5,00	3,97	3,83	4,60
H-45	ninguno φ-5	ninguno ninguno	ninguno 1,2	ninguno 2	ninguno ninguno	ninguno φ	ninguno 1,2	7 ninguno	ninguno 1,5,6,7
X	3,97	3,71	4,10	4,59	4,11	4,35	3,32	3,19	3,20
H-60	5,8,10 φ-4	5 ninguno	8,10 1,2,7	1,2,3,8,10 ninguno	8,10 ninguno	8,10 φ	4,5,6,7,9 3,2,6,7	8,10 ninguno	3,4,5,6,7, 1,2,3,4
X	3,82	3,74	4,00	4,40	3,44	4,50	4,37	3,20	3,02
H-90	φ-6,9,10 2,3,4,5	1 ninguno	1 ninguno	1,6,8,10 2	5,7,8 ninguno	1,6,9,10 φ	1,6,9,10 2,5	5,7,8 ninguno	3,5,7,8 1,2,3,4
X	3,86	4,19	4,00	4,80	4,62	4,75	4,64	3,70	3,50
H-120	φ-4,10 2,3,4,5	1 ninguno	5,6,7,8 1,2,3,5	1,4,9,10 2	1,4,9,10 ninguno	1,4,9,10 φ	1,4,9,10 2,5	1,5,6,7,8 ninguno	5,6,7,8 1,2,3,4

TABLA XIII.- EVOLUCION DEL NUMERO DE GERMINES PROTEOLITICOS A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS, EXPRESADOS EN log. n° germ./gr.

↑ todos



NIVELES DE CONSERVACION A -20°C

NIVELES DE MADURACION

MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

4.739	5.293	4.614	4.267	3.899	3.724	4.068
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 

3.915	4.166	4.501	4.260	4.620	4.799	4.926	4.389	4.050	4.098
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

MEDIA GENERAL = 4.372

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VARIAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.3579E 02	6	0.5964E 01	31.798 **
COLUMNAS	0.1414E 02	9	0.1571E 01	8.376 **
INTERAC.	0.3096E 02	54	0.5733E 00	3.057 **
ERROR	0.1313E 02	70	0.1876E 00	
<b>b) TOTAL</b>	<b>0.9401E 02</b>	<b>139</b>		

TABLA XIV.- GERMESES PROTEOLITICOS.  
 a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.  
 b) Análisis de varianza.

cos de gérmenes proteolíticos a los 15 días de maduración (2,95 a 5,46). Dichos valores tienden luego a descender a lo largo del proceso, para encontrarse al final de éste sin diferencias significativas respecto del inicial, (2,82 a los 90 días y 2,86 a los 120 días).

El lote testigo, posee una media para toda su maduración, inferior a las medias de los lotes congelados, si bien dicho lote sólo se diferencia significativamente de los lotes C-60 C-120, C-150 y C-180, (tabla nº XIV).

Los resultados encontrados para los recuentos de gérmenes proteolíticos al realizar la descongelación de las cuajadas, muestran que no hay diferencias significativas entre estos lotes y los analizados antes de congelar en ningún caso, (tabla nº XIII).

Por otra parte, si se observan los resultados de la tabla nº XIV, puede verse que existe un aumento en la maduración a los 15 días, seguido de una tendencia a la disminución de gérmenes durante el resto del proceso, habiendo diferencias significativas apreciables, entre los controles realizados al principio de la maduración (0-15 y 30 días), respecto de los últimos.

Los valores de gérmenes proteolíticos encontrados en nuestra experiencia, coinciden con los hallados por otros autores, como Abou-Donia S.A. (1.975 y 1.978) y Rossi J. y col. (1.974).

#### 4.3.2. Análisis bioquímicos.

4.3.2.1. Valores relacionados con la humedad.

4.3.2.1.1. Determinación de la humedad por desecación.

Los resultados obtenidos se encuentran reflejados en las tablas nº XV y XVI.

En la tabla nº XVI , puede observarse que el único lote que se diferencia de los demás es el lote testigo, ya que éste presenta diferencias significativas con el lote C-90, C-120 C-150, C-180 y C-300. Como puede verse en dicha tabla, las medias de todos los lotes congelados, son superiores a la del testigo, si bien no se diferencian significativamente de éste, para tiempos muy cortos de conservación (C-30 y C-60) o para tiempos muy grandes (C-240 y C-360).

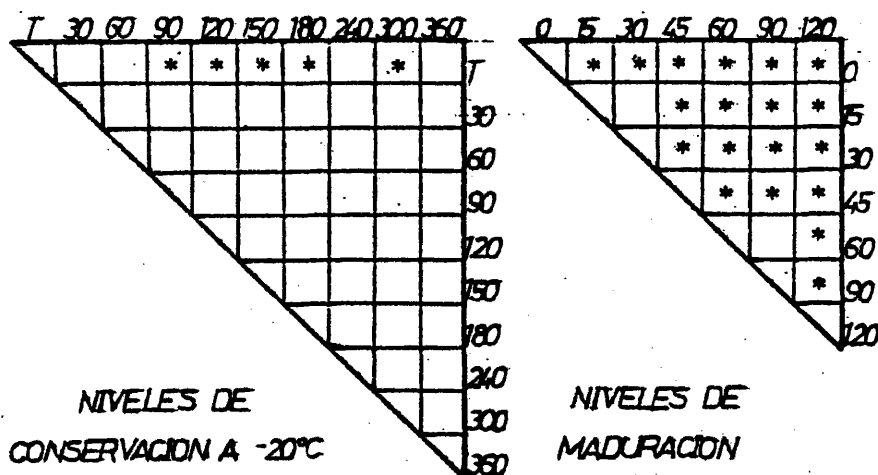
Como se ve en la tabla nº XV , en general no se encuentran diferencias significativas respecto de la pérdida de humedad, entre los lotes antes de congelar y al efectuar la descongelación, a excepción de los lotes C-30, C-60 y C-180, si bien en los dos primeros casos, dichas diferencias, pueden ser atribuibles a pérdidas originadas durante la descongelación y manipulación hasta el análisis de los quesos, ya que globalmente dichos quesos a lo largo de la maduración, presentan pérdidas de humedad ligeramente menores que el testigo, sin diferenciarse significativamente de él (35,90 y 35,66, frente a 34,24).

Puede observarse también una pérdida progresiva de humedad en todos los lotes a lo largo de la maduración, ya que existen diferencias significativas para dichos niveles en todos los controles efectuados a lo largo de ella, (tabla nº XVI).

	C=0	C=10	C=60	C=90	Gal20	Gal50	C=180	C=240	C=300	C=360
I	42.19	37.80	39.61	42.71	40.40	41.70	39.49	41.25	42.38	41.42
H=0	2,3,7 ninguno	φ-2,7 6,7	1,4,6,9 4,5,6,7	2,3,5,7 φ	2,4 φ	2,3,7 φ-2	1,4,6,9 6,7	2 5,6	2,3,7 φ	2 4,5,6,7
I	34.80	39.55	38.00	37.43	38.60	40.02	39.75	38.81	39.07	37.75
H=15	φ-3,4,10 ninguno	1 4,5,6,7	ninguno 5,6,7	ninguno 1,6,7	1 φ-3	1 φ-1	1 6,7	1 5	1 1,5,6,7	ninguno 4,5,6,7
I	34.80	37.59	36.60	36.14	37.40	37.58	38.65	39.11	37.60	38.14
H=30	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
	ninguno	6,7	6,7	1,4,7	1,5,7	1,2,6,7	7	5	1,5,6,7	4,5,6,7
I	33.60	35.00	36.14	38.00	36.92	37.02	36.47	35.94	36.99	30.25
H=45	4,5,6,9,10 ninguno	10 2	10 2,7	1,10 φ-2	1,10 1,2,5,7	1,10 1,2,6,7	10 7	10 ninguno	1,10 1,5,7	φ 1,2,3
I	31.78	35.25	34.73	35.71	35.00	35.59	36.05	29.30	33.58	32.85
H=60	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
	ninguno	2	1,2,7	1,4,7	φ-6	1,2,6,7	7	1,2,3	φ-6	1,2,3
I	32.16	32.11	33.40	34.36	35.97	31.87	34.17	31.21	34.68	31.50
H=90	5 ninguno	5 1,2,3	ninguno 1,2,3	ninguno 1,2,4	1,2,6,8 φ-5	5 φ-7	ninguno 1,2	5,9 1	8 1,2,3,7	ninguno 1,2,3
I	30.37	33.97	30.97	33.90	32.28	33.42	30.42	33.02	30.15	33.19
H=120	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
	ninguno	1,2,3	φ-8	φ-6	φ	φ-6	1,2	ninguno	φ	1,2,3

TABLA XV.- EVOLUCION DE LA HUMEDAD A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS, EXPRESADA EN %.

↑ TODOS



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

40.898 · 38.401 · 37.371 · 35.655 · 33.987 · 33.344 · 31.989

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

34.243 35.900 35.665 36.753 36.654 36.633 36.431 35.526 36.376  
35.316

a)

MEDIA GENERAL = 35.950

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VAJAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.1179E 04	6	0.1965E 03	105.240**
COLUMNAS	0.7869E 02	9	0.3743E 01	4.683**
INTERAC.	0.2834E 03	54	0.5248E 01	2.811**
ERROR	0.1307E 03	70	0.1867E 01	
TOTAL	0.1672E 04	139		

b)

TABLA XVI.- HUMEDAD.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.  
b) Análisis de varianza.

Los valores de humedad encontrados por otros autores en diversos tipos de quesos, oscilan entre el 60% y 30% para el queso de Cabrales, hallado por Núñez M. (1.978); 55%-44% por Ordóñez J.A. y col. (1.980 b) en queso de Roncal; alrededor del 55%, encontrado por Marcos A. y col. (1.976 b) en quesos de los Pedroches, etc...

Los valores encontrados por nosotros en este trabajo (entre 30,37% y 42,19%), son análogos a los encontrados en quesos Manchegos por otros investigadores: Martínez Moreno J.L. (1.976) y Núñez M. (1.976), entre 40% y 50%; Román M. (1.975), entre 30% y 40% en quesos parafinados y entre 20-30% en quesos no parafinados.

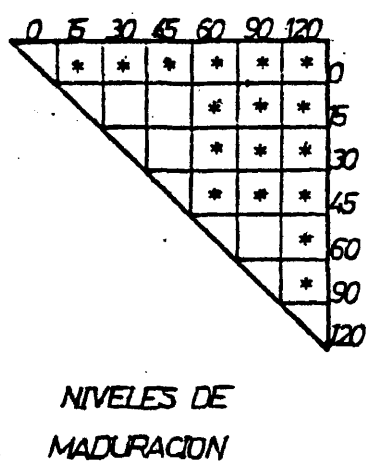
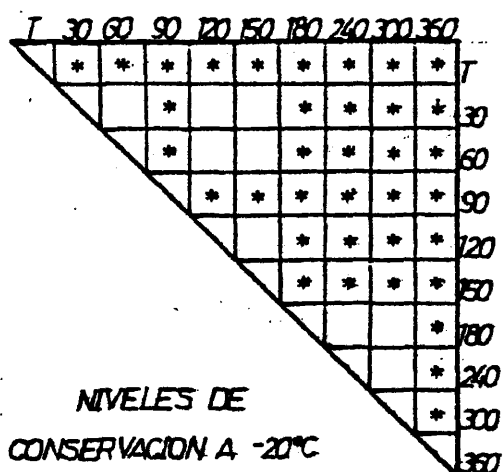
#### 4.3.2.1.2. Determinación de la actividad de agua.

Los resultados hallados están en las tablas nº XVII y XVIII.

En el lote testigo, puede observarse un descenso en la actividad del agua a lo largo de la maduración, pasando de un valor inicial de 0,990 a un valor a los 120 días de 0,955. Dicho descenso, puede verse también de modo global en los lotes congelados. En la tabla nº XVIII donde se dan las medias para los diferentes niveles de maduración se comprueba que ésta en general, produce un descenso en los niveles de actividad de agua, siendo éste muy rápido al principio, (el nivel M-0 se diferencia estadísticamente de todos los demás con una media de 0,98), para luego estabilizarse a los 15, 30 y 45 días de maduración (0,969), y proseguir su disminución hasta el final, quedando con valores inferiores al comienzo (0,960; 0,957; 0,949).

	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
$\bar{x}$	0.990	0.977	0.965	0.975	0.990	0.977	0.990	0.990	0.977
H=0	2,3,5,7,10 ↖-6	1,2,6,8,9 ninguno	2 6	1,2,6,8,9 ↖-3	2,3,5,7,10 4,5,6	1,2,6,8,9 4,5,7	2,3,5,7,10 5,6,7	2,3,5,7,10 ↖	1,2,6,8,9 ↖
$\bar{x}$	0.950	0.955	0.987	0.975	0.985	0.975	0.977	0.975	0.955
H=15	4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15 1,5,6	4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15 4,6	↖-6,8 6	1,2,3,4,10 ↖-1	1,2,3,10 5,6	1,2,3,4,10 7	1,2,3,10 5,6,7	1,2,3,4,10 ↖-3	↖-1,2,3 ↖-3
$\bar{x}$	0.945	0.975	0.975	0.990	0.977	0.955	0.975	0.977	0.947
H=30	↖-10 ↖-2	1,5,7,10 ninguno	1,5,7,10 5,6,7	↖-4,6	1,5,7,10 5,6	↖-10 7	1,5,7,10 5,6,7	1,5,7,10 ↖-2	↖-1,7 1,6,7
$\bar{x}$	0.955	0.986	0.977	0.987	0.975	0.950	0.985	0.947	0.945
H=45	↖-7,9,10 1,3,5,6	1,7,9,10 2,5	1,7,9,10 6	1,7,9,10 1,2,5,7	1,7,9,10 1,5,6	↖-1,9,10 1,6,7	1,7,9,10 5,6,7	↖-1,7,10 1,2,3,7	↖-1,7,9 1,2,6,7
$\bar{x}$	0.975	0.985	0.990	0.950	0.955	0.950	0.947	0.945	0.945
H=60	↖-2 ↖	1,2,4 4,6	↖-3 3,6	1,2,4 ↖-7	1,2,4 ↖-6	1,2,4 1,6,7	1,2,4 ↖	1,2,4 1,2,3,7	1,2,4 1,2,3,7
$\bar{x}$	0.987	0.990	0.950	0.990	0.947	0.977	0.915	0.947	0.915
H=90	2,4,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100 ↖-1	2,4,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100 2,5,7	1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25,27,29,31,33,35,37,39,41,43,45,47,49,51,53,55,57,59,61,63,65,67,69,71,73,75,77,79,81,83,85,87,89,91,93,95,97,99,100 ↖	2,4,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100 ↖-3,4	1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25,27,29,31,33,35,37,39,41,43,45,47,49,51,53,55,57,59,61,63,65,67,69,71,73,75,77,79,81,83,85,87,89,91,93,95,97,99,100 ↖-5	1,4,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100 4,5,7	↖-10 ↖-7	1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25,27,29,31,33,35,37,39,41,43,45,47,49,51,53,55,57,59,61,63,65,67,69,71,73,75,77,79,81,83,85,87,89,91,93,95,97,99,100 ↖-3 ↖-6	
$\bar{x}$	0.955	0.990	0.990	0.947	0.977	0.915	0.915	0.917	0.915
H=120	↖-3,5,6 ↖-2,4	5,7,8,9,10 6	1,5,7,8,9,10 3,6	↖-1,7,8,10 ↖-5	7,8,9,10 ↖-5,6	↖-8,9,10 ↖	↖-7,9,10 ↖-6	1,2,3,4,6 ↖	↖-7,8,9 ↖-7

TABLA XVII.- EVOLUCION DE LA ACTIVIDAD DE AGUA A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFE-  
RENTES LOTES.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

0.930 0.969 0.969 0.969 0.960 0.957 0.949

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION.

a) 0.966 0.970 0.972 0.979 0.974 0.972 0.957 0.958 0.957 0.943

MEDIA GENERAL = 0.965

ANALISIS DE VARIANZA

F. VAJAC.	SUM. CUAD.	G.L.	MED. CUAD.	F
FILAS	0.1386E-01	6	0.2144E-02	13.804**
COLUMNAS	0.1540E-01	9	0.1711E-02	170.604**
INTERAC.	0.3815E-01	54	0.7064E-03	70.451**
ERROR	0.7019E-03	70	0.1003E-04	
TOTAL	0.6711E-01	139		

b)

TABLA XVIII.- ACTIVIDAD DE AGUA.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.  
 b) Análisis de varianza.

En esta misma tabla también se observa, que los lotes con menor tiempo de conservación (C-30, C-60, C-90, C-120 y C-150), presentan unos valores de actividad de agua superiores al testigo, mientras que aquellos que estuvieron más tiempo en las cámaras (C-180, C-240, C-300, C-360), presentan unos valores inferiores a éste.

Los valores de actividad de agua que se obtienen en este trabajo, son muy similares a los obtenidos en queso Manchego por Marcos A. y col. (1.979). Dicho autor, analizando quince muestras de quesos Manchegos maduros, obtienen un valor medio de actividad de agua de  $0,95 \pm 0,02$ , oscilando ésta para las diferentes muestras entre 0,99 y 0,92; estos valores de actividad de agua se corresponden con unos valores de humedad en porcentaje de 28,63-37,90%, resultados que concuerdan con los obtenidos por nosotros en este trabajo.

Esteban M.A. y col. (1.979), estudian la actividad de agua de diversos quesos españoles, encontrando que los quesos frescos y poco madurados poseen valores muy altos de actividad de agua (0,99; 0,98), mientras que aquellos como el Cabrales, altamente hidrolizado por las enzimas fúngicas, poseen un valor de actividad de agua bastante bajo (0,86), debido a la concentración de los productos de hidrólisis, que reducen la presión de vapor de agua. La actividad de agua de las restantes muestras de quesos españoles analizadas, oscilaba entre 0,91 y 0,98. La actividad de agua media encontrada por Marcos A. y col. (1.976 b), en el análisis de 16 quesos de los Pedroches es de 0,90, con oscilaciones entre 0,89 de mínima y 0,97 de máxima. Dichos quesos tenían un estado de maduración de dos a tres meses.

#### 4.3.2.2. Valores relacionados con la acidez.

##### 4.3.2.2.1. Determinación de pH.

Los valores que se han obtenido para el pH están reflejados en las tablas nº XIX y XX.

De la tabla nº III y de la tabla nº XX puede deducirse una disminución brusca del pH, que pasa de 5,99 en las cuajadas prensadas, a un valor medio de 5,94, al comenzar la maduración. A continuación puede observarse una elevación del pH, probablemente como consecuencia del consumo de ácido láctico por parte de los microorganismos. Dicha disminución inicial del pH, con el consiguiente aumento posterior a los quince días, es observada también por Núñez M. (1.978) en queso de Cabrales.

En nuestro trabajo, la disminución del pH al comienzo del proceso es extraordinariamente rápida, debido a la muy pronta desaparición de la lactosa, que no ha podido ser encontrada, ni en las cuajadas saladas, ni en los quesos analizados. Jiménez S. (1.978) sin embargo observa, una disminución mucho más lenta, justificable por la permanencia de la lactosa en el queso hasta el final de la maduración.

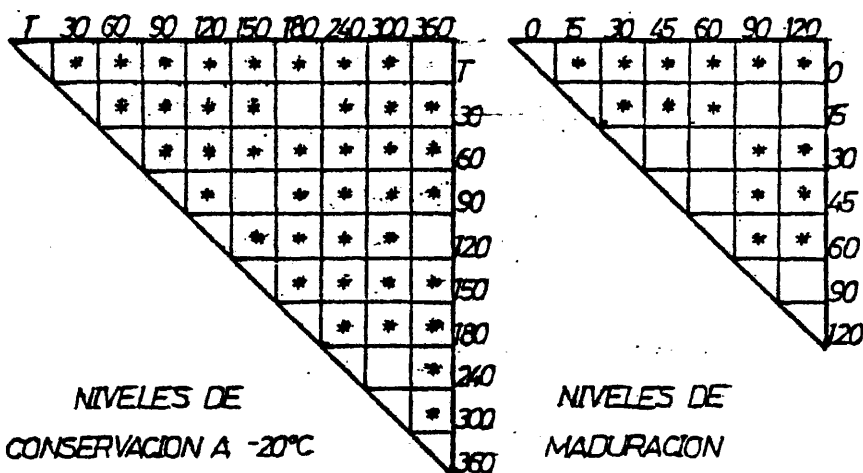
Puede observarse también unos valores de pH superiores en el caso de los lotes congelados, coincidentes con unos menores valores de acidez para estos lotes.

##### 4.3.2.2.2. Determinación de acidez.

Los resultados para la acidez vienen expresados en las tablas nº XXI y XXII.

	T-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
$\bar{X}$	5.98	6.04	6.07	6.03	6.06	6.02	6.01	6.02	6.04	6.06
M-0	4,9	4,6,8,9	4,6,8,9	6,8,9	4,9	2,3,9	4,9	2,3,9	4	4,9
	2,3,5,6	3	2,5,6	3	7	3	6,2	3,7	5	5
$\bar{X}$	6.05	6.08	6.10	6.01	6.02	6.07	6.11	6.07	6.02	6.04
M-15	3,8	3,8	3	3,8	3,8	3,8	3,8,10	10	3,8	3,7
	1,4,6	1,7	1,3,6,7	1,3,6,7	1,4,5,7	1,5,6	1,6	3,7	1	3,4,5,6
$\bar{X}$	6.05	6.21	6.06	6.21	6.04	6.09	6.11	6.02	6.05	6.06
M-30	2,4,7	4	2,4,7	2,7	2,4,7	2,4,7,9	4	2,4,7	2,4,6,7,10	2,4,7,8
	1,4,6	3	2,5,6	3	2	1,5,6	1,2,6,7	7	1	2,7
$\bar{X}$	5.96	6.10	6.09	6.02	6.12	6.05	6.15	6.01	6.08	6.06
M-45	3,8	3	1,4,6	3,5,10	9	3,4,9,10	3	1	5,6,10	4,6,9
	2,3,5	1,3	1,3	1,3,6,7	6	1,5,6	1,2,6,7	3,7	1	2,7
$\bar{X}$	6.06	6.15	6.15	6.03	6.16	6.22	6.16	6.07	6.02	6.08
M-60	1,4,10	3,5	2,5	1	2,3	3	3	3	3	1
	1,4,6	1,2,3,4	1,2,3,4	1,3,6,7	3	6	1,2,6,7	3,7	1	1,2,7
$\bar{X}$	5.92	6.16	6.14	6.14	6.00	6.20	6.01	6.01	6.07	6.05
M-90	8	3,4,6	2,4	3,4	7,9	2	5,10	1,9	5,8	7
	4	5	1,2,3,4	3	2	5	1,2	3,7	1	2,7
$\bar{X}$	6.01	6.11	6.11	6.10	6.06	6.03	6.06	6.09	6.08	6.04
M-120	4,7	4,5,7,9,10	4,5,7,9,10	3	2,3,4,8	4,7	5,10	4,5,7,10	2,3,4,7	2,3,4,8
	6	2,5	2,4	3	1	1,5,6	3	3	1	3,4,5,6

TABLA XIX.- EVOLUCION DEL pH A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

5.943    6.048    6.106    6.099    6.104    6.053    6.052

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 6.006    6.151    6.123    6.093    6.038    6.036    6.169    5.944    5.955    6.018

MEDIA GENERAL = 6.058

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VAJAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.3906E 00	6	0.6510E-01	194.444 **
COLUMNAS	0.7773E 00	9	0.8637E-01	257.963 **
INTERAC.	0.1301E 01	54	0.2409E-01	71.944 **
ERROR	0.2344E-01	70	0.3348E-03	
TOTAL	0.2492E 01	139		

b)

TABLA XX.- pH.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.

b) Análisis de varianza.

Durante el período de maduración del lote testigo, se puede observar que los valores de la acidez tienden a aumentar, bastante deprisa al principio, (0,35 a 0,40 y a 0,44), para luego estabilizarse hasta el final, en que ya no pueden apreciarse en general, grandes diferencias significativas, (tabla nº XXI)

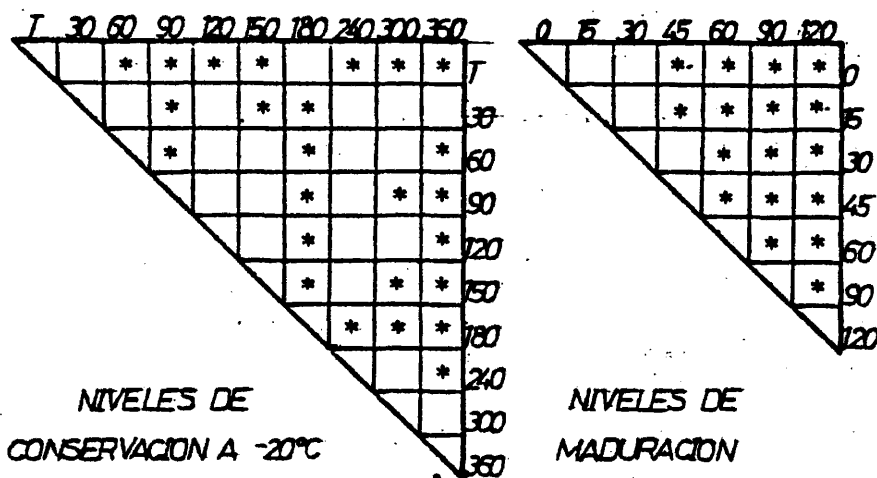
El lote testigo presenta diferencias significativas con el resto de los lotes, a excepción del C-180, (tabla nº XXII), y la media de dicho lote a lo largo de la maduración, supera las medias del resto de los lotes conservados a bajas temperaturas.

No hemos encontrado diferencias significativas entre los lotes antes de congelar, e inmediatamente después de la congelación.

Durante la maduración de los lotes congelados, puede observarse en la tabla nº XXI que de una forma global, los valores para la acidez aumentan a lo largo de ella, si bien este aumento es más lento al principio de la maduración, respecto de este mismo período en el lote testigo.

Las medias en los niveles de maduración tienden a aumentar y esto ha sido observado también por otros autores como: Manolkidis C. y col. (1.970 a,b) en queso Telemé; Lee J.Y. (1974) en queso Cheddar; Sozzi T. y col. (1.972) en queso Vacherin y Román M. (1.975), en queso Manchego. Todos estos autores observan en general un aumento de la acidez, coincidente con la disminución del pH, seguido de una caída para estabilizarse posteriormente. En nuestro trabajo, este descenso posterior no es observado ni en el lote testigo ni en los congelados.





MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

0.374    0.374    0.384    0.394    0.411    0.438    0.454

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 0.444    0.396    0.390    0.417    0.401    0.408    0.438    0.403    0.386    0.371

MEDIA GENERAL = 0.404

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VARIAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.1194E-00	6	0.1991E-01	83.556**
COLUMNAS	0.6796E-01	9	0.7551E-02	31.695**
INTERAC.	0.6915E-01	54	0.1261E-02	5.375**
ERROR	0.1668E-01	70	0.2383E-03	
TOTAL	0.2732E-00	139		

b)

TABLA XXII.- ACIDEZ.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.  
 b) Análisis de varianza.

#### 4.3.2.3. Modificaciones de las proteínas.

##### 4.3.2.3.1. Proteína total.

En la tabla nº XXIV se observa que no existe interacción entre los dos factores en estudio, respecto de la proteína total. La maduración actúa independientemente de la congelación y el efecto sobre dicha variable de cada uno de ellos, es independiente del otro.

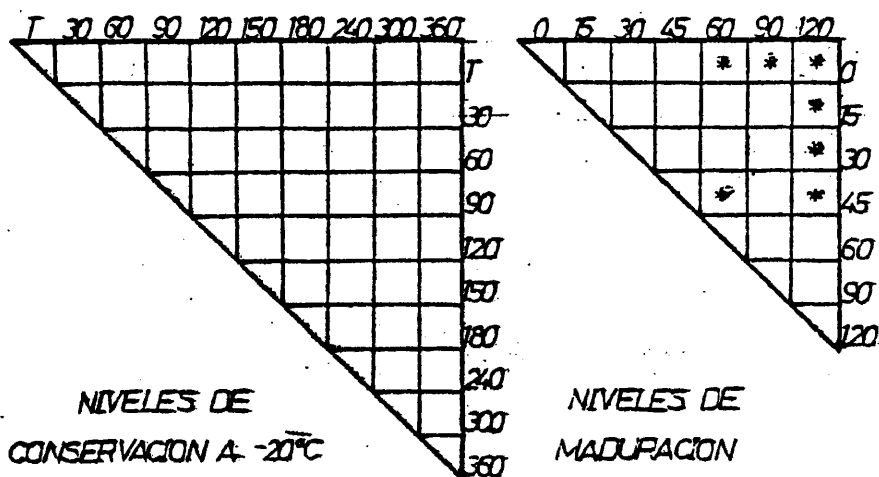
Los valores, tanto de Proteína total, como de Proteína soluble en ClNa al 5% se dan en  $N \times 6,38$ , considerándose que la mayor parte del nitrógeno está en forma de proteína.

De la tabla nº XXIV, se desprende que no existen diferencias significativas para ninguno de los lotes congelados, ni entre sí, ni con el testigo. Igualmente puede verse que existe un ligero aumento de los valores de proteína total para las medias de los niveles de maduración, si bien este aumento es muy pequeño y sólo llega a ser significativo a los 120 días, Dicho aumento es lógico, dada la pérdida de humedad de los quesos a lo largo de la maduración y ha sido encontrado por otros muchos autores: Park J.S. y col. (1.978) y Phelan J.A. y col. (1.973), en quesos Cheddar; Jiménez S. (1.978) en queso Manchego, etc... Tampoco se observan en dichas tablas diferencias significativas entre los resultados hallados para las cuajadas, recién descongeladas y antes de congelar.

Richards E. (1.967), no observa en quesos Cheddar variaciones significativas en el contenido de proteína total, cuando congela quesos maduros durante diferentes tiempos; sin embargo Jiménez S. (1.978), establece un ligero aumento para dicho

	T-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
I	18.76	17.46	20.62	17.65	17.32	19.42	19.45	21.39	19.01	20.19
M-0	ninguno	8, 8, 10	3, 4, 5	3, 8	3, 8, 10	ninguno	ninguno	2, 4, 5	ninguno	2, 5
I	20.61	19.57	25.00	19.90	19.43	20.11	19.67	17.96	19.05	21.33
M-15	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
I	20.57	17.06	19.35	20.48	21.68	19.77	18.76	19.86	20.16	22.70
M-30	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
I	21.17	20.00	17.93	18.34	21.97	19.72	20.14	19.33	19.15	21.31
M-45	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
I	22.40	19.51	21.04	20.81	22.28	20.16	22.67	21.41	22.81	23.40
M-60	ninguno	10	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	2
I	19.82	22.22	19.40	20.65	21.43	22.22	19.15	21.46	20.59	22.20
M-90	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
I	22.22	24.27	21.46	21.70	22.96	21.49	22.09	21.36	21.60	22.30
M-120	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
										ninguno

TABLA XXIII.- EVOLUCION DE LA PROTEINA TOTAL A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS, EXPRESADA EN % (N=6.38)



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

19.123    20.287    20.237    19.313    21.660    20.921    21.346

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 20.311    20.071    20.674    19.935    21.169    20.471    20.279    20.686  
 20.317    21.921

MEDIA GENERAL = 20.628

ANALISIS DE VARIANZA

F. VAZAC.	SUM. CUAD.	G.L.	MED. CUAD.	F
FILAS	0.1456E 03	6	0.2427E 02	9.344 ***
COLUMNAS	0.4349E 02	9	0.4832E 01	1.661
INTERAC.	0.2097E 03	54	0.3884E 01	1.335
ERROR	0.2036E 03	70	0.2908E 01	
TOTAL	0.6074E 03	139		

b)

TABLA XXIV.- PROTEINA TOTAL.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.

b) Análisis de varianza.

contenido a lo largo de los tiempos de conservación.

#### 4.3.2.3.2. Proteína soluble en cloruro sódico al 5%.

Los valores encontrados para este índice vienen expresados en las tablas nº XXV y XXVI. Los porcentajes hallados para la cantidad de proteína soluble/proteína total se expresan en las tablas nº XXVII y XXVIII y en las figuras nº 16, 17 y 18.

En el lote madurado directamente, puede observarse una tendencia al aumento en el índice proteína soluble/proteína total, si bien este aumento no es significativo hasta los noventa días de maduración, en que se alcanza un valor de 29,14%

El lote testigo se diferencia significativamente sólo de los lotes C-30, C-90, C-150, C-180 y C-360, aunque todos los lotes congelados presentan una media superior a la de éste, a excepción del C-360, cuya media de maduración está por debajo del testigo.

A pesar de que todos los lotes congelados (excepto el C-360), tengan globalmente un valor de Proteína soluble/proteína total superior al del testigo, la transformación de dicha proteína a lo largo de la maduración en estos lotes es extraordinariamente lenta, como se deduce de la tabla nº XXVII en la que se puede apreciar que a partir de los 60 días de conservación, todos los lotes conservados durante más tiempo, no presentan prácticamente diferencias a lo largo de la maduración para cada uno de ellos.

Coppens R. (1.968) en congelación de cuajadas de tipo Camembert, observa que en almacenamientos a  $-15^{\circ}\text{C}$ , la proteoli-

	T-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
I	1,12	1,50	1,17	1,96	2,92	4,05	4,68	4,52	4,75	1,89
H-0	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
	6	φ-2	3,5,6,7	ninguno	5,7	6,7	ninguno	ninguno	2,3	ninguno
I	4,22	1,16	1,90	5,16	1,94	4,54	4,84	4,97	1,11	1,27
H-15	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
	ninguno	φ-1	3,7	ninguno	7	6,7	ninguno	ninguno	φ-3	ninguno
I	2,81	5,12	6,62	5,51	4,12	5,09	5,16	4,69	1,21	1,42
H-30	2,3,4,6,7	1	1,5,9,10	1,10	3	1	1	ninguno	3	3,4
	6,7	1,2	1,2,4	ninguno	7	6	ninguno	ninguno	1,5	ninguno
I	1,16	5,30	1,74	4,92	5,24	4,56	4,97	4,83	1,63	1,50
H-45	2,5	1,10	ninguno	ninguno	1	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	2
	6	1,2	3,5,7	ninguno	ninguno	6,7	ninguno	ninguno	2	ninguno
I	4,11	5,80	5,42	6,11	5,65	5,11	6,50	4,28	5,20	1,43
H-60	2,4,5,7	1,8,10	10	1,8,10	1,10	10	1,8,10	2,4,7	10	φ-1,8
	ninguno	1,2	1,4	ninguno	1	6	ninguno	ninguno	2,3	ninguno
I	5,77	5,94	5,15	6,05	4,84	7,41	5,91	5,24	4,38	1,74
H-90	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	9,10	ninguno	ninguno	6	6
	1,4,5	1,2	1	ninguno	ninguno	φ-7	ninguno	ninguno	2	ninguno
I	5,40	5,70	6,35	5,81	6,87	6,73	6,38	5,14	4,58	1,86
H-120	φ-2,4,8	5,6,9,10	1,8,9,10	5,6,9,10	φ-3,6,7	φ-3,5,7	1,8,9,10	3,5,6,7,10	φ-8	φ
	1	1,2	1,2,4	ninguno	1,2,3	1,2,4	ninguno	ninguno	2	ninguno
										↑ todos

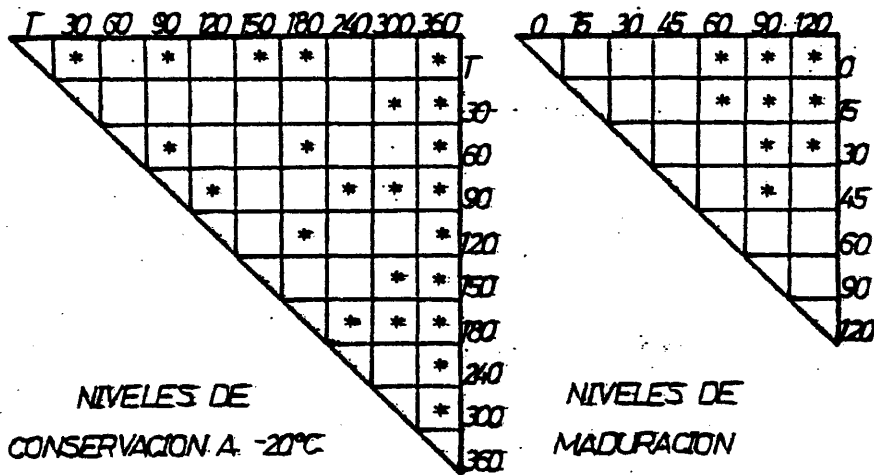
TABLA XXV.- EVOLUCION DE LA PROTEINA SOLUBLE EN CINA (5%) A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES, EXPRESADO EN %. (N=6,36)



	T-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
I H-0	19,77 ninguno 6	20,04 ninguno ninguno	16,32 ninguno 5,6,7	24,44 ninguno ninguno	16,28 ninguno ninguno	20,86 ninguno 6	24,00 ninguno ninguno	21,21 ninguno ninguno	25,00 ninguno 2	19,34 ninguno ninguno
I H-15	20,42 ninguno ninguno	17,35 ninguno 3,4,5	19,50 ninguno 7	26,95 ninguno ninguno	20,44 ninguno ninguno	22,38 ninguno ninguno	24,62 ninguno ninguno	28,01 ninguno ninguno	16,33 ninguno 1	15,25 ninguno ninguno
I H-30	19,44 2 ninguno	20,00 1,5,9,10 3	21,01 ninguno ninguno	27,00 10 ninguno	18,28 3,7 ninguno	25,81 10 ninguno	27,68 5,9,10 ninguno	21,61 ninguno ninguno	18,55 2,7 ninguno	15,01 2,4,6,7 ninguno
I H-45	15,71 2,4 6	27,50 1,30 3	20,89 ninguno 7	27,21 1,10 ninguno	24,86 ninguno ninguno	23,12 ninguno ninguno	24,72 ninguno ninguno	24,99 ninguno ninguno	24,20 ninguno ninguno	16,91 2,4 ninguno
I H-60	18,19 2,4,7 6	29,74 1,8,10 2	25,75 1 1	39,42 1,8,10 ninguno	25,34 10 ninguno	25,10 10 ninguno	28,67 1,10 ninguno	19,98 2,4 ninguno	21,00 ninguno ninguno	14,67 2,3,4,5,6,7 ninguno
I H-90	29,14 ninguno 1,4,5	26,69 ninguno ninguno	27,02 ninguno 1	29,20 ninguno ninguno	22,60 ninguno ninguno	31,42 10 3	30,92 10 ninguno	24,41 ninguno ninguno	21,31 ninguno ninguno	17,00 6,7 ninguno
I H-120	24,17 6,10 ninguno	21,56 3,5,6,10 ninguno	28,60 2,8,9,10 3,2,4	26,76 10 ninguno	20,00 2,8,9,10 ninguno	31,17 1,2,8,9,10 ninguno	29,00 8,9,10 ninguno	23,04 3,5,6,7 ninguno	21,25 3,5,6,7 ninguno	17,10 8,9 ninguno

↑ todos

Tabla XXVII.- EVOLUCION DE LA RELACION PROTEINA SOLUBLE/PROTEINA TOTAL A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

20.432 21.151 21.847 23.017 23.998 26.184 25.536

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

20.746 25.036 23.158 27.014 22.643 26.011 27.091 23.470

a) 21.379 16.506

MEDIA GENERAL = 23.305

ANALISIS DE VARIANZA

F. VAJAC.	SUM. CUAD.	G.L.	MED. CUAD.	F
FILAS	0.5394E 03	6	0.8990E 02	12.154**
COLUMNAS	0.1335E 04	9	0.1484E 03	20.060**
INTERAC.	0.1137E 04	54	0.2105E 02	2.846**
ERROR	0.5178E 03	70	0.7396E 01	
TOTAL	0.3529E 04	139		

b)

TABLA XXVIII.- RELACION P. SOLUBLE/P. TOTAL.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.

b) Análisis de varianza.

sis no sigue su curso normal, y Ottogalli G. y col. (1.973) en queso Gorgonzola llegan a la conclusión de que cuando las técnicas de congelación, se aplican a quesos en estadíos cortos de maduración, éstos presentan niveles de proteolisis superiores a lo normal, (mayores niveles de N soluble y aminoácidos).

No se observan tampoco diferencias significativas para el índice estudiado, entre las cuajadas antes de congelar y después de congeladas, si bien los valores ligeramente superiores en el caso de los lotes conservados a bajas temperaturas, indicarían un cierto grado de proteolisis por el cuajo, durante el período de conservación. Estos resultados coinciden con los encontrados por Jiménez S. (1.978), así como el hecho de que las cuajadas congeladas durante 360 días presenten valores de proteína soluble/proteína total, inferiores al resto de los lotes y al testigo.

La degradación proteica a lo largo de la maduración global de todos los lotes, mucho más lenta en los congelados que en el testigo, queda expresada por el aumento de las medias en los niveles de maduración (tabla nº XXVIII), observándose diferencias significativas entre los primeros días de maduración y los últimos.

Dicho aumento en los niveles de proteína soluble/proteína total ha sido demostrado también por otros investigadores, como: Park J.L. y col. (1.975 y 1.978) y Lee J.Y. (1.974) en queso Cheddar; Lim J.W. y col. (1.979) en queso Edam; Manolkidis C. y col. (1.970 a y b) en queso Telemé; Fernández Salguero J. y col. (1.977) en quesos de los Pedroches; Ordóñez J.A. y col. (1.980 b) en queso Roncal; Ordóñez J.A. y col. (1.977 a) en que-

so Ulloa y Burgos J. y col. (1.971) en queso Ulloa.

Los valores obtenidos por nosotros para el índice proteína soluble/proteína total, son similares a los obtenidos por otros autores en queso Manchego: Marcos A. y col. (1.976 c); Ordóñez J.A. y col. (1.978 a y b); Ramos M. y col. (1.976); mientras que los obtenidos por Román M. y col. (1.975), para este mismo queso son algo inferiores.

#### 4.3.2.3.3. Determinación de la degradación caseínica: relación $\beta/\alpha_s$

Los electroforegramas caseínicos y sus correspondientes perfiles densitométricos, aparecen en las figuras nº 23-32.

Los valores obtenidos en porcentaje, como medida de las áreas delimitadas por el perfil densitométrico, para las  $\alpha_s$ -caseínas,  $\beta$ -caseínas y pre  $\alpha_s$ -caseínas, se expresan en la tabla nº XXIX. En dicha tabla, quedan también reflejadas las relaciones  $\beta/\alpha_s$ , que expresan la degradación caseínica y sus correspondientes significaciones estadísticas, obtenidas mediante el análisis de varianza. En la tabla nº XXX se expresan las diferencias significativas existentes entre los diferentes niveles de maduración y congelación.

De dichas tablas y figuras se desprende que en el lote testigo, existe un aumento en la relación  $\beta/\alpha_s$ , que se da lentamente a lo largo de la maduración. Dicho aumento se debe a la degradación progresiva de las caseínas  $\alpha_s$  y principalmente de la fracción  $\alpha_{s1}$ , la cual aparece en la cuajada y no vuelve a aparecer a lo largo de todo el proceso. Ésto da como resultado la

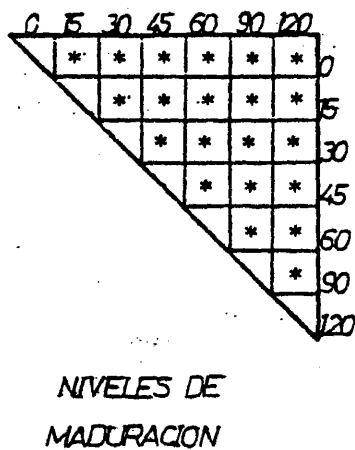
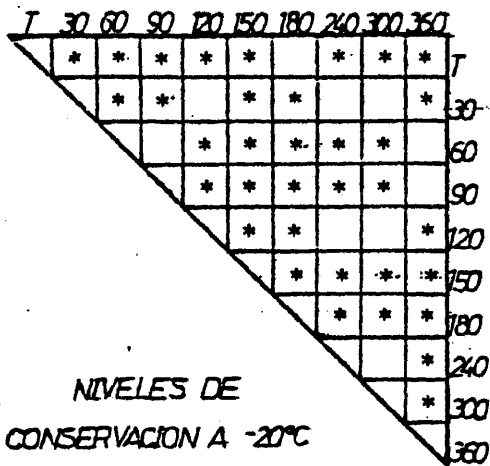
	C-10	C-60	C-90	C-120
M-0	21.00 5000 1.02 1.01 5000 5000 1.11 5.8 5948 5900 1.02 5.8 5954 4905 1.08 4.567			
M-15	4312 5688 1.12 3.5,7 5000 5000 1.11 4.7 4224 5726 1.12 3.56,10 5000 5000 1.00 4.479			
M-30	1455 2002 4641 1.02 3.67 1.02 1733 2643 4623 1.27 4.910 3750 6250 1.0 3.2,1 4743 5226 1.11 1.3567 5565 4444 0.80 4.8 4.1			
M-45	2580 2770 4650 1.08 1.50,10 1893 3225 4582 1.30 3.10 3945 6312 1.6 1.2, 5000 5000 1.00 2.567			
M-60	2991 2393 4615 1.03 4.7 2235 3294 4470 1.36 1.4567 4900 6000 1.50 1.456 3235 6765 2.00 4.15 3000 6910 2.23 4.4			
M-80	2432 2027 5540 2.73 6.8 1709 2906 5385 1.85 7.9 3846 615 2.791 1.2, 2453 5094 2.08 1.2,1 3064 2182 5454 3.50 8.8			
M-120	2245 2030 5714 2.80 3.7 1951 8049 1.12 6.7 2478 2475 5146 2.11 4.4 1481 2083 6250 1.00 2.447			

↑ = todos

TABLA XXIX.- EVOLUCION DE LA RELACION  $\beta/\alpha$  A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS.

	C-180		C-180		C-180		C-180		C-180		C-180		C-180		C-180	
	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105	105
M-0	4972 5228	1.05	1430 5170	1.16	5025 4725	0.72	4972 5228	1.18	4750 5250	1.10	4750 5250	1.10	4750 5250	1.10	4750 5250	1.10
		5.8		5.8		0.5		5.8		5.8		5.8		5.8		5.8
		0.2		0.2		0.1		0.2		0.2		0.2		0.2		0.2
M-15	4720 5240	1.10	3872 6128	1.58	4680 5320	1.14	4367 5633	1.22	4727 5273	1.11	4727 5273	1.11	4727 5273	1.11	4727 5273	1.11
		4.7		4.7		7		4.7		4.7		4.7		4.7		4.7
		0.1		0.1		0.2		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1
M-30	3721 6279	1.09	3750 6250	1.07	5000 5000	1.00	4367 5633	1.20	4645 5355	1.12	4645 5355	1.12	4645 5355	1.12	4645 5355	1.12
		0.3		0.3		0.1		0.3		0.3		0.3		0.3		0.3
		0.4		0.4		0.5		0.4		0.4		0.4		0.4		0.4
M-45	3541 6458	1.02	3555 6444	1.01	3846 6154	1.06	4286 5714	1.13	4128 5872	1.11	4128 5872	1.11	4128 5872	1.11	4128 5872	1.11
		1.7		1.7		0.1		1.7		1.7		1.7		1.7		1.7
		0.1		0.1		0.4		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1
M-60	2425 2105 6460	1.00	3550 6300	1.00	3870 6130	1.05	4286 5714	1.13	4127 5873	1.10	4127 5873	1.10	4127 5873	1.10	4127 5873	1.10
		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1
		0.1		0.1		0.4		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1
M-90	2308 2308 6526	1.02	1379 3103 5177	1.28	1413 2258 6129	2.21	2000 2222.2228	1.20	4122 5922	1.10	4122 5922	1.10	4122 5922	1.10	4122 5922	1.10
		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1
		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1
M-120	3721 1428 4857	1.10	2222 1587 6190	1.20	1645 2005 6150	1.12	2400 8400	1.10	1700 2300 6000	2.00	1700 2300 6000	2.00	1700 2300 6000	2.00	1700 2300 6000	2.00
		3.4		3.4		0.1		3.4		3.4		3.4		3.4		3.4
		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1		0.1

CONT.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

1.028    1.202    1.330    1.502    1.825    2.222    3.073

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 1.873   1.701   1.534   1.540   1.689   2.136   1.957   1.703   1.661   1.466

MEDIA GENERAL = 1.726

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VAIA.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.5900E 02	6	0.9833E 01	1163.042**
COLUMNAS	0.5442E 01	9	0.6046E 00	71.519**
INTERAC.	0.1698E 02	54	0.3145E 00	37.196**
ERROR	0.5918E 00	70	0.8454E-02	
TOTAL	0.8701E 02	139		

b)

TABLA XXX.- RELACION  $\beta/\alpha$

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.  
 b) Análisis de varianza.

aparición de tres ó cuatro bandas de mayor movilidad electroforética y menor pM que las caseínas  $\alpha_s$  en una región situada delante de éstas, denominada región pre  $\alpha_s$ .

No existe degradación aparente de la  $\beta$  - caseína, en ninguno de los lotes a lo largo de la maduración, ya que no pueden detectarse bandas en la región post- $\beta$ .

La degradación caseínica tal como apareció en los electroforegramas, queda expresada por las distintas intensidades de tinción dibujadas en los esquemas, que representan dichas bandas en el acetato de celulosa.

Cuando se observan los electroforegramas, y sus correspondientes perfiles densitométricos en los lotes congelados, así como las medias obtenidas a lo largo de la maduración de la relación  $\beta/\alpha_s$ , para dichos lotes, en la tabla nº XXX puede verse que dichas medias son inferiores a la media obtenida para el lote testigo, excepto en el caso de los lotes C-150 y C-180.

Al observar dichos valores en la tabla nº XXX se ve que el lote C-30, si bien se diferencia significativamente del testigo con una media menor, no presenta demasiadas diferencias en los electroforegramas a lo largo de la maduración con una degradación de la caseína  $\alpha_{s1}$ , desde el principio del proceso (de saparece a los 30 días); aparición de las bandas pre  $\alpha_s$  ya en este momento y una degradación más profunda de la fracción caseínica  $\alpha_s$  a los 120 días de maduración, en que la relación  $\beta/\alpha_s$  aumenta de 1,85 a 4,12. En dicho momento, las fracciones pre  $\alpha_s$  aparecen también muy degradadas.

Si se aumenta el tiempo de conservación, puede observarse una tendencia a la desaparición más tardía de la banda  $\alpha_3$  respecto del lote testigo y el congelado de treinta días (C-30). En el lote C-60, a pesar de existir diferencias significativas en el aumento de la relación  $\beta/\alpha_3$ , a partir de los 30 días no se han podido detectar más que trazas en la región pre  $\alpha_3$  apareciendo únicamente bandas en dicha región, a los 120 días de maduración en que el aumento de la relación  $\beta/\alpha_3$  es de 1,60 a 2,16.

Los lotes C-90, C-120, poseen unos perfiles densitométricos medidos a lo largo de la maduración, muy similares, con una media de la degradación caseínica, a lo largo de este proceso inferior a la del lote testigo.

Hemos obtenido, sin embargo, para los lotes C-150 y C-180, una degradación de la fracción  $\alpha_3$ , comparativamente mayor, respecto del testigo. Estos lotes, que presentan medias de maduración, superiores a dicho lote, sufren una degradación de la caseína, desde el principio (30 y 15 días respectivamente), si bien no pueden detectarse bandas medibles en la región pre  $\alpha_3$  hasta los 60 y 90 días. La degradación obtenida al final, es comparativamente mayor que en el caso del lote testigo (3,40 y 3,90 frente a 2,80), siendo diferente significativamente de él, en el caso del lote C-180.

El aumento en el tiempo de conservación C-240, C-300 y C-360 produce ya sin embargo, una disminución de la caseinólisis, en relación con el lote testigo, estando las medias a lo largo de la maduración, por debajo de éste y observándose de las figuras 30, 31 y 32 y de las tablas, que la degradación aparentemente, si bien empieza a ocurrir a los 45 días (lotes 240 y 360)

no se hace muy patente, con aparición de bandas de degradación en la región pre- $\alpha_s$  hasta los 90 y 120 días.

De la tabla nº XXX se deduce que la proteólisis de la caseína, aumenta durante la maduración en general, apareciendo las medias para cada uno de los niveles de maduración, en orden creciente desde el principio hasta el final de este proceso.

Al comenzar la maduración, la  $\beta$  caseína y  $\alpha_s$  caseína, se encuentran en proporciones aproximadamente iguales. Esto coincide con los resultados de Fernández Salguero.J. (1.975). El hecho de que a lo largo de la maduración, la  $\beta$  caseína sea más resistente a la hidrólisis que la  $\alpha_s$ , ha sido observado también en variedades duras y semiduras de pH bajo, por Lindquist B. y col. (1.957); en quesos suizos, Brick y Cheddar por Ledford, R.A y col. (1.968); en el queso Gouda por Creamer L.K. (1.970); Visser, F.M.W. y col. (1.977); Shindo K. y col. (1.976) y en queso Cheddar por Edwards J.L. y col. (1.969), Fox P.F. (1.969), O'Keefe R.B. y col. (1.976 b) Park, J.L. y col. (1.975). En el queso Tilsitt por Klepacka H. (1.978). En quesos españoles: Ramos M. y col. (1.976), no observan en la maduración del queso Manchego, ninguna degradación aparente de la  $\beta$ -caseína, incluso hasta el décimo mes, cuando los quesos se fabrican exclusivamente con leche de oveja, mientras que en los de vaca, la  $\beta$ -caseína comienza a degradarse a partir del 4º mes. A los mismos resultados llega Marcos, A. y col. (1.976 d). Ordóñez J.A. y col. (1.978 a) en quesos Manchegos almacenados en aceite de oliva, encuentran que la digestión de la  $\alpha_s$ -caseína progresa hasta reducirse al 80% al finalizar la maduración; sin embargo el 90% de la  $\beta$ -caseína permanece intacta al final del proceso. Después de 3 ó 4 meses, las caseínas pre- $\alpha_s$  constituyen el 20% de la

caseína total. Estos resultados coinciden con los encontrados en este trabajo, ya que dichas proporciones son halladas en muchos lotes a los 120 días de maduración.

#### 4.3.2.4. Determinación de grasa .

Los resultados se encuentran reflejados en las tablas nº XXXI y XXXII.

En dichas tablas puede verse que no existen diferencias significativas importantes para ninguno de los lotes, a excepción del lote C-300, que se diferencia significativamente de todos los demás. No hay diferencias a lo largo de la maduración, entre el lote madurado directamente y los lotes congelados.

Si se observan en la tabla nº XXXII, las medias para los diferentes niveles de maduración, puede verse que existe un aumento de las mismas a lo largo de este proceso, y que este aumento varía significativamente de unos días de maduración a otros.

La evolución creciente en los valores encontrados para la grasa a lo largo de la maduración, es normal, dada la progresiva pérdida de humedad del queso y está de acuerdo con las experiencias realizadas por otros autores. Dichos valores están dentro de los límites encontrados para estos tipos de queso: Compaifé C. y col. (1.979) y para otros, como el queso Téléme, en donde Manolkidis C. y col. (1.970 a y b) encuentran un aumento de la materia grasa, a lo largo de la maduración. Lo mismo encuentran Kim Y.K. y col. (1.975), en la maduración del queso Brick

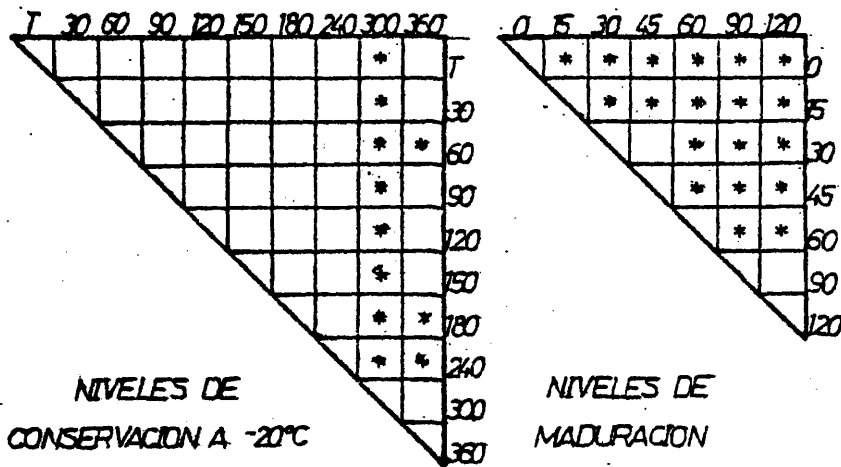
#### 4.3.2.5. Contenido en ácidos grasos.

Los valores obtenidos en el análisis del contenido de

	C-9	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
Σ M-0	21.97 φ-9	26.11 1,3,5	29.88 1,2,8	38.02 1	50.31 1,2,9	57.21 1	58.55 1	57.76 1	51.42 3,5	27.03 1
Σ M-15	22.44 ninguno	31.24 ninguno	32.00 ninguno	33.19 10	31.68 ninguno	33.19 10	38.96 10	33.61 10	34.01 10	29.75 4,6,7,8,9
Σ M-30	26.52 2,4,6,10	31.01 1	36.04 6,10	32.52 1,7	33.22 ninguno	31.93 1,3,7,9	36.41 4,6,10	34.65 10	35.76 6,10	30.00 1,3,7,8,9
Σ M-45	25.99 9,10	34.00 10	34.09 10	34.95 9,10	34.95 9,10	35.85 9,10	34.72 9,10	32.61 ninguno	31.15 ninguno	30.00 φ-8,9
Σ M-60	26.35 4,8	35.37 3,9	36.01 φ-1,6	34.46 1,3,9	35.34 3,9	35.95 9	35.54 3,9	35.38 3,9	30.15 φ	35.17 3,9
Σ M-90	24.50 3	37.85 9	39.13 1,9	37.47 9	36.65 9	38.85 9	35.36 ninguno	37.92 9	31.97 φ-1,7	38.25 9
Σ M-120	28.02 ninguno	32.23 ninguno	34.16 10	39.16 ninguno	37.03 ninguno	34.57 10	37.66 ninguno	38.93 ninguno	36.05 10	41.74 3,6,9
	φ	1,2,3,4	1,5,6	φ-6	1,2	1	1	φ-6	1,4,5,6	φ

φ=todos

TABLA XXXI.- EVOLUCION DE LA GRASA A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

37.202    37.509    34.029    33.834    35.246    36.817    37.678

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

33.767    33.836    34.792    34.795    34.165    33.942    34.601    34.412  
 37.105    33.136

a)

MEDIA GENERAL = 33.905

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VARIAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.1423E 04	6	0.2371E 03	268.015**
COLUMNAS	0.7844E 02	9	0.8715E 01	9.850**
INTERAC.	0.4758E 03	54	0.8811E 01	9.958**
ERROR	0.6194E 02	70	0.8848E 00	
TOTAL	0.2039E 04	139		

b)

TABLA XXXII.- GRASA.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.  
 b) Análisis de varianza.

ácidos grasos libres en cada una de las muestras analizadas se expresan en las tablas XXXIII y XXXIV y figuras 19, 20 y 21

En el lote madurado directamente, se observa un aumento de dicho contenido a lo largo de la maduración, si bien este incremento es muy escaso (0,45 a 0,52), sin apenas diferencias significativas en cada uno de los valores obtenidos a lo largo de la maduración (tabla XXXIII).

El lote testigo se diferencia significativamente de casi todos los demás, (a excepción del C-30; C-300 y C-360).

Los lotes congelados presentan medias superiores al lote testigo y significativamente superiores en el caso del C-90, C-120, C-150 y C-180.

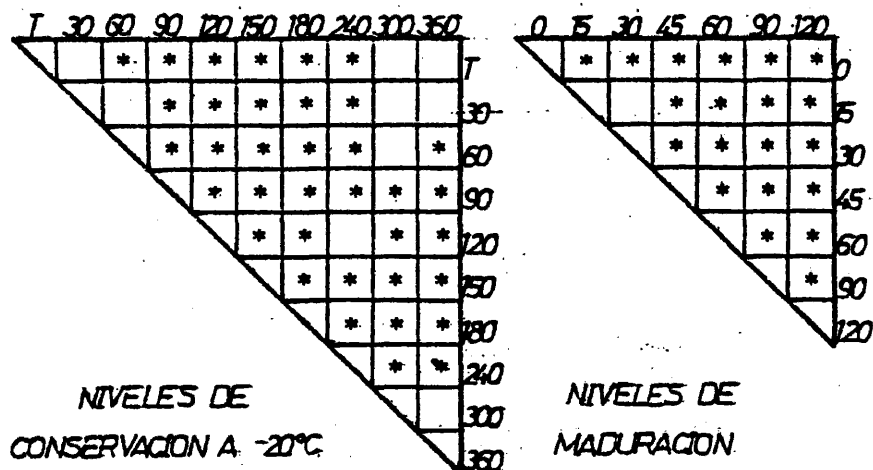
No existen diferencias significativas entre las cuajadas antes de congelar y recién descongeladas, lo que indica que no ha habido prácticamente lipólisis en este período.

Cuando se observan las medias obtenidas para los distintos niveles de maduración, puede verse que existe un aumento progresivo de dichas medias, siendo este aumento más significativo a partir de los 30 días de maduración y hasta el final. Ahora bien, el contenido en ácidos grasos libres en nuestra experiencia, alcanza valores muy bajos y su aumento a lo largo de la maduración, no es tampoco muy grande. Las medias obtenidas para cada uno de los niveles de maduración (tabla nº XXXIV), aumentan relativamente poco (0,416-0,836), incluso en aquellos lotes congelados que más se diferencian del testigo (C-90, C-120, C-150 y C-180). El grado de estas transformaciones en nuestra experien-

	T-0	C-30	C-60	C-90	C-120	C-150	C-180	C-240	C-300	C-360
$\bar{X}$	0.45	0.12	0.40	0.44	0.15	0.40	0.31	0.52	0.48	0.40
M-0	ninguno	8	ninguno	ninguno	8	ninguno	8	2,5,7	ninguno	ninguno
	ninguno	↖-2	5,6,7	6,7	↖-2	↖-2	↖	2,6	2,3,5,7	4,6,7
$\bar{X}$	0.32	0.17	0.40	0.32	0.34	0.48	0.65	0.75	0.40	0.32
M-15	6,7,8	6,7,8	6,7,8	6,7,8	6,7,8	↖	↖	↖	6,7,8	6,7,8
	ninguno	6,7	5,6,7	5,6,7	↖-1	4,5,6,7	↖-3	1	1,4,6,7	4,6,7
$\bar{X}$	0.36	0.41	0.38	0.46	0.51	0.57	0.61	0.66	0.32	0.40
M-30	5,6,7,8	7,8	6,7,8	7,8	1	1,3,9,10	↖-5,7,8	↖-5,6,7	6,7,8	6,7,8
	4,7	1,7	5,6,7	6,7	↖-4	↖-2	↖-2	ninguno	1,4,6,7	4,6,7
$\bar{X}$	0.51	0.45	0.37	0.44	0.58	0.72	0.91	0.67	0.51	0.47
M-45	3,6,7,8	5,6,7,8	↖-2,4,10	5,6,7,8	2,3,4,6,7	↖-8	↖	↖-5,6	3,6,7,8	6,7,8
	3	1,7	5,6,7	6,7	↖-3	↖-5	↖	ninguno	2,3,6,7	↖-6
$\bar{X}$	0.47	0.44	0.58	0.72	0.81	0.81	1.24	0.68	0.40	0.38
M-60	↖-2,9,10	↖-1,9,10	↖-8	↖-8	↖-6	↖-5	↖	↖-3,4	↖-1,2,10	↖-1,2,9
	ninguno	1,7	↖-6	2,7	↖-6	↖-4	1,2,3,4	ninguno	1,4,6,7	4,6,7
$\bar{X}$	0.47	0.49	0.69	0.78	0.89	1.11	1.20	0.70	0.52	0.45
M-90	↖-2,9,10	↖-1,9,10	↖-8	↖-4,5,8	↖-4	↖-7	↖-6	↖-3,4	↖-1,2,10	↖-1,2,9
	ninguno	1,2,7	1,2,3,4	1,2,3,4	↖-5	↖-7	1,2,3,4	1	2,3,5,7	↖-4
$\bar{X}$	0.52	0.76	0.72	1.09	1.13	1.10	1.11	0.66	0.62	0.62
M-120	↖-9,10	↖-3,8	1,4,5,6,7	↖-5,6,7	↖-4,6,7	↖-4,5,7	↖-4,5,6	1,4,5,6,7	2,4,5,6,7	2,4,5,6,7
	3	↖	↖-6	↖-6	↖	↖-6	1,2,3,4	ninguno	↖	↖

↖ todos

TABLA XXXIII.- EVOLUCION DE LOS ACIDOS GRASOS LIBRES A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS.



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

0.416    0.457    0.482    0.564    0.658    0.730    0.836

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 0.452   0.466   0.506   0.619   0.666   0.746   0.869   0.674   0.475   0.445

MEDIA GENERAL = 0.592

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VAJAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.2900E 01	6	0.4833E 00	355.097**
COLUMNAS	0.2674E 01	9	0.2971E 00	218.292**
INTERAC.	0.2105E 01	54	0.3897E-01	28.635**
ERROR	0.9528E-01	70	0.1361E-02	
TOTAL	0.7774E 01	139		

b)

TABLA XXXIV.- ACIDOS GRASOS LIBRES.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.  
 b) Análisis de varianza.

cia es relativamente pequeño y ésto concuerda con los estudios de Román M. (1.975), quien observa en queso Manchego, un aumento en el índice ácido de la materia grasa de 0,6 a 1,4, a los 90 días de maduración. Jiménez S. (1.978), que encuentra un contenido de ácidos grasos libres superior al obtenido por nosotros (1,15--3,79 a los 100 días), concluye también que el grado de lipólisis en este queso es bastante bajo.

#### 4.3.2.6. Determinación de la dureza.

Los resultados se expresan en las tablas XXXV y XXXVI

En el lote testigo se constata un aumento progresivo de la dureza a lo largo de la maduración (0,73-1,10), aumento sin embargo, no significativo hasta los 90 días (1,13). Jiménez S. y col. (1.979) en queso tipo Manchego, encuentran un valor de 1,10 a los tres meses de maduración.

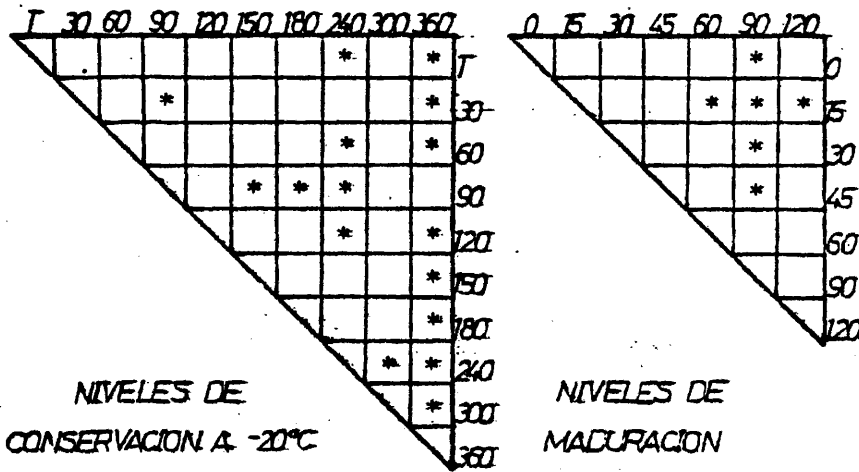
No se observan diferencias significativas apreciables en cuanto a la dureza, entre los lotes antes de congelar y después de descongelar, a excepción de los lotes C-90 y C-120 que presentan valores superiores al descongelar las cuajadas. Estos resultados son también coincidentes con los encontrados por Jiménez S. y col. (1.979), ya que en quesos congelados durante un mes a -20°C, observan un ligero aumento de la dureza, durante el período de conservación.

No existen sin embargo diferencias significativas muy importantes entre el lote testigo y los lotes congelados, a excepción del lote C-360 que se diferencia de todos con un valor muy superior, y del C-90 con un valor inferior (tabla XXXVI). Todos los demás lotes conservados a baja temperatura, presentan

	3-0	0-30	0-60	0-90	0-120	0-150	0-180	0-240	0-300	0-360
I	0.21	0.27	0.86	1.11	1.21	0.98	0.95	0.96	0.70	0.96
H-0	4,5 6	4,5 6	5 5,7	1,2,9 4	1,2,3,9 5	ninguno 7	ninguno 5,6	ninguno 4,7	4,5 4,7	ninguno ninguno
H-15	0.21	0.27	0.72	0.92	0.70	0.84	0.86	0.76	0.72	1.01
	3,5,8,9 ninguno	5,10 6	1,4,10 4,5,6,7	1,2,10 ninguno	3,5,8 1,3,5,6	4,5,10 4	4,5,10 ninguno	1,4,10 1,7	1,4,10 7	1,4 ninguno
H-30	0.21	0.27	0.75	1.12	0.98	0.94	1.02	0.64	1.00	1.08
	ninguno ninguno	4 6	4 4,5,6,7	2,3,8 4	ninguno 1,2,4	ninguno 7	8 5,6	4,7,10 1,4,7	ninguno ninguno	8 ninguno
H-45	0.26	0.76	0.94	0.71	0.71	1.04	1.01	0.85	1.07	1.10
	2,4,5 ninguno	4,5,8 6	3,4,5 2,3,5,7	2,3,8 2,3,6	2,4,8 1,3,5,7	2,4,5,8 2,6,7	2,4,5,8 5,6	6,7,9,10 3,7	2,4,5,8 2	2,4,5,8 ninguno
H-60	0.28	1.00	1.31	0.92	1.14	0.91	1.20	0.70	0.88	1.22
	3,5,10 ninguno	3,7,8,10 6	5,10 4	3,5,7,8,10 ninguno	2,3,10 2,4,7	3,5,7,8,10 7	1,8,9 1,3,4	1,7,9 1,7	3,5,10 ninguno	3,5 ninguno
H-90	1.12	1.11	0.95	1.22	1.05	0.86	0.60	0.76	0.98	1.11
	7,8 1	7,8,9 4	2 2,3,5	6,7,8 4	7 1,2,4,7	2,4 4	1,2,4,5,10 1,3,7	1,2,4,10 1,7	2 ninguno	7,8 ninguno
H-120	1.12	0.91	1.09	0.97	0.84	0.82	0.85	1.06	1.20	1.01
	ninguno ninguno	ninguno 6	ninguno 4	ninguno ninguno	ninguno 1,5,6	ninguno 1,3,4,5	ninguno ninguno	ninguno 4	6 1,2	ninguno ninguno

TABLA XXIV.- EVOLUCION DE LA PUREZA A LO LARGO DE LA MADURACION DE LOS DIFERENTES LOTES CONSERVADOS.

↑ todos



MEDIAS DE NIVELES DE MADURACION.

0.927    0.855    0.925    0.917    0.966    1.016    0.976

MEDIAS DE NIVELES DE CONSERVACION A -20°C.

a) 0.961 0.910 0.957 1.014 0.950 0.894 0.871 0.820 0.945 1.081

MEDIA GENERAL = 0.940

ANALISIS DE VARIANZA

<u>F. VAJAC.</u>	<u>SUM. CUAD.</u>	<u>G.L.</u>	<u>MED. CUAD.</u>	<u>F</u>
FILAS	0.6363E 00	6	0.1060E 00	7.277**
COLUMNAS	0.1355E 01	9	0.1506E 00	10.333**
INTERAC.	0.5746E 01	54	0.1064E 00	7.303**
ERROR	0.3060E 01	210	0.1457E-01	
TOTAL	0.1080E 02	279		

b)

TABLA XXXVI.- DUREZA.

a) Diferencias significativas entre los niveles de maduración y los niveles de conservación a -20°C.  
b) Análisis de varianza.

una media inferior a la del lote testigo, si bien no llegan a diferenciarse de él. La dureza en estos lotes, respecto del testigo, aunque es menor, no es en general, tendente a disminuir, ya que las medias encontradas para los diferentes niveles de maduración aumentan, alcanzando un máximo a los 90 días. Jiménez S. y col. (1.979) sin embargo, concluyen que los quesos congelados y conservados durante un mes, tienen una dureza menor, ya que ésta tiende a disminuir de  $1,01 \pm 0,11$  en la cuajada descongelada a  $0,45 \pm 0,10$  a los 60 días de maduración.

#### 4.3.2.7. Determinación de minerales.

El contenido en minerales de la leche, suero, cuajada prensada, cuajada salada, se expresan en la tabla nº XXXVII.

Los resultados obtenidos, concuerdan en general, con los dados por Aizetmüller K. y col. (1.974) y están dentro de los límites de variación encontrados por Wong N.P. y col. (1978), para quesos del mismo tipo que el Manchego.

	Na	K	Ca	Hg	Fe	Cu	Zn	Mn
Leche	0,049	0,124	0,166	0,015	1,385	0,250	5,210	0,111
Suero	0,047	0,120	0,040	0,008	1,085	0,100	0,220	0,056
Cuajada prensada	0,510	0,068	0,684	0,024	7,600	1,790	26,000	0,330
Cuajada salada	0,046	0,051	0,633	0,022	7,005	1,020	25,500	0,310

- 56 -

Los valores de minerales, vienen dados en las muestras de queso en % en peso y g/g y en la leche y suero en % en volumen t g/ml.

TABLA XXXVII.- CONTENIDO EN MINERALES DE LA LECHE, SUERO Y CUAJADAS.

158 光

5. DISCUSSION

La flora microbiana total en el queso Manchego, está compuesta durante la fabricación y al principio de la maduración, principalmente por las bacterias lácticas y sobre todo por los estreptococos, que crecen masivamente en los primeros días de la maduración para luego lisarse debido a la acidez del medio, momento en que los lactobacilos comienzan a desarrollarse extraordinariamente. Dichos aumentos y descensos en cada uno de los grupos microbianos que participan en la maduración del queso, justificaría que la población microbiana total, permanezca aproximadamente constante en nuestra experiencia, si se observa globalmente a lo largo de la maduración.

El aumento en el número de gérmenes viables es sin embargo, más significativo en las experiencias de Núñez M. (1.976) y Martínez Moreno J.L. (1.976), que encuentran en tan sólo siete días un valor logarítmico máximo de diez, para retornar a los 3 meses de maduración a las concentraciones de partida. En otras ocasiones, la acidificación producida por la transformación de la lactosa en ácido láctico es tan grande y se produce tan rápidamente, que este descenso de gérmenes ocurre a los tres días de comenzar la maduración y es observado por Román M. (1.975) en quesos Manchegos parafinados, encontrando valores logarítmicos de 10 al añadir el fermento y sólo de 7,5 a los tres días de maduración, manteniéndose ya dicho valor constante, hasta el final de la misma.

El aumento observado en el número de gérmenes viables al realizarse la descongelación, cuando los quesos han estado conservados durante 30 días, podría achacarse a que dicho período de tiempo, no es suficiente para provocar una destrucción apreciable de la flora total, especialmente si se tiene en cuenta que en es

te momento está compuesta principalmente por estreptococos, y éstos son resistentes a la congelación, Rosset R. y col. (1.974). Por otro lado la forma de realizar la descongelación, durante 48 horas a 5°C, podría favorecer el desarrollo de una flora psicrófila (micrococos, etc...). Según Buttiaux R. (1.973), una temperatura de descongelación comprendida entre + 2°C y + 5°C mantiene la flora microbiana a un nivel aceptable, mientras que a la temperatura ambiente, ésta puede sobrepasar rápidamente los  $10^9$ - $10^{10}$  gérmenes/gr.

Cuando los lotes han estado congelados durante más tiempo (C-90, C-180, C-240, C-300, C-360), se observa una disminución significativa en el número de gérmenes viables al descongelar la cuajada, respecto de ésta antes de congelar, por lo que se piensa que dichos tiempos de conservación afectan la viabilidad de la flora microbiana; en conjunto esta disminución, prosigue de forma más acusada durante la maduración en dichos lotes, respecto de los que tuvieron menos tiempo de conservación y del testigo.

Dichas disminuciones en los valores de gérmenes viables, son encontradas también por Richards E. (1.967) en congelación de queso Cheddar.

El aumento importante en el número de lactobacilos al principio de la maduración, se atribuye generalmente a una contaminación ambiental, ya que se encuentran en el medio ambiente de las queserías en gran número. La leche inicialmente está desprovista de lactobacilos y éstos llegan a ella y a las cuajadas en fabricación, a través de los utensilio, del aire, etc... Algunos autores como Mansour A. y col. (1.973), no pueden hallarlos

en los quesos conservados en salmueras, otros, como Ducastelle A. y col. (1.965) tampoco los encuentran en quesos Saint Paulin. Sin embargo Barneto R. y col. (1.979), encuentran en queso Manchego, que los lactobacilos, que están en la leche en valores logarítmicos muy bajos, (1-2), llegan a superar a los estreptococos y alcanzan a los 3-4 meses de maduración, valores de hasta  $10^9$  gérmenes/gr. Estos resultados coinciden con los encontrados por Ordóñez J.A. (1.978a), quien observa en quesos Manchegos conservados en aceite de oliva, un incremento masivo de lactobacilos para alcanzar valores logarítmicos de 9 a los 4-5 meses de maduración, observando después una disminución hasta los 7 meses aproximadamente. Massó Lago J. (1.974), también en queso Manchego, encuentra un aumento de lactobacilos, los cuales se mantienen en un orden de  $10^7$ /gr. hasta pasados 2 meses de maduración y Ordóñez J.A. y col. (1.978 b), los encuentran en queso Manchego como flora predominante a partir del tercer mes.

Tanto Martínez Moreno J.L. (1.976) en queso Manchego industrial de leche de oveja sin pasteurizar, como Román M. (1.975) en quesos Manchegos industriales de leche de oveja pasteurizada, observan una multiplicación de lactobacilos que llegan a alcanzar a los dos meses de maduración, valores de  $10^7$ - $10^8$  gérmenes/gr. incluso en quesos fabricados con leche pasteurizada, en los que los que los analiza en la cuajada fresca, dan prácticamente ausencia de dichos gérmenes; esto es observado por Núñez M. (1.976) y también por nosotros en este trabajo, ya que el número de lactobacilos en la cuajada fresca es de 3,42 (tabla nº VI), muy inferior al de la cuajada salada (5,04).

Dicho incremento de lactobacilos, que pueden provenir del medio ambiente y que se multiplican mucho, especialmente

cuando las células de los estreptococos se lisan y liberan sustancias estimulantes, es observado también en nuestra experiencia, cuando los quesos se maduran directamente. Cuando los quesos se congelan poco tiempo (C-30), dicha congelación no parece tener un efecto destructivo muy importante sobre estos gérmenes, ya que al descongelar, se observan valores incluso significativamente mayores; sin embargo, la mortalidad más grande de estos microorganismos al comenzar la maduración y el hecho de que estén siempre por debajo de los valores del testigo, podría indicar que los lactobacilos sufren durante la conservación al estado congelado, una serie de lesiones metabólicas, que provocan su lisis más rápidamente en la maduración posterior.

La susceptibilidad de estos gérmenes a la congelación ha sido comprobada también por otros autores, como Didienne R. y col. (1.978). Estos autores observan en queso Saint Nectaire una disminución en el número de lactobacilos, después de la congelación, si bien éstos proseguían su evolución normal a lo largo de la maduración, independientemente de cual fuera el tiempo de conservación. Esto sin embargo, no concuerda con los resultados de nuestra experiencia, ya que como hemos visto, conservaciones de poco tiempo no afectan la viabilidad de los microorganismos, aunque sí parecen impedirles su normal desarrollo posterior; conservaciones de más tiempo (C-60 y C-90), provocarían ya una cierta destrucción, pero posiblemente los gérmenes supervivientes al disponer en el medio de mayor concentración de sustratos (debido a la lisis celular, etc...), pueden desarrollarse más rápidamente y recuperarse durante la maduración, encontrándose en valores por encima del lote C-30. Cuando los tiempos de conservación son mayores (C-120, C-150 y C-180), la mortalidad durante la conserva-

ción al estado congelado, ya es significativamente apreciable respecto del testigo (3,55; 3,52; 2,92), pero la recuperación de los gérmenes supervivientes es todavía mucho más rápida, pudiendo llegar incluso, como en el caso del lote C-180, a no diferenciarse globalmente dicha maduración, del lote madurado directamente (tabla nº VIII ). De dicha tabla se desprende también, que si aumentamos el tiempo de conservación, la evolución de los lactobacilos a lo largo de la maduración ya no se diferencia (C-240), o incluso llega a superar la del lote testigo (C-300).

La desaparición de gérmenes Coliformes ó su brusca disminución en la maduración de los quesos, es consecuencia de la transformación de la lactosa en ácido láctico con la consiguiente caída del pH; Martínez Moreno J.L. (1.977). Esta disminución que ha sido observada en nuestra experiencia, es confirmada también por otros autores en queso Manchego, Ordóñez J.L. y col (1978 a, b, c), Massó Lago J. (1.974); Martínez Moreno J.L. y col. (1976).

Los valores de Coliformes al descongelar los lotes C-30 y C-60, que no se diferencian significativamente de los quesos antes de congelar, indicarían al igual que en el caso de los lactobacilos, que no se ha producido una gran mortalidad de gérmenes, si bien, pueden ocurrir lesiones como en el caso del lote C-30, haciendo que a los 15 días de maduración, su número se encuentre significativamente por debajo del lote testigo y que dicha disminución continúe a lo largo de toda la maduración, llegando al final a desaparecer completamente (0,00 a los 120 días). A resultados parecidos llega Peláez M.C. (1.978) en queso tipo Manchego, quien después de congelar y conservar 20 días a -20°C, cuajadas tipo Manchego, observa una desaparición más rápida de los Coliformes en los quesos congelados que en los testigos.

En el caso del lote C-60, el aumento en el tiempo de conservación al estado congelado, supondría una mayor disponibilidad de sustratos con lo que la disminución a lo largo de la maduración, es más lenta que en el caso del lote C-30 y por tanto no se diferencia significativamente del lote testigo.

El restablecimiento de dichos gérmenes, cuando los tiempos de conservación no son muy grandes, ha sido estudiado por Warseck M. y col. (1.973).

Si aumentamos el tiempo de conservación, se puede observar una clara disminución en el número de Coliformes durante dicho período, los cuales prosiguen su descenso hasta los 15 días de maduración, momento en que no pueden observarse diferencias significativas entre los lotes C-90, C-120, C-150, C-240, C-300. De todos estos lotes el que menos de diferencia significativamente del testigo (tabla nº X ), es el C-90, que ha sufrido menor tiempo de conservación al estado congelado, a excepción del C-30. Parece ser que el aumento en los tiempos de conservación, afecta de modo importante a este grupo microbiano, provocando una fuerte destrucción de la flora y dificultando su recuperación posterior; tiempos grandes de conservación (C-120, C-180, C-300), suponen fuertes destrucciones durante este período y a pesar de las mayores disponibilidades de sustrato, si al efecto de la congelación unimos la disminución del pH, nos encontraremos con que dichos lotes presentan en conjunto una evolución significativamente inferior a la del lote testigo.

El efecto destructivo de la congelación sobre los gérmenes Coliformes ha sido observado también por otros autores como Yano N. y col. (1.971), Didienne R. y col. (1.978) y Epstein I.

y col. (1.978). El hecho de que tiempos mayores de conservación produzcan una mayor destrucción de gérmenes Coliformes, ha sido demostrado también por Ottogalli G. y col. (1.974 a), quienes efectuando cultivos puros de E. coli en cuajadas estériles congeladas, observan una disminución de  $95 \times 10^6$  gérmenes/g. a  $10 \times 10^6$  gérmenes/g., si la conservación es corta, (dos horas en túnel) y de  $95 \times 10^6$  gérmenes/g. a  $3 \times 10^5$  gérmenes/g. después de una conservación de 60 días.

La flora lipolítica en el queso, está compuesta principalmente por la flora psicrófila (*Pseudomonas*, *Alcalígenes*, etc.), los micrococos, algunos estreptococos lácticos, los mohos y las levaduras.

Según Massó Lago J. (1.974) en quesos semiduros, no madurados por hongos como el Manchego, la contribución de éstos a la lipólisis es muy escasa, así como la de las levaduras, que en muchos casos no han podido ser aisladas.

La flora lipolítica queda pues prácticamente reducida a la flora psicrófila y a los micrococos, puesto que las aptitudes hidrolizantes sobre los triglicéridos de cadena larga de los estreptococos lácticos, no han sido aún demostradas. Según Ortiz de Apodaca M.J. (1.979) parece ser, que las enzimas de dichos microorganismos, atacarían mono y diglicéridos resultantes de la hidrólisis de triglicéridos de cadena más larga, producidos a partir fundamentalmente de los micrococos. Según los resultados de Ordóñez J.A. y col. (1.977 b), estos microorganismos son capaces de hidrolizar mediante exolipasas, la tributirina y la tri-laurina en todos los casos, así como la triestearina en un 75%. Un 50% de las cepas mostraban una actividad lipásica endocelular

especialmente sobre la tributirina y los lípidos no polares de la leche.

Ahora bien, parece también generalmente admitido que existe un incremento en el nivel de micrococos, durante los primeros días de la maduración, para después experimentar un descenso e incluso una desaparición en muchos casos; Mabbitt L. A. (1.961). Por tanto si consideramos, que una gran parte de la población microbiana lipolítica del queso Manchego está constituida por micrococos, ésto está de acuerdo con nuestros resultados, al obtener un aumento y posterior disminución de la flora lipolítica a los 30 días en los lotes madurados directamente. Por otra parte y puesto que algunos géneros psicrófilos como Pseudomonas, Alcalígenes e incluso algunos Coliformes, poseen también actividades lipolíticas, dicha disminución podría también ser explicada en parte por el descenso de dichos gérmenes, que como en el caso de los Coliformes no son resistentes a los bajos valores de pH.

Ordóñez J.A. y col. (1.980 b) en queso Roncal, encuentran los micrococos en valores logarítmicos comprendidos entre 5 y 6 y Núñez M. (1.978), en queso de Cabrales, los encuentra entre 3 y 6 en el interior del queso y en cantidades mucho mayores ( de 3 a 9) en la superficie, ya que dichos microorganismos son aportados en muchas ocasiones por la sal. Devoyod J.J. y col. (1.968) en queso Roquefort, los encuentra en valores logarítmicos aproximadamente de 5, cuando se hace el recuento antes del salado, incrementándose de 4 a 10 en la superficie del queso después del salado, mientras que en el centro, el incremento es de 4 a 7.

Martínez Moreno J.L. y col. (1.976), en quesos Manchegos observan un aumento de micrococos, que alcanza su número máximo a los tres días ( $10^7$  en algunos casos), para luego descender hasta valores de  $10^4$  a los 60-90 días de maduración; así mismo Núñez M. (1.976) también en quesos Manchegos, los encuentra en valores logarítmicos que oscilan entre 4 y 6, con aumento inicial y posterior caída.

Dichos aumentos y disminuciones posteriores en queso Manchego, son observados también por Massó Lago J. (1.974); Román H. (1.975); Ordóñez J.A. y col (1.978 a y b), que observan su desaparición total a los cinco meses de maduración.

En los resultados de nuestra experiencia puede observarse (tabla nº XI ), que las cantidades de gérmenes lipolíticos al descongelar las cuajadas, son superiores en todos los lotes respecto al testigo. Dicho aumento puede interpretarse por el hecho de que los micrococos según Christophersen J. (1.968), son microorganismos resistentes a la congelación. También son resistentes algunas bacterias lácticas con actividades lipolíticas exocelulares. Dicha resistencia a la congelación de los gérmenes lipolíticos, es observada también por Peláez C. (1.978). Si las temperaturas de congelación no afectan la viabilidad de estos gérmenes, dichos microorganismos, pueden llegar al final del período de congelación, en un número aproximadamente igual al que tenían antes de realizar ésta, y pueden crecer y desarrollarse abundantemente durante el período de descongelación, a 5°C, dado que buena parte de dicha flora es psicrótrofa. De esta manera al realizarse los análisis, después de descongeladas las cuajadas, se observa un número de gérmenes lipolíticos significativamente mayor, del que había antes de realizarse la congela---

ción.

Cuando las cuajadas se conservan durante 30 y 60 días (C-30; C-60), no se observan diferencias significativas globales respecto del lote testigo (tabla XII ). Ahora bien, cuando se aumenta el tiempo de conservación al estado congelado, (C-90, C-120; C-150; y C-180), dichas lotes evolucionan posteriormente por encima del lote testigo, incluso diferenciándose significativamente de él, como en el caso de los lotes C-90; C-150 y C-180 (tabla nº XII ). Aunque la disminución sufrida por los gérmenes lipolíticos en estos lotes a los 30 días de maduración, no se diferencia significativamente del lote testigo (tabla nº XII y gráfica nº 10 ), dicha disminución de forma global, es menos acusada que en el lote madurado directamente y la mayor disponibilidad de sustrato en dichos lotes por el aumento del tiempo de conservación, hace que dichos gérmenes se encuentren posteriormente en valores superiores a los del lote testigo.

Si seguimos aumentando el tiempo de conservación (C-240; C-300 y C-360), las medias en los niveles de congelación, se encuentran por debajo del lote testigo (tabla nº XII ), Los valores de gérmenes lipolíticos en estos lotes a los 120 días de maduración, se diferencian significativamente del resto de los lotes y están muy por debajo de ellos. Esto hace pensar que el aumento en los tiempos de exposición a las bajas temperaturas, provoquen lesiones irreversibles en estos gérmenes y a pesar de la mayor disponibilidad de sustratos, queden incapaces de restablecerse.

Si consideramos que en los quesos y particularmente en

en el Manchego, la flora proteolítica está compuesta principalmente por los estreptococos lácticos y fecales y los lactobacilos, el considerable aumento en el número de gérmenes proteolíticos al principio de la maduración, se deberá al aumento progresivo de dichos gérmenes, al comenzar dicho período. Efectivamente como ya se ha dicho anteriormente, la mayor parte de la flora microbiana en el queso al comenzar la maduración, está compuesta por los estreptococos, muchos de los cuales poseen actividades enzimáticas extracelulares y son capaces de degradar las sustancias nitrogenadas. La actividad proteolítica fundamental de los estreptococos y de los lactobacilos, consiste sin embargo en liberar cuando las células son lisadas, enzimas intracelulares que atacarán el material proteico.

Aceptando por tanto que la mayor parte de la flora proteolítica al comienzo de la maduración esté constituida por los estreptococos, seguida de los lactobacilos, que alcanzarán su máximo de crecimiento aproximadamente a los 2 meses, el descenso en dicha flora al proseguir la maduración, podría atribuirse a la fuerte destrucción de células estreptocócicas, debido al aumento de acidez en el medio.

Dicha variación en la flora láctica, es observada también por otros investigadores en varios tipos de quesos: Núñez M. (1.978) en queso de Cabrales; Ordóñez J.A. y col. (1.980b) en queso Roncal; Ordóñez J.A. y col. (1.977 a) en queso Ulloa; Román M. (1.975); Martínez Moreno J.L. (1.976) y Núñez M. (1.976) en queso Manchego.

El hecho de que no se encuentren diferencias significativas en los valores encontrados de gérmenes proteolíticos, entre

los lotes recién descongelados y antes de congelar, corrobora que los estreptococos como flora proteolítica dominante en este momento de la fabricación, son resistentes a la congelación: Christophersen J. (1.968); Rosset y col. (1.974); El Sadek G.M. y col. (1.975); Peláez C. (1.978).

Por otro lado, parte de la flora proteolítica está integrada también por micrococos resistentes a las bajas temperaturas y ciertas cepas psicrótrofas. Como se observa en la tabla nº XIV los lotes congelados poseen unas medias de gérmenes proteolíticos, obtenidas de los diferentes controles de maduración superiores al testigo, siendo su disminución a lo largo de la maduración menos acusada que en este lote, probablemente debido al menor incremento de la acidez, (4,19, 4,00, 4,80, 4,62, 4,75, 4,64, 3,70 a los 120 días frente a 2,86).

Los lotes con menor tiempo de conservación no presentan diferencias significativas respecto del testigo, en cuanto a contenido en gérmenes proteolíticos, sin embargo, al aumentar el tiempo de mantenimiento al estado congelado, se observa una disminución a lo largo de la maduración, menos acusada de estos gérmenes, que en el lote madurado directamente para los lotes que se diferencian significativamente de él, (C-120; C-150; C-180), especialmente a los 45 días.

Pudiera ocurrir que en estas cuajadas congeladas, el aumento menos acusado de la acidez (como ya se ha visto anteriormente), unido a una mayor disponibilidad de sustratos en el medio, retrasara la autólisis de las bacterias lácticas y permitiera su desarrollo por más tiempo en el queso. Cuando las conservaciones son a muy largo plazo (C-240; C-300 y C-360), existe de

nuevo una disminución en el número de gérmenes, que aun estando en valores por encima del testigo, se acercan más a éste. Dicha disminución podría deberse al comienzo de la existencia de lesiones metabólicas.

La disminución en los porcentajes de humedad a lo largo de la maduración es normal, debido a una progresiva pérdida de agua, al continuar durante todo el proceso, la sinéresis del coágulo. Dicha disminución es observada en gran número de quesos por diversos investigadores: Kim Y.K. y col. (1.978) en queso Brick; Lim J.W. y col. (1.979) en queso Edam; Manolkidis C. y col. (1.970 a y b) en queso Télémé y Lenoir J. (1.963 b) en queso Camembert.

Dicho fenómeno de sinéresis es afectado por la temperatura y los tiempos de conservación, con lo que se observa que el lote testigo y los lotes con menor tiempo de conservación, sufren mayores pérdidas que los que han estado más tiempo conservados.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Jiménez S. (1.978) en queso Manchego.

La disminución de la actividad de agua a lo largo de la maduración, está lógicamente relacionada con la pérdida de humedad.

El hecho de que los quesos sometidos a tiempos cortos y medios de congelación, presenten valores de actividad de agua superiores al testigo (especialmente en el caso del lote C-90), se

corresponde con los valores de humedad encontrados en estos mismos lotes, que también son mayores respecto de aquel madurado directamente. Al igual que en este caso, la actividad de agua descende cuando se aumenta el tiempo de conservación, siendo este descenso mayor que el sufrido por la humedad en los mismos lotes.

Ambas variables están correlacionadas en el intervalo de humedad que existe normalmente en los alimentos. Dicha correlación ha sido observada por muchos investigadores: Rflegg M. y col. (1.977), Otros, sin embargo como Heskestad R. y col. (1.978) en quesos noruegos, encuentran, que quesos con alta actividad de agua, presentaban bajos valores de humedad y viceversa.

Ahora bien, el comportamiento general de un alimento durante la conservación, viene definido por sus isotermas de sorción de humedad, en las que se representa el contenido en agua, (expresado en gramos de agua/gramo de sustancia seca o bien como porcentaje total), frente a la actividad de agua. Estas isotermas son diferentes en el proceso de desorción y de adsorción de agua, ya que se produce el fenómeno de histéresis. Dichas curvas se representan en la figura nº 22.

El agua que se encuentra en el material biológico, puede reconocerse por las distintas zonas definidas en las isotermas de sorción que quedan clasificadas al medir la actividad del agua, durante el proceso de secado o congelación. Dichas zonas según Labuza T.P. (1.968) son tres.

Zona I. Es una zona que corresponde a un agua fuertemente unida para un contenido de humedad de  $g = 0-0,7$ .

Zona II. La unión es menos fuerte que la de la zona I, y se corresponde a un contenido de humedad en gramos entre un mínimo de 0,07 y un máximo de 0,14 a 0,33.

Zona III. Este agua tiene una actividad ligeramente inferior a la del agua pura y corresponde a la mayoría del agua presente en los tejidos. El contenido de humedad correspondiente, en gramos, oscila entre 0,14-0,33 hasta un máximo de 20.

El contenido en agua puede ser una indicación inexacta de la susceptibilidad del producto al crecimiento microbiano. Un factor que parece estar más estrechamente relacionado con las condiciones que favorecen o desfavorecen dicho crecimiento, es la actividad del agua. Cada especie microbiana presenta una actividad del agua mínima, a la cual puede crecer. Los mohos son los microorganismos menos exigentes a este respecto, mientras que las levaduras y las bacterias, requieren generalmente altos valores de actividad del agua, para poder iniciar su crecimiento y desarrollo.

En la figura nº 22 se expresan también los diferentes desarrollos de gérmenes (mohos, levaduras y bacterias), pudiendo observarse que especialmente en el caso de las bacterias, crecen a valores muy altos de actividad del agua, en la zona III de dicha figura. Es interesante destacar que dichos niveles de actividad del agua, son alcanzados en nuestros quesos, especialmente al principio de la maduración, con lo que los microorganismos en contrarían, condiciones óptimas para su desarrollo.

En el queso, la actividad el agua está relacionada, tanto con el desarrollo de las bacterias lácticas responsables de

la glicolisis y de la proteolisis, como con la inhibición del crecimiento de microorganismos indeseables que pueden producir alteraciones (hongos), o incluso intoxicaciones alimentarias.

La mayoría de los gérmenes patógenos contaminantes del queso pueden crecer, si la actividad del agua es suficientemente alta.

En la fabricación del queso, es importante el desarrollo precoz de una flora competitiva dominante (estreptococos y lacto bacilos), que crea condiciones adversas para el crecimiento de los microorganismos indeseables, como el establecimiento de bajos valores de pH, cuando en estas fases de la maduración la actividad del agua es especialmente alta. Según Mora M. (1.978), la actividad del agua media del queso Manchego, alcanza el valor de 0,95 hacia el segundo mes de maduración, cifra coincidente con las obtenidas por nosotros, si observamos las medias en los diferentes niveles de maduración de la tabla nº XVIII . Hasta este momento el bajo valor del pH impide el desarrollo de los microorganismos indeseables, cuando la actividad de agua se mantiene alta. A partir de este momento ya es capaz por sí solo de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram negativas y de las esporuladas, sin inhibir el desarrollo de las cepas proteolíticas de estreptococos, (actividad de agua mínima de 0,91), lactobacilos y micrococcos, (actividad de agua mínima de 0,90).

Correlaciones: Hemos encontrado correlación altamente significativa entre la variación global de los gérmenes viables a lo largo de la maduración, tomando las medias de cada uno de dichos niveles y la variación global de la actividad del agua para dicho proceso, tomando también estas medias.

El coeficiente de correlación encontrado es de 0,965 y el ajuste realizado, ha sido una recta de ecuación

$$y = 20,995 \cdot X - 12,696$$

Dicho ajuste está reflejado en la figura nº 33.

Observando dichos resultados puede verificarse una vez más, la estrecha relación existente entre la variación de la flora microbiana y el contenido de agua disponible en el queso para el crecimiento de dicha flora, a lo largo de la maduración.

No se ha podido encontrar sin embargo, ninguna correlación entre ambas variables, cuando se enfrentan las medias de los distintos niveles de congelación, expresadas en las tablas nº VI y XVIII, de lo que se deduce que en el crecimiento de los gérmenes sometidos a otros factores fuertes como las bajas temperaturas influyen muchas más variantes, que interaccionan con los valores de actividad de agua.

El aumento brusco de la acidez en el lote testigo, se justifica por la rápida desaparición de la lactosa, con la consiguiente transformación en ácido láctico por parte de los microorganismos.

Como ya se ha dicho anteriormente en la introducción de este trabajo, en general los quesos duros con tratamiento térmico de la leche, tienen una más rápida desaparición de la lactosa: Lenoir J. (1.963 a y b); Jiménez, S. (1.978); Román M. (1.975).

Por otro lado, Ojeda E. (1.969) en quesos Manchegos, observa que la retención de la lactosa en la cuajada, es muy pequeña (12-18%), y que esta retención está relacionada con la cantidad de lactosa en la leche y el número de gérmenes lactofermentadores presentes en ella.

La utilización por parte de los microorganismos del ácido láctico, como sustrato en su metabolismo durante la maduración, sería relativamente lenta, por lo que dichos niveles de acidez se mantienen posteriormente, más o menos constantes.

Observando las tablas nº IV y XXII, puede verse que la acidez en la cuajada recién prensada es de 0,30 y sufre un brusco aumento, ya que la media para el nivel 0 de maduración (M-0) es de 0,37. Este aumento coincidirá con la fuerte disminución del pH en estos estadios, ya que pasa de 5,99 en la cuajada prensada a 5,94 para el nivel inicial de maduración.

El hecho de que los valores de acidez estén en los lotes congelados por debajo del lote testigo, coincide con el trabajo de Jiménez S. (1.978) quien también encuentra en queso Manchego, una acidez menor en quesos congelados frente a un testigo.

El grado de acidez es una medida dependiente, no sólo de la cantidad de ácido láctico existente en el medio, sino también del grado de lipólisis, (ya que existe un aumento en la producción de ácidos grasos).

El aumento de la proteolisis, observado por el aumento del índice proteína soluble/proteína total en cloruro sódico al 5%, a lo largo de la maduración del lote testigo, se justifica por la destrucción de los gérmenes proteolíticos y la consiguiente liberación de enzimas endocelulares, que atacan el material proteico para dar péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos.

Los valores superiores de dicho índice, encontrados en los lotes congelados, podrían deberse a la mayor cantidad de gérmenes existentes en dichos lotes respecto del testigo, como ya se puso de manifiesto al hacer los resultados y discusión de dicha variable.

Dichos gérmenes poseen exoenzimas que pueden atacar las sustancias proteicas, y su mayor número, especialmente al principio de la maduración, en los lotes congelados respecto del testigo, hace que el índice de proteolisis sea superior en esa fase. Ahora bien, puesto que la actuación proteolítica de dichos gérmenes se debe principalmente a las endoenzimas, la menor liberación de éstas (por la menor destrucción de gérmenes debido al menor incremento de acidez en los lotes congelados), se traduce a la larga en una transformación de la proteína, sin variaciones significativas en el índice proteína soluble/proteína total a lo largo de la maduración.

En la tabla nº XXVII puede observarse, que a partir del lote C-60, no hay variación apreciable a lo largo de la maduración, mientras que en el lote testigo, el índice proteína soluble/proteína total se incrementa mucho a los 90 días, momento éste en que los gérmenes proteolíticos en el lote testigo están muy por debajo de los lotes congelados.

La mayor actividad proteolítica de las enzimas intracelulares respecto de las enzimas extracelulares de las bacterias lácticas, (como flora dominante proteolítica), se ha comprobado por muchos investigadores como Dilanyan Z.K. y col. (1.978), quienes demuestran que dicha actividad, es aproximadamente el doble para las enzimas endocelulares respecto de las exocelulares, y mayor para los lactobacilos que para los estreptococos.

Correlaciones: Se ha encontrado una correlación altamente significativa, entre los gérmenes proteolíticos, tomando las medias de los diferentes niveles de maduración y los valores tomados de la misma forma, para el índice proteína soluble/proteína total. No se ha considerado sin embargo para efectuar esta correlación, más que a partir de los 15 días de maduración, ya que durante estos primeros 15 días, la evolución de los gérmenes proteolíticos es muy rápida y esta primera parte de la maduración es por lo tanto diferente del resto. Se puede considerar por tanto, que existe correlación entre ambas variables a partir de los 15 días.

El coeficiente de correlación encontrado es de -0,908, observándose que el comportamiento de dicho índice (proteína soluble/proteína total), frente al número de gérmenes proteolíticos sigue una curva de tipo exponencial cuya ecuación es:

$$y = 40,6888 \cdot e^{-0,1251 \cdot x}$$

Dicha curva está representada en la figura nº 34.

No se ha encontrado ninguna correlación entre ambas variables para las medias de los distintos niveles de congelación.

La correlación encontrada a lo largo de la maduración global de todos los lotes, para ambas variables, indica una vez más que durante el proceso, la disminución en el número de gérmenes, va acompañada de un aumento en la proteólisis, que en nuestro caso se ha manifestado de tipo exponencial y que dicho aumento, se debe fundamentalmente a la liberación de endoenzimas celulares, en el momento en que se produce la lisis de dichos microorganismos.

De los electroforegramas caseínicos obtenidos mediante electroforesis en acetato de celulosa, se observa una cierta resistencia a la hidrólisis, tanto de la caseína  $\alpha_s$  como de la  $\beta$ , aunque mucho mayor en este último caso, en que no ha podido detectarse ningún tipo de degradación. Según Ledford R.A. y col. (1.968), dicha resistencia se ha relacionado con factores como el contenido en agua, actividad de agua, proteínas, cenizas, sal, Ca, P y pH. Esto ha sido observado por muchos investigadores como Creamer L.K. (1.970); Fox P.F. y col. (1.971), etc... Parece ser que las bajas temperaturas favorecen la proteólisis de la fracción  $\beta$ : Fox P.F. (1.969), mientras que el ClNa, inhibe selectivamente la proteólisis de la  $\beta$  caseína en solución de caseinato sódico.

Según Marcos A. y col. (1.976 c), parece ser que la hidrólisis de la  $\alpha_s$  caseína, comienza desde el principio de la maduración, por acción principalmente de la renina y posteriormente se degrada la  $\beta$  caseína dando productos de menor movilidad electroforética. El cuajo, que es el principal responsable de los niveles de proteólisis detectados por electroforesis, así como la formación de muchos péptidos grandes, medios y pequeños, es sólo capaz de producir un número pequeño de aminoácidos; O'Keefe R.B. y col. (1.976b) y Gripon J.C. y col. (1.975). Se ha detectado su capacidad de ataque in vitro de la  $\alpha_s$  y  $\beta$  caseína, pero en queso sólo ha sido observado un pequeño efecto sobre esta última.

Ordóñez J.A. y col. (1.978 b) en quesos Manchegos industriales, encuentra que el 50% de la  $\alpha_s$  caseína se degrada por el cuajo, desde el primer día, alcanzando la degradación el 60% al tercer mes, mientras que sólo se degrada un 10% de la  $\beta$  caseína. En el queso de oveja de los Pedroches sin embargo, la  $\beta$  caseína comienza a degradarse a partir del primer mes de maduración; Fernández Salguero J.A. (1.975); admitiéndose de modo general que dicha fracción caseínica es resistente a la acción de la renina y su hidrólisis se debe principalmente a la proteasa natural de la leche y a las proteasas microbianas. Este mismo autor observa que durante los primeros días de la maduración del queso y mientras que la actividad de agua y el pH se mantenían elevados, la  $\beta$  caseína se degradaba prácticamente a la misma velocidad que la  $\alpha_s$  caseína, cesando después para reanudarse cuando el pH ascendía. Este autor atribuye esta primera hidrólisis a las proteasas exocelulares microbianas.

Correlaciones: No hemos podido encontrar correlación directa entre el número de gérmenes proteolíticos a lo largo de la maduración y la degradación caseínica medida como variación en el índice  $\beta / \alpha_s$ . Tampoco se ha podido encontrar ninguna correlación a lo largo de los tiempos de conservación.

Dichos resultados corroboran en cierto modo el pensamiento generalizado, de que el primero y principal agente de la hidrólisis de la caseína (y fundamentalmente de la  $\alpha_s$  caseína) es el cuajo, mientras que la  $\beta$  caseína es hidrolizada casi exclusivamente por la fosfatasa alcalina de la leche y las enzimas microbianas. Los gérmenes proteolíticos pueden degradar la caseína por medio de enzimas exocelulares y principalmente por enzimas endocelulares, siendo esta actividad muy superior para los lacto bacilos que para los estreptococos. Ahora bien, su actividad proteolítica es eminentemente de actuación sobre los productos hidrolizados de la caseína por medio del cuajo, quién en muchas ocasiones, puede incluso estimular la acción de las enzimas proteolíticas; Visser F.M.W. (1.977).

El hecho de que en este trabajo hayamos podido encontrar una buena correlación entre los gérmenes proteolíticos y el índice proteína soluble/proteína total y no hayamos podido encontrar la entre gérmenes y relación  $\beta / \alpha_s$  corrobora estas afirmaciones. Hay que tener en cuenta además, que tampoco se han podido encontrar correlaciones para las tres variables a la vez, dado el especial peso que sobre el índice proteína soluble/proteína total tienen los gérmenes proteolíticos y el escaso peso que tienen sobre el índice  $\beta / \alpha_s$ .

Dicha actuación de los gérmenes ha sido corroborada también por otros investigadores como Visser F.M.W. y col. (1.977); Kikuchi T. y col. (1.973, 1.974); Creamer L.K. (1.978); Poznanski S. y col. (1.965); Chebbi N.B. y col. (1.977).

Algunos autores sin embargo, como Ohmiya K. y col. (1.967 y 1.968), consideran que las proteasas endocelulares liberadas por la autólisis de las bacterias lácticas, contribuyen más que la renina a la hidrólisis de la caseína.

Por otro lado no se puede olvidar, que a pesar de que el cuajo sea el principal agente hidrolizante de la caseína, las bacterias vivas poseen una cierta capacidad de hidrólisis por medio de enzimas exocelulares y sobre todo a través de las enzimas liberadas en la lisis.

La capacidad hidrolítica de suspensiones de células vivas en soluciones de caseinato, aisladas de queso tipo Manchego, mediante "screening" en medio SMCa, ha sido puesta de manifiesto por Marcos A y col. (1.977). Dichos autores demostraron que el 43% de las cepas mostraban cierta inespecificidad de ataque sobre la  $\alpha_s$  y  $\beta$  caseínas; el 36% hidrolizaron en mayor cuantía la  $\beta$  caseína y el resto (21%), degradaron sobre todo la  $\alpha_s$  caseína.

En nuestra experiencia, si a la actuación primordial del cuajo, le unimos la importancia hidrolítica que puedan tener los gérmenes y principalmente los lactobacilos, las variaciones ocurridas en el índice  $\beta / \alpha_s$ , para los lotes congelados, podrían ser en parte achacables a la variación ocurrida en esta flora para dichos lotes, si bien se observa que tiempos muy grandes de

conservación, producen una disminución en la hidrólisis de la  $\alpha_s$  caseína, muy importante, independiente del número de gérmenes que haya en estos lotes, con lo que se deduce que el cuajo, principal agente caseinolítico, puede de alguna manera verse afectado por grandes tiempos de conservación.

Como ya se ha comentado anteriormente, la flora lipolítica del queso y más concretamente del Manchego, está compuesta principalmente por los micrococos y la flora psicrótrofa. Se atribuye también a las bacterias lácticas, una cierta capacidad lipolítica aunque dicha actividad ya ha sido discutida anteriormente; Carini S. y col. (1.972) y Umemoto Y. y col. (1.975).

Todas estas bacterias poseen lipasas extracelulares y endocelulares que degradan la materia grasa, para dar finalmente ácidos grasos, si bien estos ácidos grasos pueden provenir en parte de la degradación caseínica. Robertson P.S. y col. (1.961), confirman la existencia de lipasas extracelulares de los micrococos en el queso Cheddar, mientras que Peterson M.H. y col. (1.949), Stadhouders J. y col. (1.957), observan que el incremento en el contenido en ácidos grasos libres coincide con la destrucción autolítica de un gran número de micrococos, especialmente en las primeras semanas de maduración y atribuyen la lipólisis del queso, fundamentalmente a esta liberación.

Según Driessen F.M. y col. (1.975), las lipasas de las bacterias lipolíticas, no causan hidrólisis de la grasa en la leche, (ya que ésta es causada prácticamente sólo por la lipasa natural de ésta); su efecto es mucho mayor en la lipólisis del queso.

Correlaciones: Se ha encontrado una correlación muy significativa entre los valores de gérmenes lipolíticos a lo largo de la maduración, tomando las medias de los distintos niveles de la misma, con las medias de los valores de ácidos grasos libres. Se ha eliminado, al igual que en el caso de los gérmenes proteolíticos-proteína soluble/proteína total, la media para el nivel de maduración 0 y se ha correlacionado ambas variables a partir de los 15 días de maduración (Figura nº 35).

El coeficiente de correlación que se ha encontrado, es de -0,837, ajustándose dichos datos a una curva exponencial de ecuación:

$$y = 6,1453 \cdot e^{-0,5089 \cdot X}$$

Se puede decir por tanto, que existe una dependencia bastante grande entre el contenido de ácidos grasos libres y el número de bacterias lipolíticas a lo largo de la maduración, si bien no es éste el único factor influyente.

Los ácidos grasos libres aumentan cuantitativamente a lo largo de la maduración en el lote testigo, si bien este aumento no es demasiado grande. Probablemente la disminución de bacterias lipolíticas, bastante considerable en los primeros quince días en este lote, afecte a la lipólisis de la grasa del queso.

Cuando observamos la evolución del contenido en ácidos grasos libres en los lotes congelados, puede verse que para tiempos cortos de conservación (lotes C-30 y C-60), existe un leve aumento en dicho contenido, pero en los lotes C-90; C-120; C-150; C-180,

este aumento es en cierto modo coincidente con el hecho de que las bacterias lipolíticas en estos lotes, poseen unas medias de maduración, significativamente superiores al testigo.

Por último en aquellos lotes con tiempos grandes de conservación (C-240, C-300 y C-360), en que las bacterias lipolíticas se encuentran en valores inferiores al testigo, existe una disminución en el contenido en ácidos grasos libres, siendo esta disminución inferior al lote madurado directamente para los lotes C-300 y C-360.

No se ha podido encontrar una buena correlación entre ambas variables para las medias de los niveles de conservación, lo que indica que el aumento en el índice de ácidos grasos libres, se debe no sólo a la acción de los gérmenes lipolíticos en los lotes congelados, sino a otros factores que además pueden ser especialmente influidos por la congelación.

Los resultados hallados para el examen de dureza, mediante la célula de Kramer A. (1.951), muestran muy poca variación de la misma, ya que sólo oscilan entre un 0,69 de mínima y 1,23 de máxima. Estos valores están comprendidos aproximadamente en el rango hallado también por Jiménez S. y col. (1.979) en el queso Manchego, pero son bastante inferiores a los obtenidos por Ramos M. y col. (1.981) en queso de Mahón, donde el incremento es de 0,36 Kg. a los cinco días, hasta 3,82 Kg. después de dos meses, encontrando incluso en una muestra, un aumento de 0,47 Kg. a 9,36 Kg.

Según De Jong L. (1.976 y 1.977), el incremento de la dureza en el queso, está relacionado con el descenso en el conteni-

do en humedad, el salado, y el descenso en el pH. Este autor, encuentra en el queso holandés Meshanger, que el ablandamiento de dicho queso, si bien depende del contenido de humedad, es especialmente dependiente de la hidrólisis de la  $\alpha_s$  caseína y ocurre tanto más deprisa, cuanto mayor sea la hidrólisis de ésta. Nikolaev B.A. y col. (1,969), en quesos de pasta dura, observa también que el aumento de la dureza está relacionado con la composición química, el contenido en agua, las sustancias nitrogenadas y los ácidos volátiles.

Por otra parte Ramos M. y col. (1,981), encuentran una relación altamente significativa entre el aumento en materia seca del queso de Mahón a lo largo de la maduración y el aumento en la firmeza, así como entre ésta última y la degradación de la  $\alpha_s$  caseína.

Correlaciones: Se ha encontrado correlación significativa entre la dureza del queso medida mediante el Instron, tomando las medias para los diferentes niveles de maduración y dichas medias para los niveles de humedad (figura nº 36 ).

El coeficiente de correlación encontrado es de 0,87 y el ajuste ha sido a una curva de tipo exponencial cuya ecuación es:

$$y = 1,9897 \cdot e^{-0,02131 \cdot X}$$

No hemos encontrado sin embargo ninguna correlación entre la dureza y la degradación de la caseína, medida como relación  $\beta / \alpha_s$ . Tampoco se ha encontrado correlación en ningún caso para los índices a lo largo de los diferentes tiempos de conservación.

El contenido en minerales del queso es importante a la hora de considerar éste, como fuente nutritiva para el hombre.

El calcio contribuye al mantenimiento de las caseínas en forma de complejo (parafosfocaseinato cálcico). El hierro y el cobre tienen especial importancia en la nutrición humana, aunque la leche y los productos lácteos sean deficitarios en ellos; estos oligoelementos actúan principalmente desde un punto de vista tecnológico realizando una actividad catalítica en la oxidación de lípidos; el zinc activa la carbónico anhidrasa, que cataliza la síntesis de fosfolípidos y el Manganeso influye sobre la actividad de la fosfatasa alcalina..

La literatura sobre el contenido en elementos minerales del queso Manchego es muy escasa, así como hay pocos trabajos acerca de la distribución de los mismos en el proceso de elaboración, Juárez M. y col. (1.981).

En nuestro trabajo puede estimarse que salvo el sodio, potasio y magnesio, los restantes elementos quedan retenidos en la cuajada en proporción superior al 65% y con valores del mismo orden, que los encontrados por Vafopoulou-Mestroyannaki A. (1.977) en queso Telamé.

A la vista de todos estos resultados, puede deducirse que la congelación de cuajadas, tiene un interés económico en orden a regular el mercado del queso y obviar el problema de la producción de leche de oveja, que es estacional.

Considerando los diferentes aspectos microbiológicos y bioquímicos de la maduración de cuajadas congeladas y conserva-

das, puede verse que dicha congelación podría utilizarse como un recurso útil para paliar dicho problema, ya que no afecta desfavorablemente la calidad del producto elaborado, encontrándose los valores de las variables analizadas dentro de los límites normales hallados por otros autores, que han estudiado también dichos procesos de congelación.

188.15

6. CONCLUSIONES.

Con el propósito de estudiar un método que permita mantener abastecido el mercado de queso Manchego, de forma continua, durante todo el año, se han realizado experiencias de congelación de cuajadas de este tipo de queso, sometién~~do~~las posteriormente a diferentes tiempos de conservación al estado congelado. Para ello, se han fabricado diferentes lotes de cuajadas, mediante un procedimiento industrial con leche pasteurizada a 72°C/20 seg. y los lotes se han congelado rápidamente en túnel a -40°C. Posteriormente se han conservado en cámara frigorífica a -20°C y HR de 95%, durante 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 y 360 días. Dichos lotes descongelados durante cuarenta y ocho horas a 5°C ± 1°C de temperatura y HR de 84%, se han sometido a maduración convencional por un período de cuatro meses.

Antes y después de la conservación al estado congelado, así como a lo largo de la maduración, se han efectuado controles para estudiar el efecto de las bajas temperaturas, sobre diferentes grupos microbianos y los cambios ocurridos en determinados parámetros bioquímicos; se ha estudiado también la influencia de la variación cuantitativa microbiana sobre dichos parámetros, así como las correlaciones que pueden existir entre ambos tipos de variables, llegando después del análisis y discusión de resultados a las siguientes conclusiones:

1.- Existe interacción entre los factores en estudio, (congelación, conservación al estado congelado y maduración), para todas las variables analizadas, a excepción del índice de Proteína total. Es decir, que el efecto producido sobre cada una de las variables, por uno de ellos no es independiente del otro y que el resultado global sobre cada variable, será la suma de los efectos producidos por cada factor, más un efecto interacción de am-

bos y más un efecto residual debido al error al azar.

2.- Congelaciones muy cortas (treinta días), no provocan descensos apreciables en el número de gérmenes viables, debido a que la mayor parte de la flora, en el momento en que se realiza la congelación está constituida por gérmenes resistentes (estreptococos). Conservaciones más largas sin embargo, ejercen ya un efecto destructor sobre la flora viable total, apreciable al descongelar las cuajadas, manteniéndose éstas en niveles inferiores al testigo, a lo largo de la maduración posterior.

3.- La viabilidad de los lactobacilos no parece verse afectada por conservaciones de treinta días durante este período, aunque sí puede verse modificada su evolución posterior a lo largo de la maduración. Conservaciones más largas, provocan una destrucción importante en el número de lactobacilos, pero presumiblemente la mayor disponibilidad de sustratos, les permite recuperarse y llegar a superar en número incluso al lote testigo.

4.- Al igual que en el caso de los lactobacilos, conservaciones de treinta días, no afectan muy directamente la viabilidad de los coliformes, aunque sí dificultan su desarrollo posterior en la maduración. Sin embargo, cuando las conservaciones se realizan durante un tiempo mayor, existe una destrucción importante de dichos gérmenes, que ya no puede superarse posteriormente, debido también a la suma de los efectos del pH y de la acidez del medio.

5.- Los valores de gérmenes lipolíticos no se ven afectados hasta los 240 días de conservación, pudiendo incluso desarrollarse durante la descongelación posterior. Cuando las conservaciones

son superiores, estos gérmenes se encuentran en valores inferiores a los del testigo, viéndose dificultada posteriormente su recuperación.

6.- El número de gérmenes proteolíticos no se modifica por la congelación y las bajas temperaturas de conservación, sin embargo durante la maduración de los lotes congelados, dichos gérmenes se encuentran en valores por encima del testigo, probablemente debido a la menor acidez en estos lotes.

7.- Las pérdidas de humedad son mayores en el lote testigo, respecto de los lotes conservados. Igualmente en estos lotes, los valores de la actividad de agua, son superiores respecto del testigo.

8.- Los lotes congelados, presentan un índice proteína soluble/proteína total, superior al del lote madurado directamente debido al mayor número de gérmenes proteolíticos, si bien el aumento de dicha proteólisis a lo largo de la maduración es más lento.

9.- Se ha observado una correlación significativa entre el aumento del índice proteína soluble/proteína total y el descenso de gérmenes proteolíticos a lo largo de la maduración global de dichos lotes. No se ha encontrado sin embargo, ninguna correlación a lo largo de los diferentes tiempos de conservación.

10.- No se ha podido encontrar ninguna degradación de la  $\beta$  caseína y si, sin embargo de la  $\alpha_s$  caseína. Dicha degradación es más lenta en el caso de los lotes congelados.

11.- No se ha encontrado una correlación entre la degradación caseínica y los gérmenes proteolíticos a lo largo de la maduración, debido a la acción del cuajo, como principal agente hidrolítico de la  $\kappa$  caseína. Tampoco se ha observado dicha correlación a lo largo de la conservación.

12.- Se ha observado un aumento en el contenido en ácidos grasos libres de los lotes congelados respecto del testigo, excepto en aquellos lotes que han sufrido mayores tiempos de conservación.

13.- Existe una correlación significativa entre el aumento de los ácidos grasos libres y la variación de gérmenes lipolíticos a lo largo de la maduración global de todos los lotes. No se ha encontrado correlación a lo largo de la conservación.

14.- Se observa una correlación muy significativa entre la variación de la actividad del agua en el queso a lo largo de la maduración y la variación en el número de gérmenes viables. Esta correlación es lineal, observándose que el número de gérmenes disminuye, a medida que disminuye la actividad de agua del queso. No se ha encontrado una correlación significativa para las medias de los diferentes niveles de conservación.

15.- La disminución en el contenido de agua del queso y el aumento de la dureza, están correlacionados si tomamos las medias para los diferentes niveles de maduración, si bien dicha correlación no ha sido hallada para las medias de los niveles de conservación al estado congelado.

16.- Durante la conservación al estado congelado y la maduración posterior del queso, no se ha encontrado correlación entre la degradación de la  $\alpha_s$  caseína y el aumento de la dureza.

17.- Se ha encontrado que salvo el sodio, potasio y magnesio, los restantes elementos metálicos, quedan retenidos en la cuajada en proporción superior al 65%.

113 89

7. BIBLIOGRAFIA.

- Abou-Donia, S.A. y El Soda, M.E. (1978). XX Int. Dairy Congress, E, 751.
- Abou-Donia, S.A., Sirry, I. y Add-El-Rahman, S.M. (1975). Alexandria J. Agric. Research, 23, 243.
- Accolas, J.P. y Auclair, J. (1969). Rev. Gen. Froid, 60, 579
- Accolas, J.P. y Auclair, J. (1970). Lait, 50 (499-500), 609.
- Aizetmüller y Wirotana, I.P.G. (1974). Z. Lebensmitt. Unters. 154 141.
- Alais, Ch. (1970). Ciencia de la leche. Principios de Técnica lechera. Ed. Compañía Editorial Continental. Barcelona.
- Albonico, F. y Resmini, P. (1967). Boll. Lab. Chim., 18, 143.
- Alford, J.A., Elliot, L.E., Hornstein, I. y Crowe, P.E. (1961). J. Food Sci., 26, 234.
- Alford, J.A. y Frazier, W.C. (1950). J. Dairy Sci., 33, 115.
- Alifax, R. (1972). Lait, 52, (515-516), 283.
- Alifax, R. (1975). Lait, 55, (541-542), 41.
- Alifax, R. (1975). Alimentation et la Vie, 63, 221.
- Anderson, J.A. (1934), J. Bact., 27, 69.
- Annibaldi, S. (1962). XVI Int. Dairy Congr. Sec. IV, 545.
- Association of Official Agricultural Chemists (1960). Official Methods of Analysis. Ed. Board. Wash. U.S.A.
- Asutyunyan, R.S., Rocharyan, N.A. y Terkazaryan, S. Sh. (1974). Intensifikat. Proiz. I. Uluch. Kachestva Natural'nykh Syrov. USSR Altaiskii TsNTI.
- Auquez Michel, M. (1974). Lait, 54 (537), 422.
- Baribo, L.E. y Foster, E.M. (1952). J. Dairy Sci. 35, 149.
- Barneto, R. y Ordóñez, J.A. (1979). Alimentaria, 16, 39.
- Bester, B.H. (1976). South African J. Dairy Technol., 8, 51.
- Bie, R. y Sjoström, G. (1975), Milchwiss., 30, 653.
- Bie, R. y Sjoström, G. (1975). Nordisk Mejeriindustri, 2, 230, 233 237.

- Birkkyaer H.E. y Andersen, A.K. (1.976). Maelkerilidende, 89, 814.
- Borgstrom, G. (1.961). Proceedings Low Temperature Microbiology Symposium. Campbell Soup Company Camden N.J., 197.
- Bottazi, V. (1.962). XVI Int. Dairy Congr. B. Sect IV, 552.
- Bottazi, V. (1.965). Ann. Microbiol Enzimol, 15, 197.
- Bovikinia, V.S. (1.969), Molotchnaia Promychlennost (4), 13.
- Brandl, E. (1.970), Milchwiss, 5, 25.
- Brandl, E. y Zizer, T. (1.973), Oesterreichische Milchwirtschaft, 28, 15.
- Brandsaeter, E. y Nelson, F.E. (1.956), J. Bact., 72, 68.
- Branen, A.L. y Keenan, T.W. (1.969), Appl. Microbiol, 17, 280
- Branen, A.L. y Keenan, T.W. (1.970), Appl. Microbiol, 20, 757
- Bretz, H. (1.961), Can. J. Microbiol, 7, 793.
- Brooks, D.E.J. (1.974), XIX Int. Dairy Congr., D, 377.
- Brooks, I.B., Luster, G.A. y Easterly, D.G. (1.970), At. Absorp. Newsl.
- Bulgadaeva, R.V., Zaborskikh, E.I., Nechesov, I.A. (1.974), Intensifikat. Proiz. I. Ulushs. Kachestva. Natural'nykh, Syrov USSR TsNTI.
- Burgos J., López Lorenzo, A. y Sala, F.J. (1.971), Anal. Fac. Vet. de León, (17), 109.
- Busse, M. (1.969), Techn. Lait, (640), 19.
- Buttiaux, R. (1.973), Rev. Gen. Froid, 64, 591.
- Carini, S. (1.969), Latte, 43, 183.
- Carini, S., Kadaravek, G. y Lodi, R. (1.972), Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 23, 377.
- Carini, S., Volonterio, G., Kadaravek, G. y Lodi, R. (1.971), Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 22, 335.
- Caserio, G., Pellegrini, M.G. y Gennari, M. (1.976), Industria del Latte, 12, 11.

- Cattaneo, P., Riva, L., Renon, P. y Crespi, A. (1.973), Industria del Latte, 14, 3.
- Chander, H. y Chebbi, N.B. (1.973), Indian Journal of Animal Research, 6, 9.
- Chander, H. y Ranganathan, B. (1.975), Experientia, 31, 1263.
- Chebbi, N.B., Chander, H. y Ranganathan, B. (1.977), Acta Microbiologica Polonica, 9, 281.
- Christ, W. (1.965), Milchwiss, 20, 133.
- Christophersen, J. (1.968), En: Hawthorn J., Rolfe, E., Recent Advances in Food Science, 4, 251.
- Christophersen, J. y Thiete, H. (1.952), Kieter milchw. Forsch. Ber. 4, 683.
- Collins, E.B. y Nelson, F.E. (1.949), J. Dairy Sci., 32, 652.
- Compairé, C. y Saiz Moreno, L. (1.979), Rev. Esp. Lech. (112), 85.
- Coppens, R. (1.968), Technicien du lait, Oct., 13
- Costamagna, L. (1.976a) Industria del latte, 12, 31.
- Costamagna, L. (1.976b) Annali di Microbiologia ed Enzimologia, 26, 75.
- Cousin, M.A. y Marth, E.H. (1.977, a), J. Dairy Sci., 60 (Suppl. 1), 34
- Cousin, M.A. y Marth, E.H. (1.977, b), J. Dairy Sci., 60, 1048.
- Cowmann, R.A. y Speck, M.L. (1.965), Appl. Microbiol., 15, 851.
- Cowmann, R.A., Swaisgood, H.E. y Speck, M.L. (1.967), J. Bact., 94, 942.
- Cowmann, R.A., Yoshimure, S. y Swaisgood, H.E. (1.968), J. Bact. 95, 181.
- Creamer, L.K. (1.970), N.Z.J. Dairy Sci. Technol., 5, 152.
- Creamer, L.K. (1.978), V Int. Congress of Food Sci. and Technol. Abs., 57, Kyoto.

- Dahlberg, D.C. y Kosikowski, F.V. (1.943), J. Dairy Sci., 21, 305.
- Dawson, D.J. y Feagan, J.T. (1.957), J. Dairy Res., 24, 210
- Debenkalar, N.J., Cousin, M.A., Bradley, R.L. y Marth, E.H. (1.977), J. Dairy Sci., 60, 857.
- De Jong, L. (1.976), Neth. Milk. Dairy J., 30, 242.
- De Jong, L. (1.977), Neth. Milk. Dairy J., 31, 314.
- Desmanzeaud, M. y Devoyod, J.J. (1.970), Ann. Biol. Anim. Bioch Biophys., 10, 30.
- Desmanzeaud, M.J. y Hermier, J.H. (1.972), European Journal of Biochemistry, 28, 190.
- Desmanzeaud, M.J. y Vassal, L. (1.979), Lait, 59, (587), 327.
- Devoyod, J.J. (1.969), Lait, 49, (481-482), 20.
- Devoyod, J.J. (1.970), Lait, 50, (499-550), 644.
- Devoyod, J.J. y Bret, G. (1.966), XVII Int. Dairy Congr., D-2, 585.
- Devoyod, J.J., Bret, G. y Auclair, J.E. (1.968), Lait, 48, (479-480), 613.
- Devoyod, J.J. y Desmanzeaud, M. (1.970, a) Lait, 50, (497), 374.
- Devoyod, J.J. y Desmanzeaud, M. (1.971) Lait, 51, (507), 399.
- Devoyod, J.J. y Lapierre, M.J. (1.970, b), Lait, 50, (495-496), 277.
- Devoyod, J.J. y Muller, M. (1.969), Lait, 49, (487), 369.
- Didienne, R., Millet, L. y Verlaquet, C. (1.978), XX Int. Dairy Congr., E, 1011,
- Dilanyan, Z.K. y Grushina, E.V. (1.978), XX Int. Dairy Congr., E, 476,
- Dluzewski, M. (1.963), Bull. Acad. Sci. Ser. Sci. Biol., 11, 12.
- Dolezalek, J. (1.966), XVII Int. Dairy Congr., D, 523.

- Dommett, T.W. (1.970), Aust. J. Dairy Technol., 25, 54.
- Dommett, T.W. (1.974), Aust. J. Dairy Technol., 29, 198.
- Dommett, T.W. (1.975), Aust. J. Dairy Technol., 30, 38.
- Driessen, F.M. y Stadhouders, J. (1.975), Ann. Bull. Int. Dairy Federation, (86), 101.
- Ducastelle, A. y Lenoir, J. (1.965), Lait, 45, (447), 371.
- Dummont, J.P., Delespaul, G., Miquot, B. y Adda, J. (1.977), Lait, 57, (569-570), 619.
- Dyer, W.J., French, H.V. y Snow, J.M. (1.950), J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 585.
- Edwards, J.L. y Kosikowski, F.V. (1.969), J. Dairy Sci., 52, 1675.
- El-Sadek, G.M., Shehata, A.E., Hassan, A.A. y El-Tobgi, H.A. (1.975), Egyptian Journal of Dairy Science, 3, 38.
- Emmons, D.B., Beckett, D.C. y Tape, N.W. (1.968), Cand. Inst. Food. Technol., 1, 8.
- Epstein, I., Cogan, V. y Calmanovici, B. (1.978), XXI Inst. Dairy Congress, D, 1018,
- Esteban, M.A., Fernández-Salguero, J., León, F. y Marcos, A. (1.979), Arch. de Zootec., 28, 21.
- Evans, A.C., Hasting, E.G. y Hart, E.B. (1.914), J. Agr. Res., 2, 167.
- Evans, A.C. (1.918) J. Agr. Res., 12, 235.
- Feagan, J.T. y Dawson, D.J. (1.959), Aust. J. Dairy Technol., 14, 59.
- Fennema, O. (1.966), Cryobiol., 3, 197.
- Fernández Salguero, J., (1.975), Tesis Doctoral, Uni. de Córdoba, España.
- Fernández Salguero J., Barreto, J. y Marsilla, B.A. (1.978), Archiv Zootec., 27, 365.

- Fernández Salguero, J. y Marcos, A. (1.977), Trab. cient. Univ de Córdoba, (7).
- Ferrer Falcón, L. (1.957), Técnicas Analíticas, Ed. Luesma, Zaragoza.
- Fox, P.F. (1.969), J. Dairy Sci., 52, 1214.
- Fox, P.F. y Walley, B.F. (1.971), J. Dairy Res., 38, 165.
- Frank, J.F. y Marth, E.H. (1.977), Journal of Food Protection, 40, 749.
- Frazier, W.C. (1.926), J. inf. dis., 39, 302.
- Frazier, W.C. y Rupp, P. (1.928), J. Bact., 16, 57.
- Fryer, T.F. (1.975), N.Z.J. Dairy Sci. Technol., 10, 8.
- Fryer, T.F., Lawrence, R.C. y Reiter, B. (1.967a), J. Dairy Sci., 50, 477.
- Fryer, T.F., Reiter, B. y Lawrence, R.C. (1.967b), J. Dairy Sci., 50, 388.
- Fryer, T.F. y Sharpe, M.E. (1.966), J. Dairy Res., 33, 325
- Gale, E.F. (1.940), Biochem. J., 34, 846.
- Galzin, M., Galzy, P. y Bret, G. (1.970), Lait, 50, (491-492), 1.
- Garmer, J., Ribadeau-Dumas, B. y Gautreau, J. (1.962), XVI Congrès Internationale Laitese, D. 12.
- Gilliland, S.E. y Speck, M.L. (1.974), J. Milk and Fd. Technol. 37, 107.
- Gillies, A.J. (1.973), Aust. J. Dairy Technol., 28, 17.
- Goicoechea, A., Jiménez, S., García Matamoros, E. y Peláez, C. (1.979), XV Congrès Int. du Froid, C-2, 80
- Grillenberg, G. y Busse, M. (1.979), Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 168, 1.
- Gripon, J.C., Desmanzeaud, M.J., Lebars, D. y Bergere, J.C. (1.975), Lait, 55, (548), 502.

- Harper, W.J. y Kristoffersen T. (1.956,a), J. Dairy Sci., 39, 1773.
- Harper, W.J. y Kristoffersen, T. (1.958), J. Dairy Sci., 41, 998.
- Harper, W.J. y Long, J.E. (1.956,b), J. Dairy Sci., 39, 129.
- Helge, Castberg, B., Solberg, P., y Egelrud, T. (1.975), J. Dairy Res., 42, 247.
- Heskestad, R. y Steinsholt, K. (1.978), Meiriposten, 67, 327, 331.
- Hosono, A. y Tokita, F. (1.977), Japan J. Zootech. Sci., 48, 250.
- Hôte-Baudart, E. (1.969), Proceeding of the XII Int. Congress of Refrigeration. Madrid.
- Imai, M. y Kato, M. (1.975), J. Agric. Chem. Soc. Jap., 49, 93
- Jabarit, A. (1.970), Lait, 50, (498), 544.
- Jabarit, A. (1.971), Lait, 51, (505-506), 302.
- Jay, J.M. (1.973), Modern Food Microbiology, Ed. Van Nostrand Reinhold Company N.Y.
- Jensen, J.P., Reinbold, G.W., Washam, C.J. y Vedamuthu, E.R. (1.973), J. Milk and Fd. Technol., 36, 613.
- Jensen, J.P., Reinbold, G.W., Washam, C.J. y Vedamuthu, E.R. (1.975,a) J. Milk and Fd. Technol., 38, 3.
- Jensen, J.P., Reinbold, G.W., Washam, C.J. y Vedamuthu, E.R. (1.975,b) J. Milk and Fd. Technol., 38, 79
- Jensen, J.P., Reinbold, G.W., Washam, C.J. y Vedamuthu, E.R. (1.975,c) J. Milk and Fd. Technol., 38, 142.
- Jespersen, T.N. (1.966), XVII Int. Dairy Congress, D, 465.
- Jiménez, S. (1.978), Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.
- Jiménez S. y Goicoechea, A., García Matamoros, E. y Peláez, C.

- (1.979), XV Cong. Int. Froid, C-2, 82,
- Johns, C.K. y Cole, S.E. (1.959), J. Dairy Res., 26, 157.
  - Juárez, M. y Jiménez, S. (1.981), Comunicación enviada al XXI Int. Dairy Congress.
  - Juárez, M. y Martínez Castro, I. (1.979), Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 19, 45.
  - Kapac-Parkacev, M., Micev, N. y Lazarewska, D. (1.967), Skopje Zemjodelstro, 18, 493.
  - Kvaale, O. y Dalhoff, E., (1.963), Fd. Technol., 152, 15.
  - Keogh, B.P. (1.970), Appl. Microbiol., 19, 928.
  - Kikuchi, T. (1.966), XVII Int. Dairy Congress, D, 313.
  - Kikuchi, T., Bergère, J.L. y Desmanzeaud, M.J. (1.973), Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 14, 313.
  - Kikuchi, T., Desmanzeaud, M. y Bergère, J.L. (1.974), Lait, 53 369.
  - Kim, Y.K., Chang, J.I. y Kim, J.S. (1.975), Korean Journal of Animal Science, 17, 643.
  - Klepacka, M. (1.978), XX Int. Dairy Congress, E, 780.
  - Klimovsky, I.I. (1.959), XV Int. Dairy Congress, Sect. 3, 697.
  - Knaut, T. y Mazure, K.K. (1.974), XIX Int. Dairy Congress, E, 389.
  - Kornacki, K., Stepaniak, L. y Habaj, B. (1.977), Przemysl Spozywczy, 31, 378.
  - Kosikowski, F.V. y Dahlberg, A.C. (1.948), J. Dairy Sci., 22, 137.
  - Kozlova, L.A. (1.974), Zapiski Leningradskogo Sel'skohozyaistvenogo Instituta, 187, 24.
  - Kramer, A., Burkhardt, G.J. y Rogers, H.P. (1.951) Canner, 112 34.
  - Krishnan, C.P. y Dutta, S.M. (1.974), Milchwiss, 29, 723.

- Kunchat, W. (1.970). Alimenta. Suisse, 9, 14.
- Kvaale, O. y Dalhoff, E. (1.963), Fd. Technol., 17, 152.
- Lablee, J. y Perot, C., (1.978), XX Int. Dairy Congress, E, 588,
- Labuza, T.P. (1.968), Fd. Technol., 22, 263.
- Labuza, T.P. (1.971), C.R.C. Crit. Rev. Fd. Technol., 2, 355
- Lamberet, G. y Lenoir, J. (1.972), Lait, 52, (513-514), 175.
- Lamberet, G. y Lenoir, J. (1.976,a), Lait, 56, (559-560), 622.
- Lamberet, G. y Lenoir, J. (1.976,b), Lait, 56, (553-554), 119
- Langsrud, T. y Reinbold, R. (1.973), J. Milk and Fd. Technol., 36, 467.
- Law, B.A., Sharpe, M.E. y Chapman, H.R. (1.976), J. Dairy Res. 43, 459.
- Law, B.A., Sharpe, M.E. y Reiter, S. (1.974), J. Dairy Res., 41, 137.
- Law, B.A., Andrews, A.F., Cliffe, A.J., Sharpe, M.E. y Chapman R.H. (1.979), J. Dairy Res., 46, 497.
- Ledford, R.A., Chen, J.H. y Nath, K.R. (1.968), J. Dairy Sci., 51, 792.
- Lee, J.Y. (1.974), Korean Journal of Animal Science, 16, 393.
- Lenoir, J. (1.963,a), Ann. Technol. Agric., 12, 51.
- + Lenoir, J. (1.963,b), Lait, 43, (423-424), 154.
- Libudzise, Z. (1.976), Acta Alimentaria Polonica, 2, 87.
- Lim, J.W. y Gordin, S. (1.979), Korean Journal of Animal Science, 21, 29.
- Lindquist, B. y Storgards (1.957), Milchwiss, 12, 462.
- López, Lorenzo, P. y Sanz Pérez, B. (1.962), Anal. Bromat., 14, 221.
- Luquet, F.M. (1.968), Lait, 48, (471-472), 43.
- Lusiani, G., Salvadori, B.B. y Salvadori, P. (1.971), Lait, 51

- (507), 431.
- Habbitt, L.A., (1.961), J. Dairy Res., 28, 303.
- Haleszewski, J. (1.973), Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 24, 23.
- Manolkidis, C., Polychroniadou, A. y Alichanidis, E. (1.970,a) Lait, 50, (491-492), 38.
- Manolkidis, C., Polychroniadou, A. y Alichanidis, E. (1.970,b) Lait, 50, (493-494), 128.
- Mansour, A. y Alais, Ch. (1.973), Lait, 53, (523-524), 137.
- Marcos, A. y Esteban, M.A., (1.976,a), Anal. Bromat., 23, 401.
- Marcos, A., Esteban, M.A., Espejo, P., Martínez, P. y Muñoz, T (1.977), Archiv. Zootec., 26, 189. -
- Marcos, A., Esteban, M.A. y Fdez. Salguero, J. (1.976,b), Archiv. Zootec., 25, 73.
- Marcos, A., Esteban, M.A., Fdez-Salguero, J., (1.979), Anal. Bromat., 31, 91.
- Marcos, A., Esteban, M.A., Fdez.-Salguero, J., Mora, M.T. y Millán, R. (1.976,c), Anal. Bromat., 28, 57.
- Marcos, A., Esteban, M.A., Fdz.-Salguero, J., Mora, M.T. y Millán, R. (1.976,d), Anal. Bromat. 28, 69.
- Marcos, A., Fernández Salguero, J. y Esteban, M.A. (1.978), Anal. Bromat., 30, 3.
- Marth, E.H. (1.963), J. Dairy Sci., 46, 869.
- Martínez-Moreno, J.L. (1.976), Anal. Inst. Nac. Invest. Agrar. (4).
- Martínez-Moreno, J.L. (1.977), Rev. Esp. Lech., (183), 3.
- Martínez-Moreno, J.L. y Núñez, M. (1.976), Anal. Inst. Nac. Invest. Agrar. (4).
- Martins, J.F.P. (1.976), Dollettin do Instituto de Tecnologia de Alimentos Brazil, 45, 1.
- Martley, F.G. Jayashankar, S.R. y Lawrence, R.C. (1.970),

- J. Appl. Bact., 33, 363.
- Maret, R., Sozzi, T. y Bohren, H. (1978), XX Int. Dairy Congress, E, 535.
  - Massó Lago, J. (1974), Alimentaria, 11, 57
  - Matallana, S. ( 1960 ), Rev. Esp. Lech. (38), 163.
  - Mayayo, M.M., Sanz-Pérez, B., López-Lorenzo, P. y Tormo, S. (1.976), Alimentaria, 13, 49.
  - Mazur, P. (1.966), Capítulo 6. En: Cryobiology. Edited by Meryman, Academic Press N.Y.
  - McDonald, I.J. (1.955), Can. J. Microbiol., 1, 653.
  - Mehlenbacher, V.C. y Hopper, T.H. (1.955), Official and tentative methods of the American oil Chemist Society. Ed. by American oil Chemist Society Illinois, U.S.A.
  - Mietton, B., Pernodet, G., Sageaux, R. y Tinguely, P., (1.978) XX Int. Dairy Congress, E., 587.
  - Mitic, S. (1.976) Cryobiology, 13, 214.
  - Müller-Madsen, A., y Hansen, K. (1.976), Besetring fra Statens Forsøgsmejeri, (218), 20.
  - Mora, M.T., (1.978), Datos no publicados.
  - Morichi, T. (1.974), Japan Agricultural Research Quarterly, 8 171.
  - Mourgues, R., Vassal, L., Auclair, J., Mocquot, G. y Vaudewegh, J. (1.977), Lait, 57, (563-564), 131.
  - Murthy, G.K. y Rhea, W. (1.968). J. Dairy Sci. 51, 610.
  - Nakanishi, T. y Tokita, F. (1.958), Tohoku. J. Agr. Research. 2, 37.
  - Nashif, S.A. y Nelson, F.E. (1.953,a) J. Dairy Sci., 36, 459.
  - Nashif, S.A. y Nelson, F.E. (1.953,b) J. Dairy Sci., 36, 471.
  - Naylor, J. y Sharpe, M.E. (1.958), J. Dairy Res., 25, 92.
  - Nelson W.O. (1.953), J. Dairy Sci., 36, 143.
  - Niki, T., Yoshioka, Y. y Ahiko, K. (1.966). XVII Int. Dairy

- Congress, D-2.
- Nikolaev, B.A. y Abdulline, B.H. (1.969), Molotch. Promychlenn. Moscov (7), 27.
- Norme Internationale Fil-IDF 3 (1.958).
- Norme Internationale Fil-IBF 4 (1.958).
- Norme Internationale Fil-IDF 43 (1.967).
- Norme Internationale Fil-IDF 50 (1.969).
- Norme Internationale Fil-IDF 73 (1.974).
- Núñez, M. (1.976), Anal. Inst. Nac. Invest. Agrar., (4).
- Núñez, M. (1.978), J. Dairy Res., 45, 501.
- Núñez, M. y Martínez-Moreno, J.L. (1.976), Anal. Inst. Nac. Invest. Agrar., (4).
- Núñez, M. y Medina, M. (1.979), Lait, 59, (593), 497.
- Núñez, M. y Medina, M. (1.980), Lait, 60, (593-594), 171.
- Oehen, V. y Ritter, P., (1.964), Schweiz. Milchzeitung, (14), 90.
- Ohmihya K. y Sato, Y. (1.967) Agr. Biol. Chem., 31, 1313.
- Ohmihya, K. y Sato, Y. (1.968) Agr. Biol. Chem. 32, 291.
- Ohmihya, K. y Sato, Y. (1.969) Agr. Biol. Chem., 33, 669.
- Ohmihya, K. y Sato, Y. (1.970,a) Agr. Biol. Chem., 34, 457.
- Ohmihya, K. y Sato, Y. (1.970,b) Agr. Biol. Chem., 34, 1463.
- Ohmihya, K. y Sato, Y. (1.972) Milchwiss., 27, 417.
- Ojeda, E. (1.969), Rev. Esp. Lech. (74), 183.
- O'Keefe, R.B., Fox, P.F. y Daly, C. (1.976,a) Irish Journal of Agricultural Research. 15, 151.
- O'Keefe, R.B., Fox, P.F. y Daly, C. (1.976,b) J. Dairy Res., 43, 97.
- O'Keefe, R.B., Fox, P.F. y Daly, C. (1.978) J. Dairy Res., 45, 465.
- Ordóñez, J.A., Barneto, R. y Marmol, M.P. (1.978,a) Anal. Bro--

- mat., 30, 361.
- Ordóñez, J.A., Barneto, R. y Ramos, M. (1.978,b), XX Int. Dairy Congress, E. 573.
- Ordóñez, J.A., Barneto, R. y Ramos, M. (1.978,c) Milchwiss, 33, 609.
- Ordóñez, J.A. y Burgos, J. (1.977,a) Lait, 57, (563-564), 150.
- Ordóñez, J.A. y Burgos, J. (1.980,a) Milchwiss, 35, 69.
- Ordóñez, J.A., Massó, J.A., Mármol, M.P. y Ramos, M. (1.980,b) Lait, 60, (595-596), 283.
- Ordóñez, J.A. y Ortiz de Apocada, M. (1.977,b) Milchwiss, 32, 531.
- Ortiz de Apocada, J. y Ordóñez, J.A. (1.979), Anal. Bromat., 30, 11.
- Oterholm, A., Ordal, Z.J. y Witter, L.D. (1.968). Anal. Microbiol., 16, 524.
- Ottogalli, G., Resmini, P. y Rondinini, G. y Volonterio G. (1.973), Sci. Technol. Alim. I., 3, 43.
- Ottogalli, G. y Rondinini, G. (1.974a) Rev. Gén. Froid, (5), 443.
- Ottogalli, G. y Rondini, G. (1.974b) Industria del Latte, 10, 3.
- Overcast, W.W. y Albrecht, A. (1.952), J. Dairy Sci., 35, 554.
- Palmer, H., Isichi, K., Cimos, S. y Rofe, M. (1.969), Food Technol., 23, 1486.
- Park, J.L., Kim, W.J. y Song, K.W. (1.975), Korean Journal of Animal Science, 17, 155.
- Park, J.L., Kim, Y.J. y Song, K.W. (1.978), Korean Journal of Animal Science, 20, 200.
- Payens, A.J. (1.958), Neth. Milk Dairy J., 12, 99.
- Peláez, M.C. (1.978), Tesina de Licenciatura, Fac. de Ciencias

- Biológicas, Univ. Complutense. Madrid.
- Perry, K.D. (1.961), J. Dairy Res., 28, 221.
- Perry, K.D. y Sharpe, M.E. (1960), J. Dairy Res., 27, 267.
- Perry, K.D. y M<sup>C</sup> Gillivray, W.A. (1964), J. Dairy Res., 31, 155.
- Peterson, A.C., y Johnson, M.J. (1949), J. Bact. 58, 701.
- Petenou, A.C. y Cuinderson, M.F. (1960) Appl. Microbiol., 8, 93.
- Pettinau, M. y Nuvoli, G. (1972), Scienza e Tecnica Lattiero-Casaria, 23, 216.
- Phelan, J.A., Guiney, J. y Fox, P.F. (1973), J. Dairy Res., 40, 105.
- Piergiovanni, L. y Volonterio, G. (1978), Industria del latte 14, 41.
- Pierre, A. y Portmann, A. (1.970), Ann. Technol. Agric., 19, 107.
- Portmann, A. (1.969), Rev. Gén. Froid, 60, 583.
- Portmann, A. (1.970), Lait, 50, (493-494), 161.
- Portmann, A. (1.971), Rev. Gén Froid. 62, 1043.
- Portmann, A., Vedrenne, P., Vassal, L., Ducruet, P. y Garonet, L. (1.966, a), Tech. Lait., 14, 14.
- Portmann, A., Vedrenne, P., Vassal, L., Ducruet, P. y Garonet, L. (1.966, b), Industrie Laitiere, (228), 13.
- Portmann, A., Pierre, A. y Vedrenne, P. (1.967), XII Int. Congress of Refrigeration.
- Poznanski, S. y Rymaszewski, S. (1.965), Milchwiss, 20, 14.
- Prekoppová, J.J. (1.976), Prumysl. Potravin, 27, 573.
- Rabier, D. y Desmanzeaud, M.J. (1.973), Biochemie., 55, 389.
- Rajorhia, G.S., Srinivasan, M.R. y Chander, M. (1.980), Indian Journal of Dairy Science., 31, 116.
- Ramos, M. (1.978), XVII Bienal Real Soc. Esp. Quim. Trabajo, Madrid.

- Ramos, M. y Jiménez S. (1.981), Comunicación personal.
- Ramos, M. y Martínez-Castro, I. (1.976), Lait, 56, (553-554), 169.
- Reiter, B., Fryer, T.F., Pickenng, A., Chapman, M.R., Lawrence R.C. y Sharpe, M.E. (1.967), J. Dairy Res., 34, 257.
- Reiter B., Sorokin, Y., Pickenng, A. y Hall, A.Y. (1.969), J. Dairy Res., 36, 65.
- Reville, W.J., y Fox, P.F. (1.978), Irish Journal of Food Science and Technology, 2, 67.
- Richards, E. (1.967), Dairy Inds., 32, 822.
- Ritter, W., Schmidt, P. y Lowe, A. (1.966), XVII Int. Dairy Congress, D, 269.
- Rogosa, M., Mitchell, J.A. y Wiseman, R.F. (1.951), J. Dact., 62, 132.
- Román Piñana, M. (1.975), Lait, 55, (547), 401.
- Robertson, P.S. y Perry, K.D. (1.961), J. Dairy Res, 28, 245.
- Ropp, M. (1.969), Milchwiss, 24, 208.
- Rosset, R., Meziane, Y. y Roussel-Ciquar, N. (1.974), Serie Syntheses Bibliographiques, (4).
- Rossi, J. y Costamagna, L. (1.974), Annali della Facolta di Agraria dell'Università di Perugia, 29, 501.
- Rousseaux, P., Vassal, L., Vallés, E., Auclair, J. y Mocquot, G. (1.968), Lait, 48, (475-476), 241.
- Rflegg, M. y Blanc, B. (1.977), Milchwiss, 32, 193.
- Sasaki, R. y Nakae, T. (1.959), Japan J. Zootech. Sci., 30, 7.
- Sato, Y. y Ohmihya, K. (1.966), Agric. Biol. Chem., 30, 731.
- Sato, Y. y Nakashima, I. (1.965), Agric. Biol. Chem., 29, A, 29.
- Schmidt, R.H. (1.974), Tesis. Universidad de Minesota.
- Schmidt, J.L. y Lenoir, J. (1.972), Lait, 52, 536.

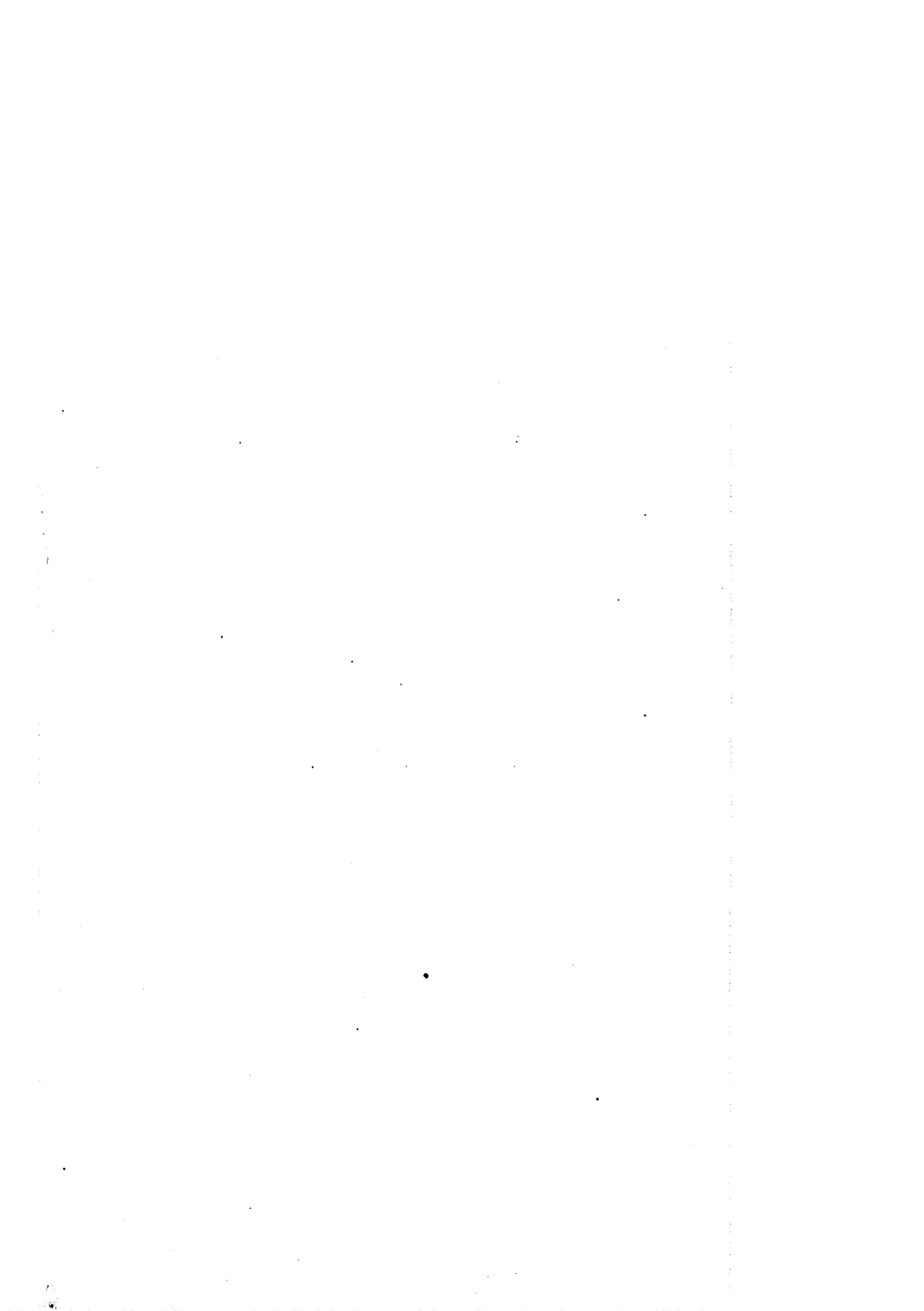
- Seitz, E.W. (1.974), Journal of the American Oil Chemist. Society, 51, 12.
- Shannon, C.W. (1.975), Diss. Abst. Int. B, 35, 5935.
- Shahani, K.M., Arnold, R.G., Kilara, A. y Dnivedi, B.R. (1.976) Biotechnology and Bioengineering., 18, 891.
- Sharpe, E. (1.962), Dairy Sci. Abst., 24, 1109.
- Sharpe, E. y Brindley, M. (1.956), J. Dairy Res., 23, 361.
- Shindo, K. Shimazaki, K. y Sukegana, K. (1.976), Research Bulletin of Obihiro University, 10, 149.
- Shugart, L.R. y Beck, R.N. (1.964), J. Dact., 33, 536.
- Sierra G. (1.957), Antonie van Leeuwenhoek Med. Tydsdir. Hig., 23, 15.
- Silvermann, G.J. (1.954), Tesis Doctoral, Cornell University. Itaca, N.Y.
- Singh, A. y Jain, J.P. (1.976a). Indian Journal of Dairy Science, 29, 121.
- Singh, A. y Kalva, M.S. (1.975), Indian Journal of Microbiology, 15, 75.
- Singh, A. y Kristoffern, T. (1.972), J. Dairy Sci., 55, 744.
- Singh, A., Srinivasan, R.A. y Dudani, A.T. (1.973), Milchwiss., 28, 164.
- Singh, A., Srinivasan, R.A. y Dudani, A.T. (1.976b) Indian Journal of Dairy Science, 29, 61.
- Sozzi, T. y Maret, R. (1.973), Lait, 53, (525-526), 280.
- Sozzi, T. y Shepherd, D. (1.972), Lait, 52, (513-514), 203.
- Speck, H.L. y Ray, B. (1.977), J. Food. Protection, 40, 333.
- Stadhouders, J. (1.960), Neth. Milk. Dairy J., 14, 83.
- Stadhouders, J. y Langeveld, L.P.M. (1.966) XVII Int. Dairy Congr., D, 577.
- Stadhouders, J. y Mulder, M. (1.957), Neth. Milk. Dairy J.,

- 11, 164.
- Stadhouders, J. y Veringa, H.A. (1.973). Neth. Milk Dairy, J., 27, 77.
- Stephanova-Kopdratenko, M. (1.964), Milchwiss, 19, 645.
- Swartling, P. (1.968), Dairy Inds., (1), 30.
- Swartling, P. y Mattson, S. (1.953), XIII, Int. Dairy Congr., 615.
- Syrjanen H. (1.965), Karjantnote, 48, 437.
- Szczesniak, A.A., Brandt, M.A. y Friedman, H.H. (1.963), J. Food. Sci., 28, 397.
- Thatcher, F.S. y Ross, D. (1.960), Can. J. Publ. Hlth., 51, 226
- Thomas, S.B. (1.966), Milchwiss, 21, 270.
- Tiersonnier, B. (1.970), Lait, 50, 415.
- Tittsler, R.P., Sanders, G.P., Locky, H.R. y Sager, D.S. (1948) J. Dairy Sci., 31, 716.
- Tofte Jespersen, N.I. (1.966), XVII Int. Dairy Congress. D, 465
- Tokita, F. y Hosono, A. (1.976), Japon J. Zotech. Sci., 47, 277.
- Tomaszewska, J. (1.978), XI Int. Dairy Congr., E, 472.
- Tourneur, C. (1.972), Lait, 52, (513-514), 149.
- Tsujisaka, Y., Iwai, M., Tominaga, Y. (1.973), Agric. Biol. Chem., 37, 1457.
- Tuckey, S.L., Sliler, M.E., Ordal, Z.J. y Witter, L.D. (1.964) J. Dairy Sci., 47, 604.
- Umanski, M.S., Borovkovaya, A. y Klimovskii, I.I. (1.974), Intensificatsiya Proiz. I. Uluchs. Kachestva Natural'nykh Syrov., USSR, Altaiskii TSNTI, 256.
- Umemoto, Y. (1.969), Agric. Biol. Chem., 33, 1651.
- Umemoto Y. y Sato, Y. (1.975), Agric. Biol. Chem., 39, 2115.
- Usajewicz, I. y Knäut, T. (1.976), Archiv. für Lebensmittelhygiene, 27, 165.

- Vafopoulou-Mestroyannaki, A. (1.977), Milchwiss, 32, 475.
- Veisseyre, R. (1.975), Technologie du lait. Ed. La Maison Rustique.
- Visser, F.M.W. (1.977), Neth. Milk Dairy J., 31, 210.
- Visser, F.M.W. y Groot-Mostert, A.E.A. (1.977), Neth Milk Dairy J. 31, 247.
- Warseck, M., Ray, B. y Speck, M.L. (1.973), Appl. Microbiol. 26, 919.
- Weckbach, L.S. (1.975) Diss Abstr. Int., 3 36, 1075.
- Weckbach, L.S. y Langlois, B.E. (1.977), J. Food Protection, 40, 857.
- West, D.W. y Towers, G.E. (1.976), Analytical Biochemist., 75 58.
- Wilcox, J.C., Nelson, W.O. y Wood, N.A. (1.955), J. Dairy Sci. 38, 775.
- Wong, N.P., Lacroix D.E. y Alford, J. (1.978), J. Am. Diet. Hss., 72, 608.
- Yano, N. y Morichi, T. (1.971), J. Food Hyg. Soc. Japon, 12, 408.
- Yaygin, H. (1.977), Ege Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi. A, 14, 41.
- Yu, J.H. y Nakanishi, T. (1.975) Japon J. Dairy Sci., 24, 155.
- Yubero Caracamo, A. (1.960), Rev. Esp. Lech. (36), 73.
- Zaidhof, K. J. y Terplan, G. (1.967) Arch. Lebensmittelhyg. 18, 27.
- Zalasko, M.V. y Mocalova, K.V. (1.969) Molotchnaia Promychnost., (3), 18.
- Zant, W.C. y Nelson, F.E. (1.954) J. Dairy Sci., 37, 795.



8. FIGURAS.



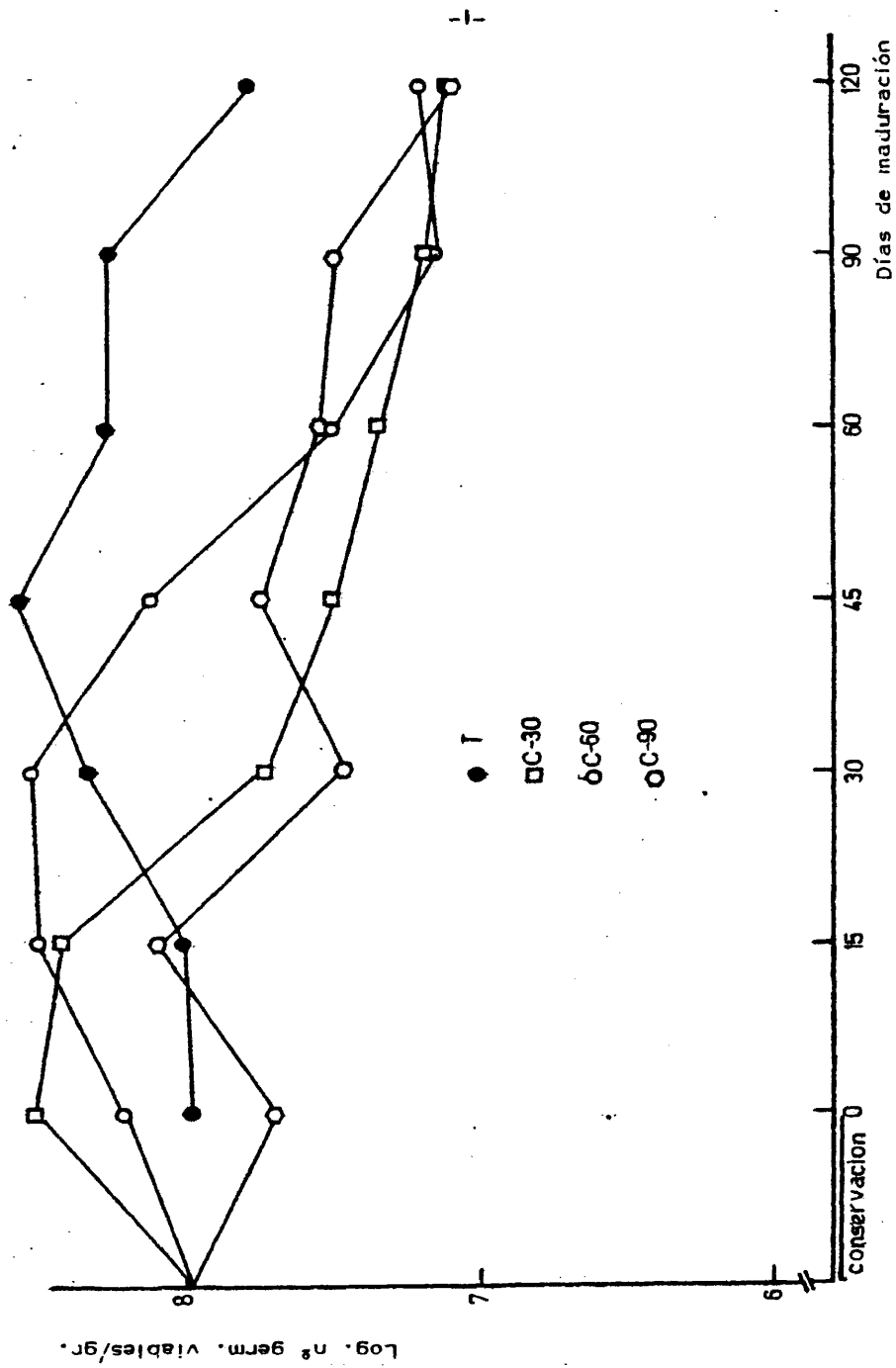


FIGURA.- 1. EVOLUCION DEL N° DE GERMENES VIABLES A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-30, C-60, C-90)

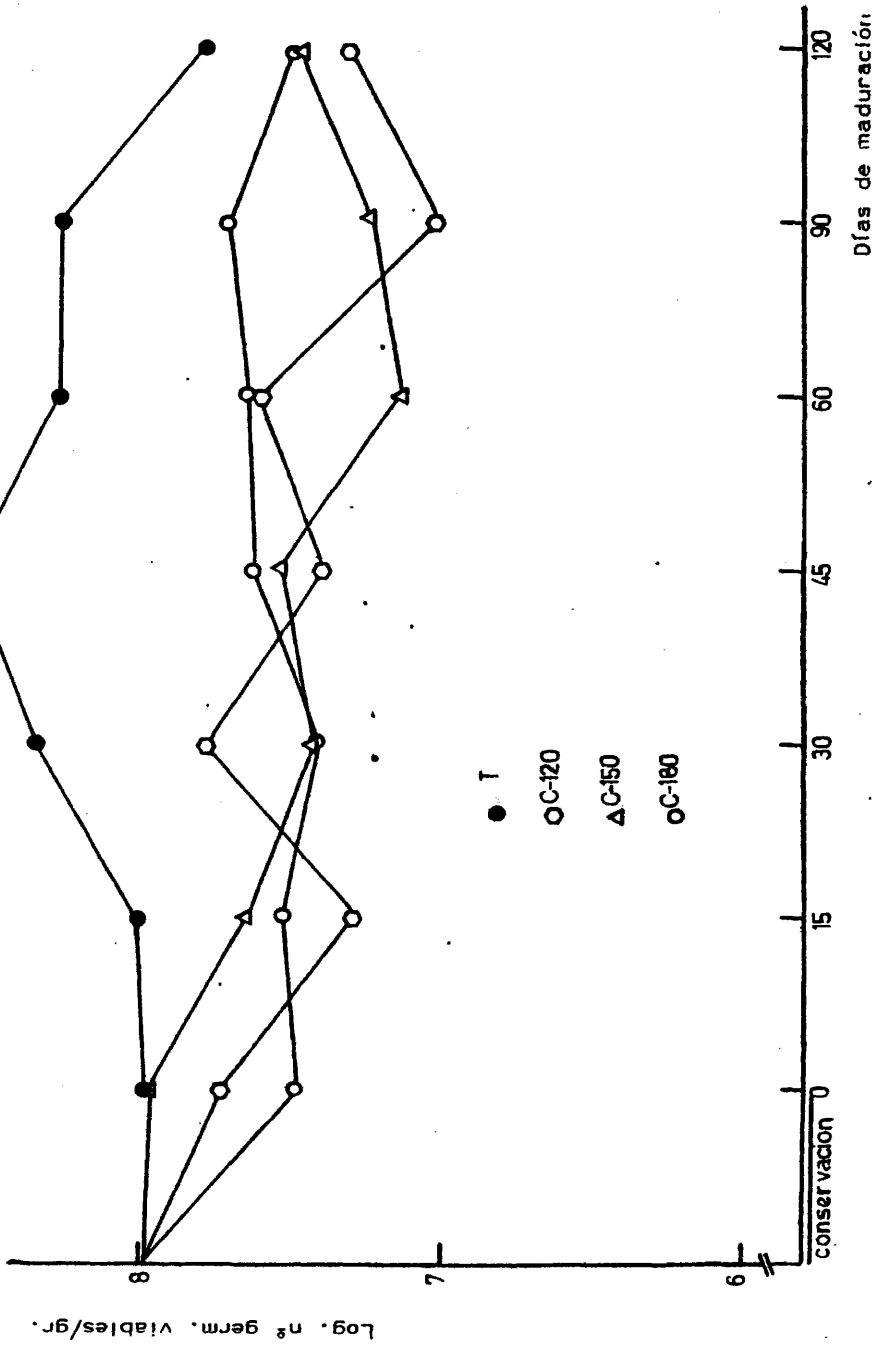


FIGURA.- 2. EVOLUCION DEL Nº DE GERMENES VIABLES A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-120, C-150, C-180)

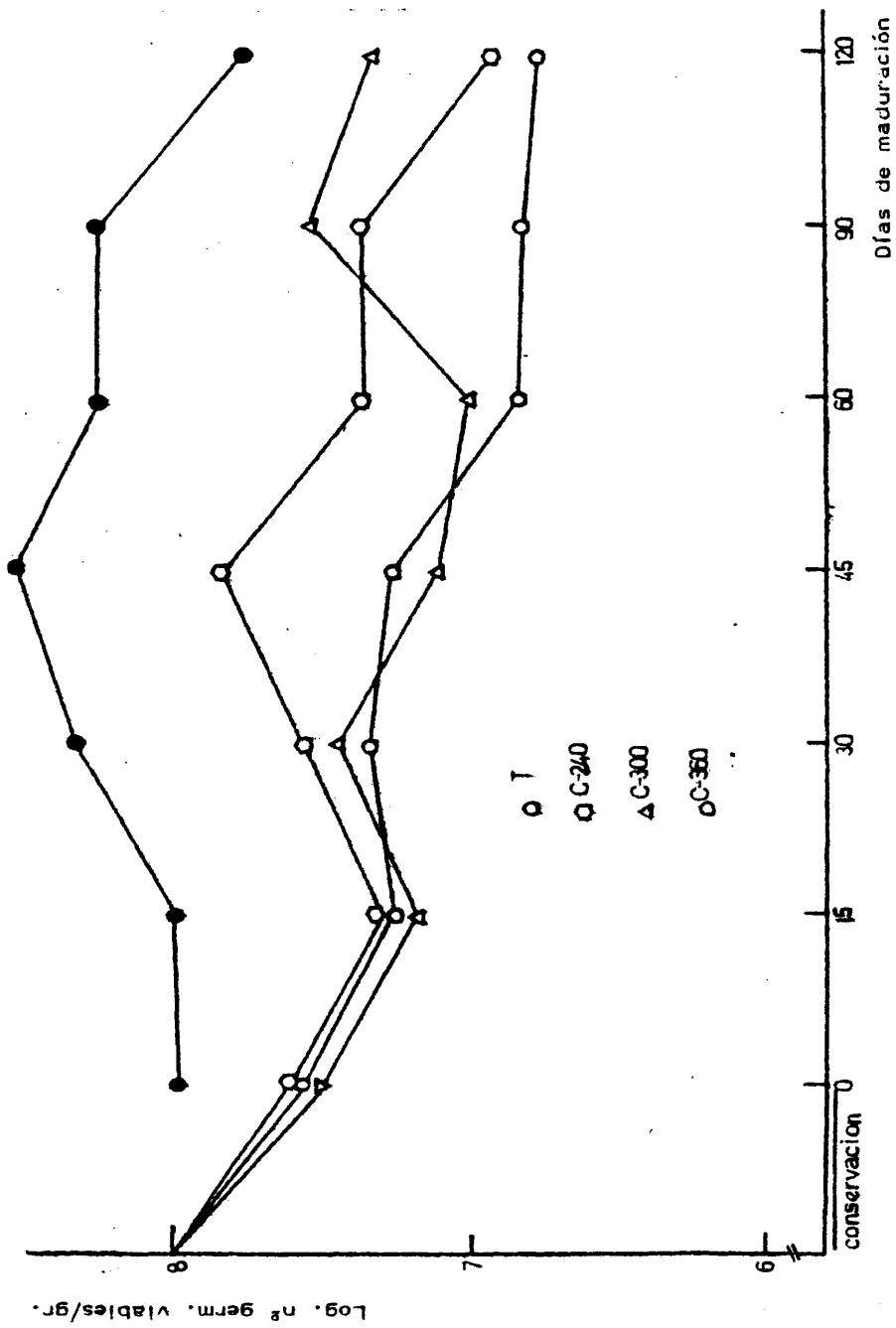


FIGURA.- 3. EVOLUCION DEL Nº DE GERMENES VIABLES A L.O LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-240, C-300, C-360)

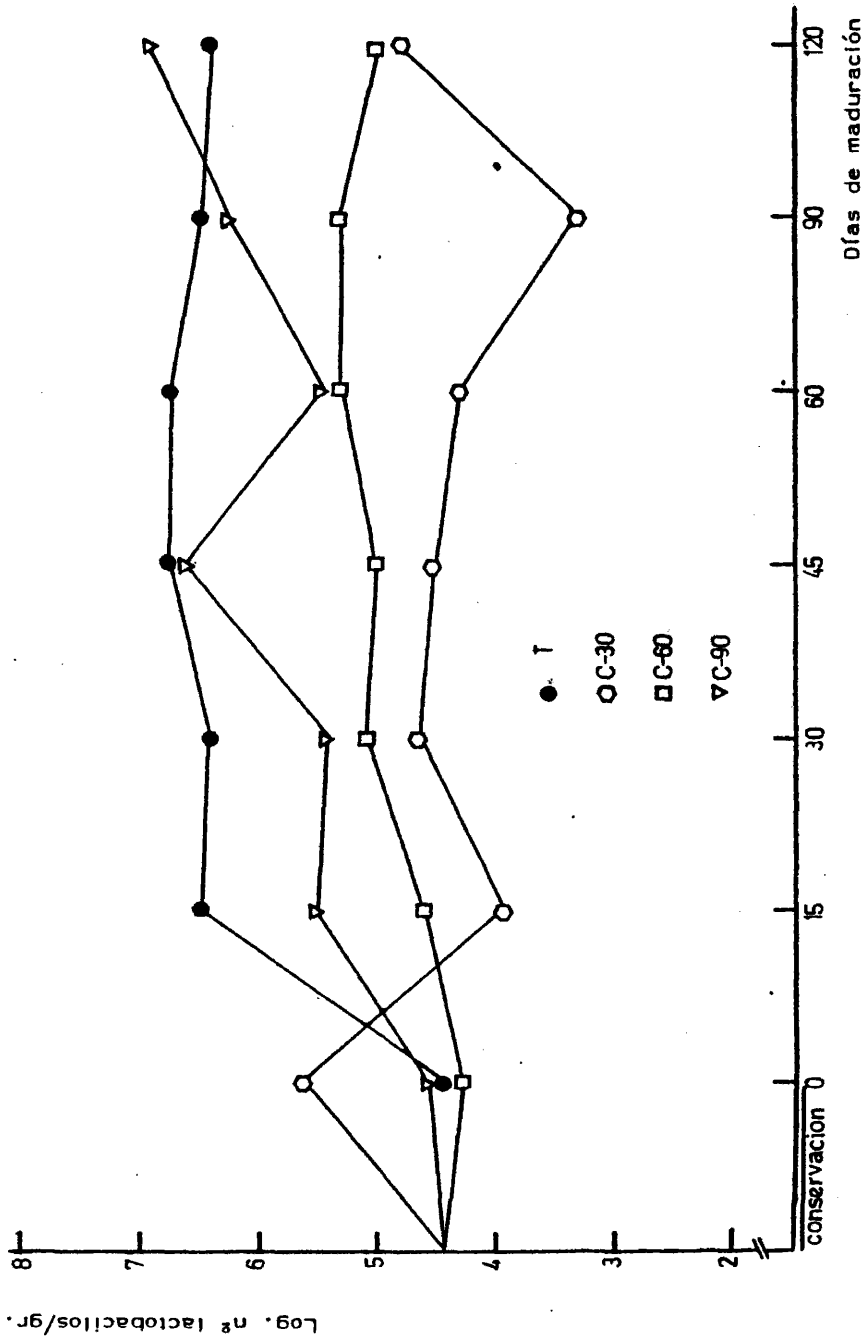


FIGURA.- 4. EVOLUCION DEL N° DE LACTOBACILOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LITES (T, C-30, C-60, C-90)

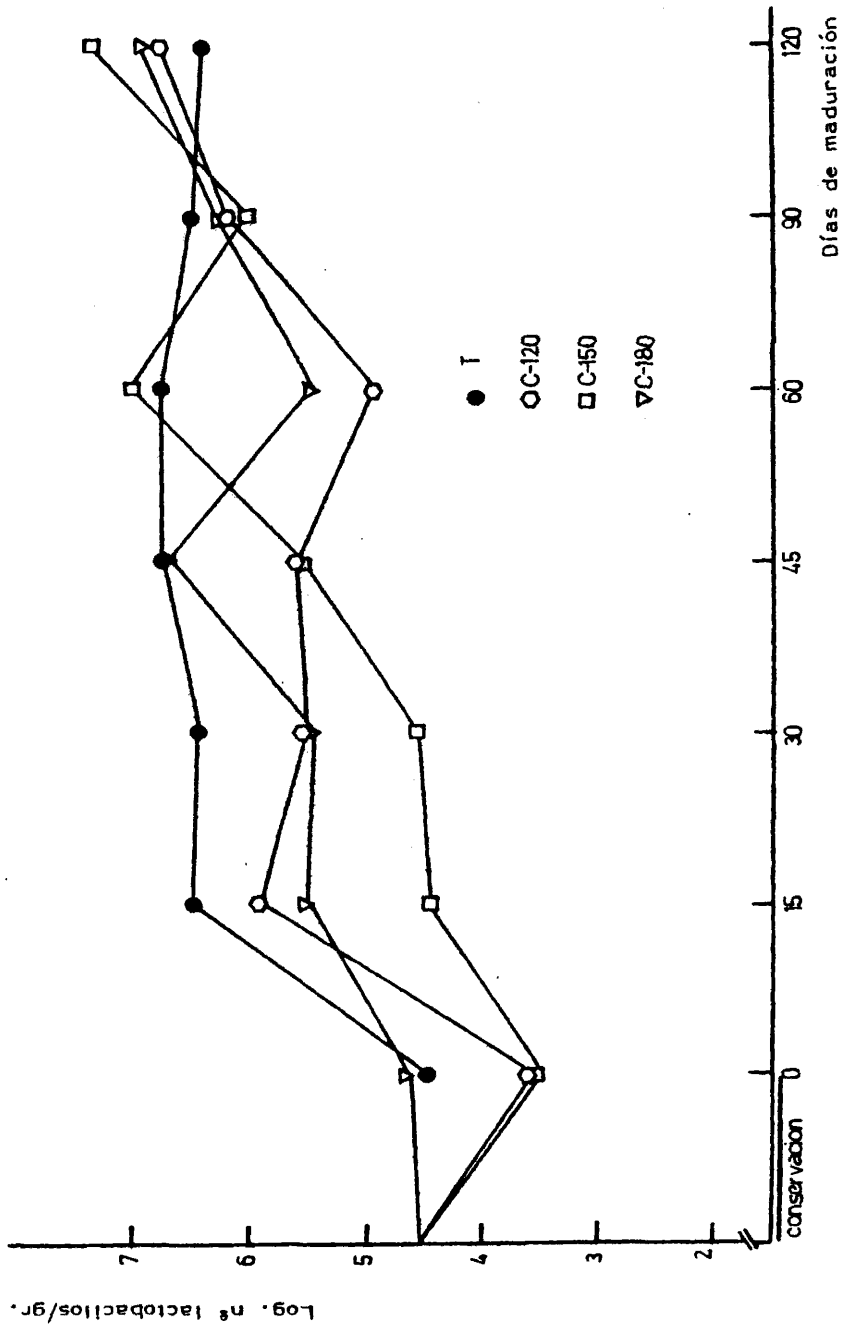


FIGURA.- 5. EVOLUCION DEL N° DE LACTOBACILOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-120, C-150, C-180)

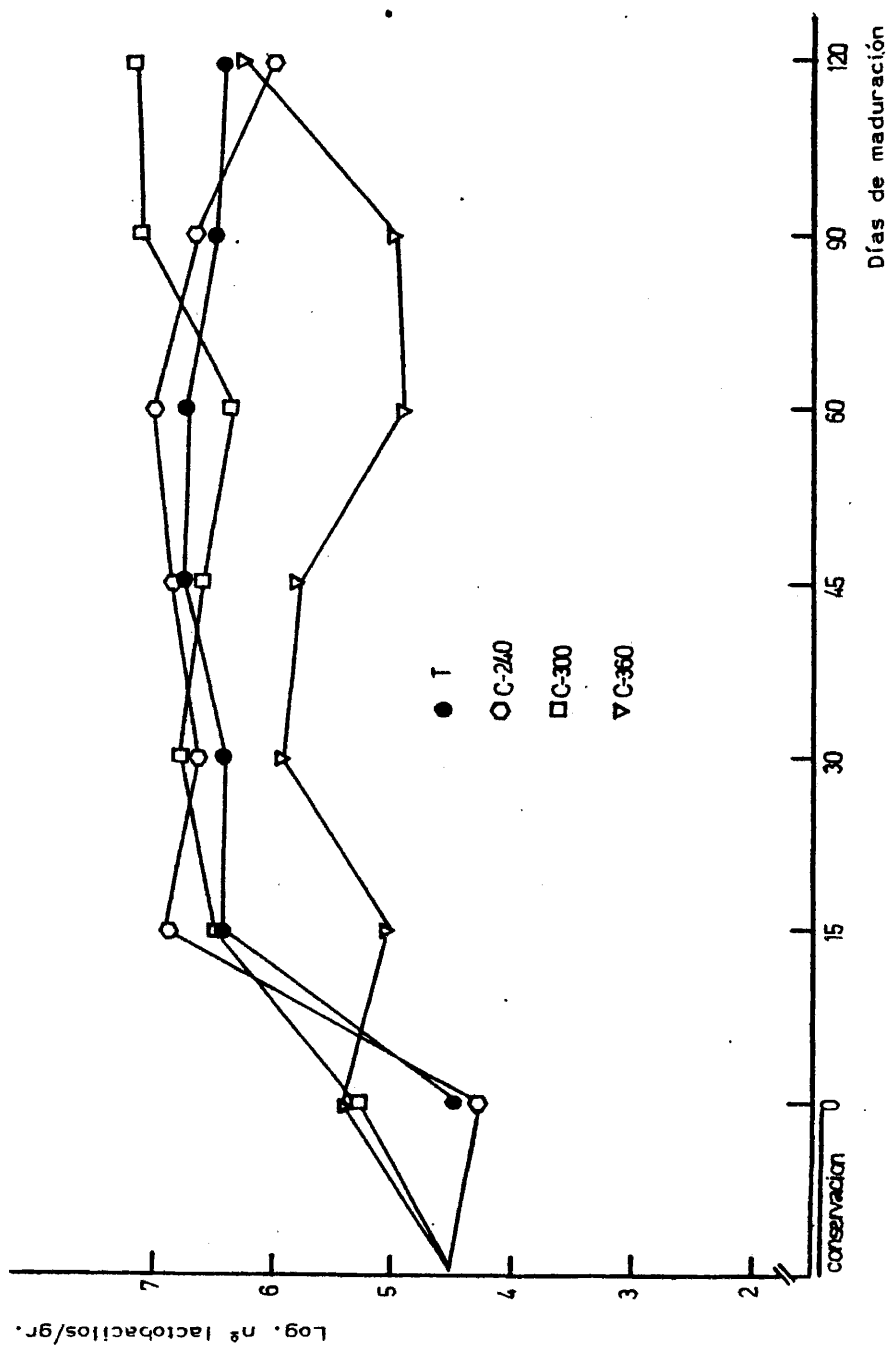


FIGURA.- 6. EVOLUCION DEL Nº DE LACTOBACILOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-240, C-300, C-360)

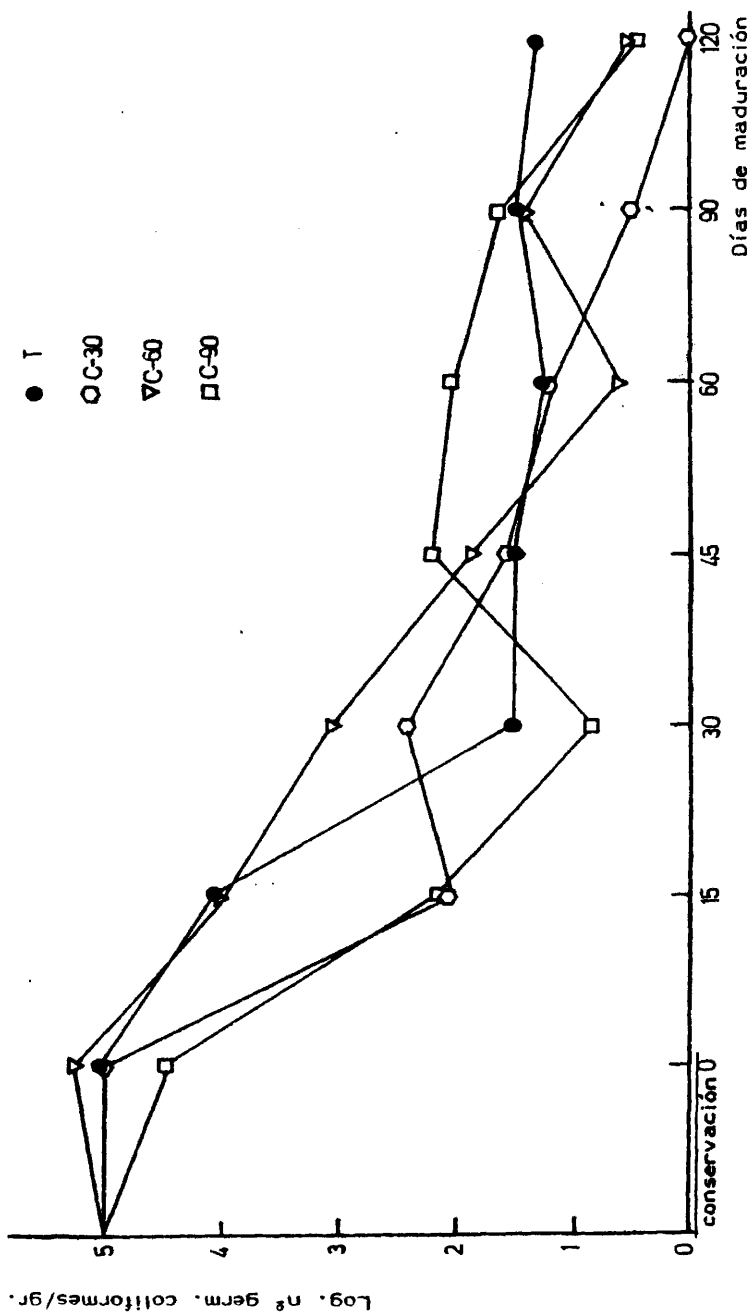


FIGURA.- 7. EVOLUCION DEL N° DE GERMENES COLIFORMES A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-30, C-60, C-90)

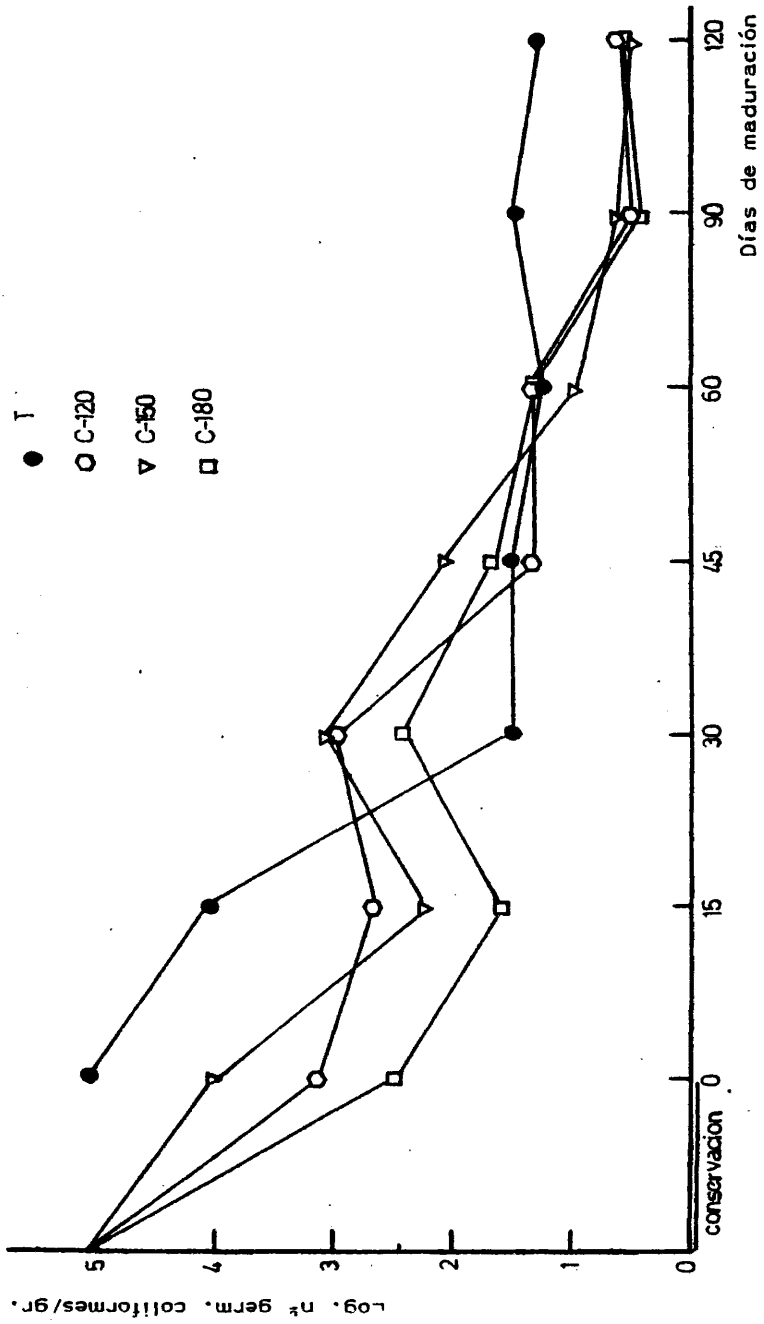


FIGURA.- 8. EVOLUCION DEL N° DE GERMINES COLIFORMES A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-120, C-150, C-180)

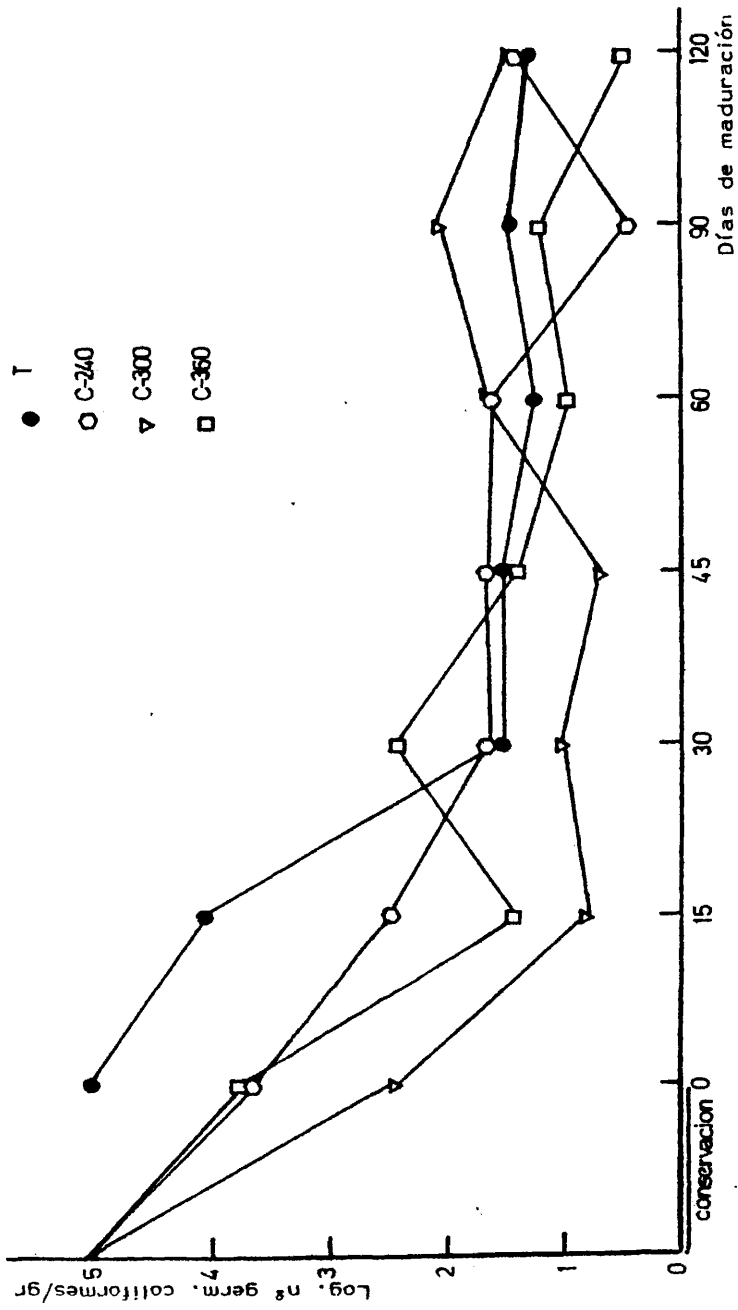


FIGURA.- 9. EVOLUCION DEL Nº DE GERMENES COLIFORMES A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-240, C-300, C-360)

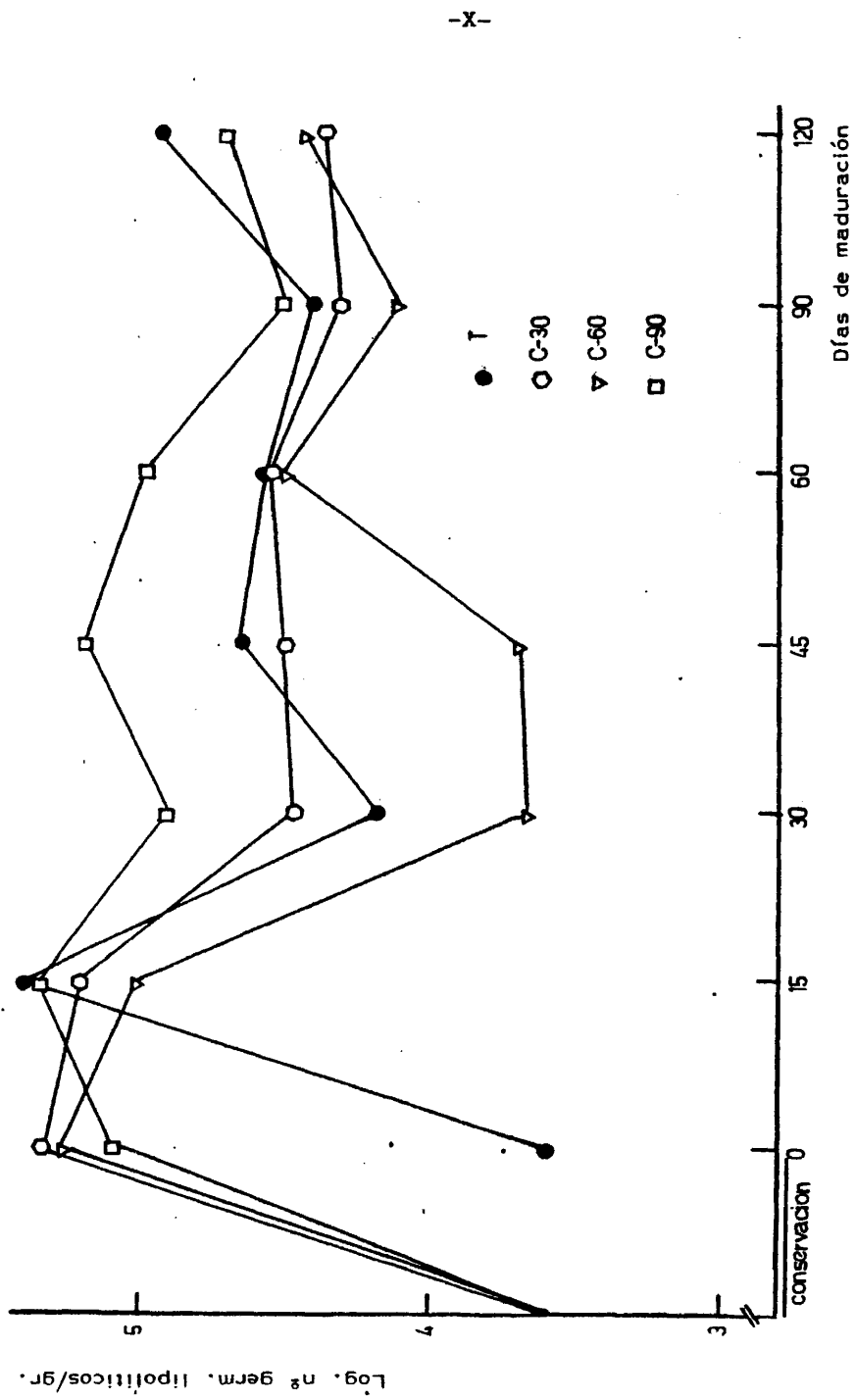


FIGURA.- 10. EVOLUCION DEL Nº DE GERMENES LIPOLITICOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-30, C-60, C-90)

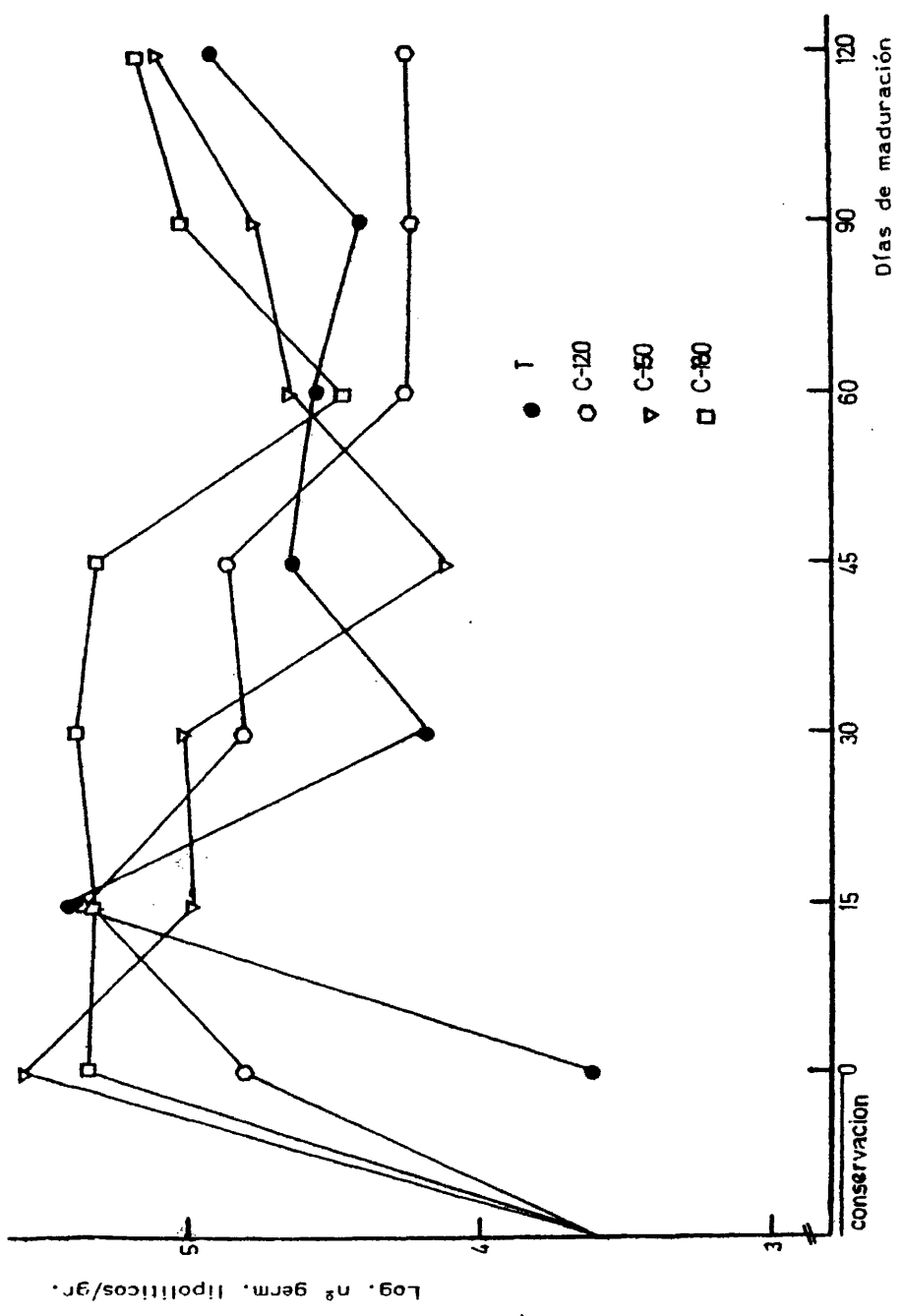


FIGURA.- 11. EVOLUCION DEL Nº DE GERMENES LIPOLITICOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-120, C-150, C-180)

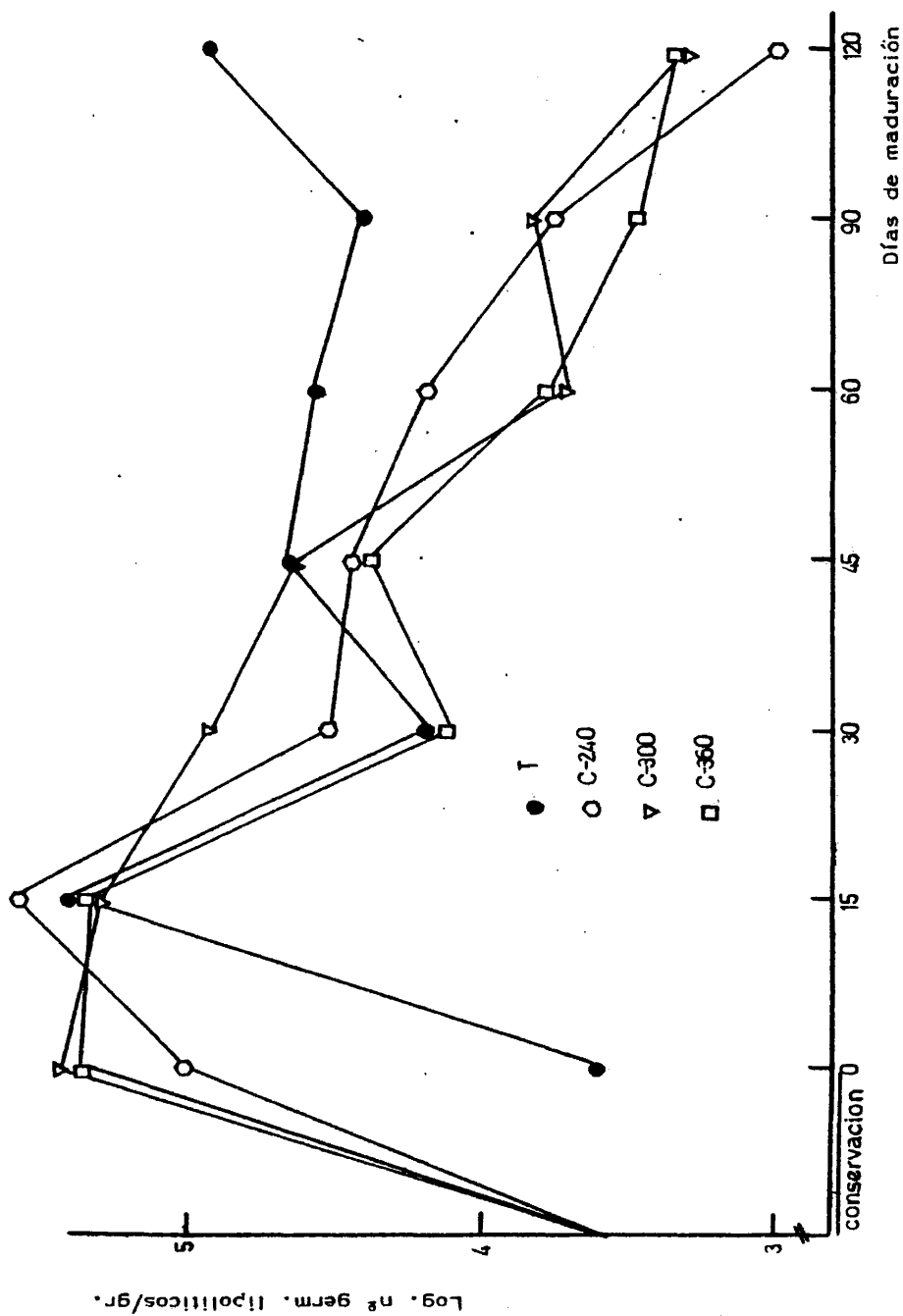


FIGURA.- 12. EVOLUCION DEL Nº DE GERMENES LIPOLITICOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-240, C-300, C-360)

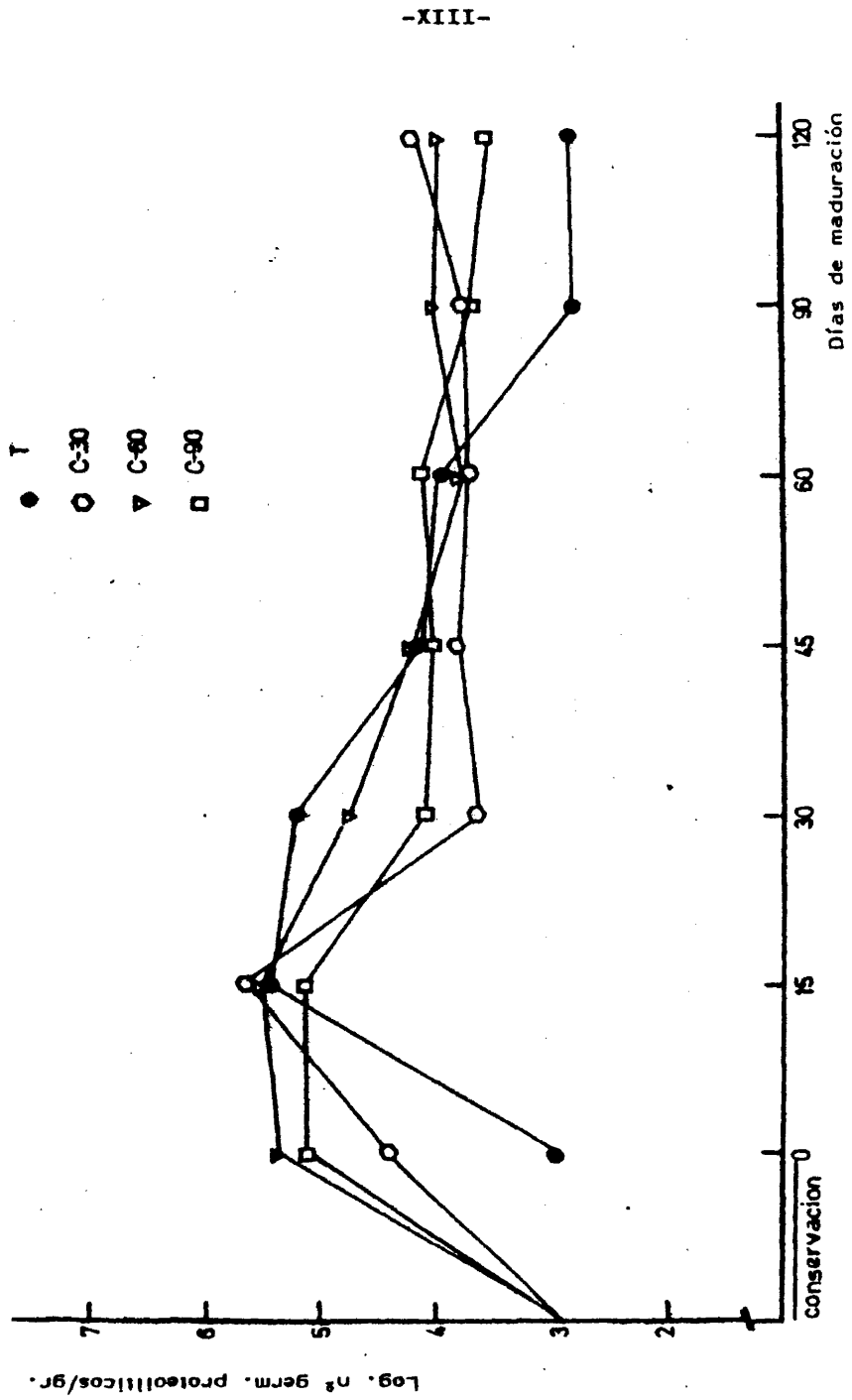


FIGURA.- 13. EVOLUCION DEL N° DE GERMENES PROTEOLITICOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-30, C-60, C-90)

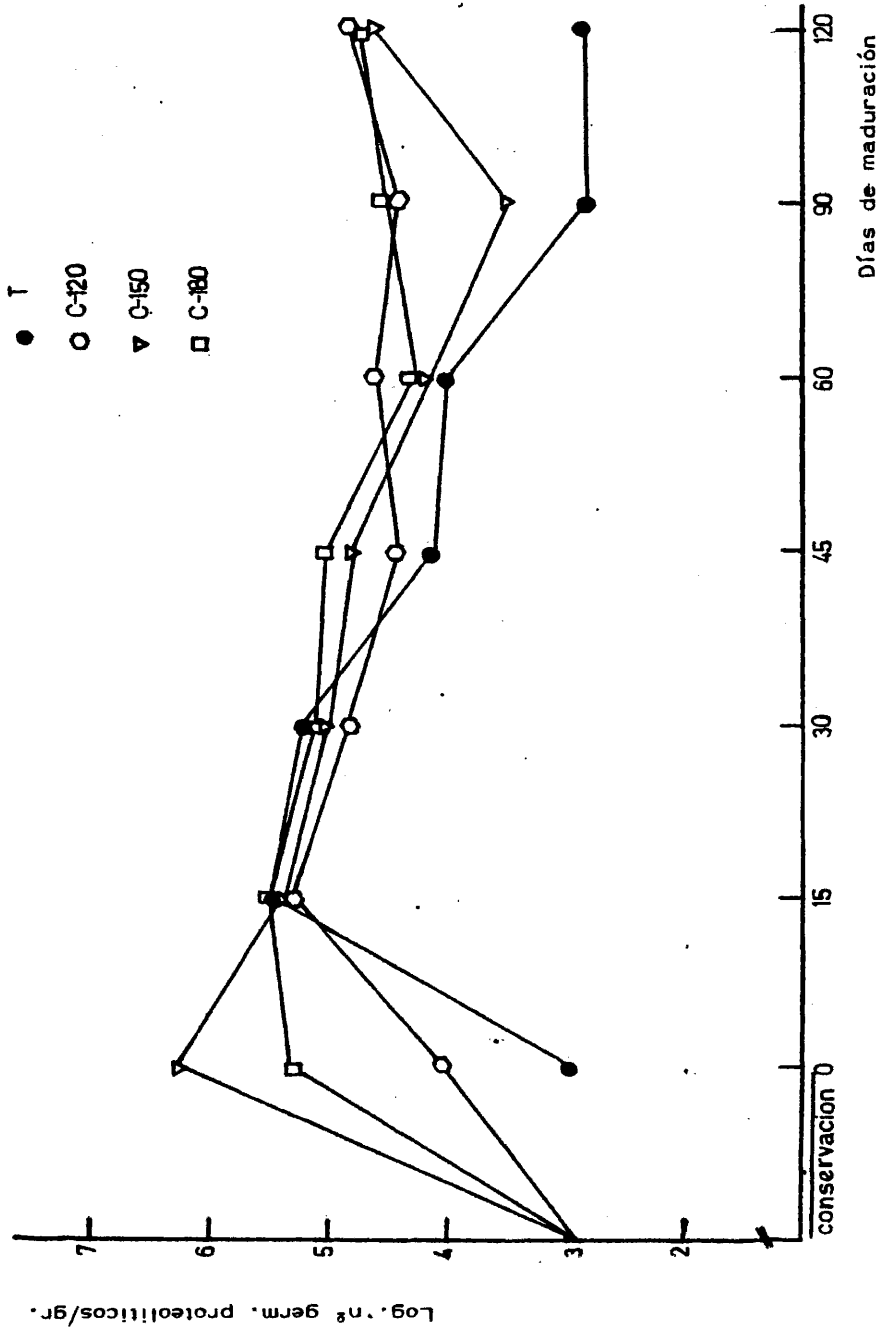


FIGURA.- 14. EVOLUCION DEL Nº DE GERMENES PROTEOLITICOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-120, C-150, C-180)

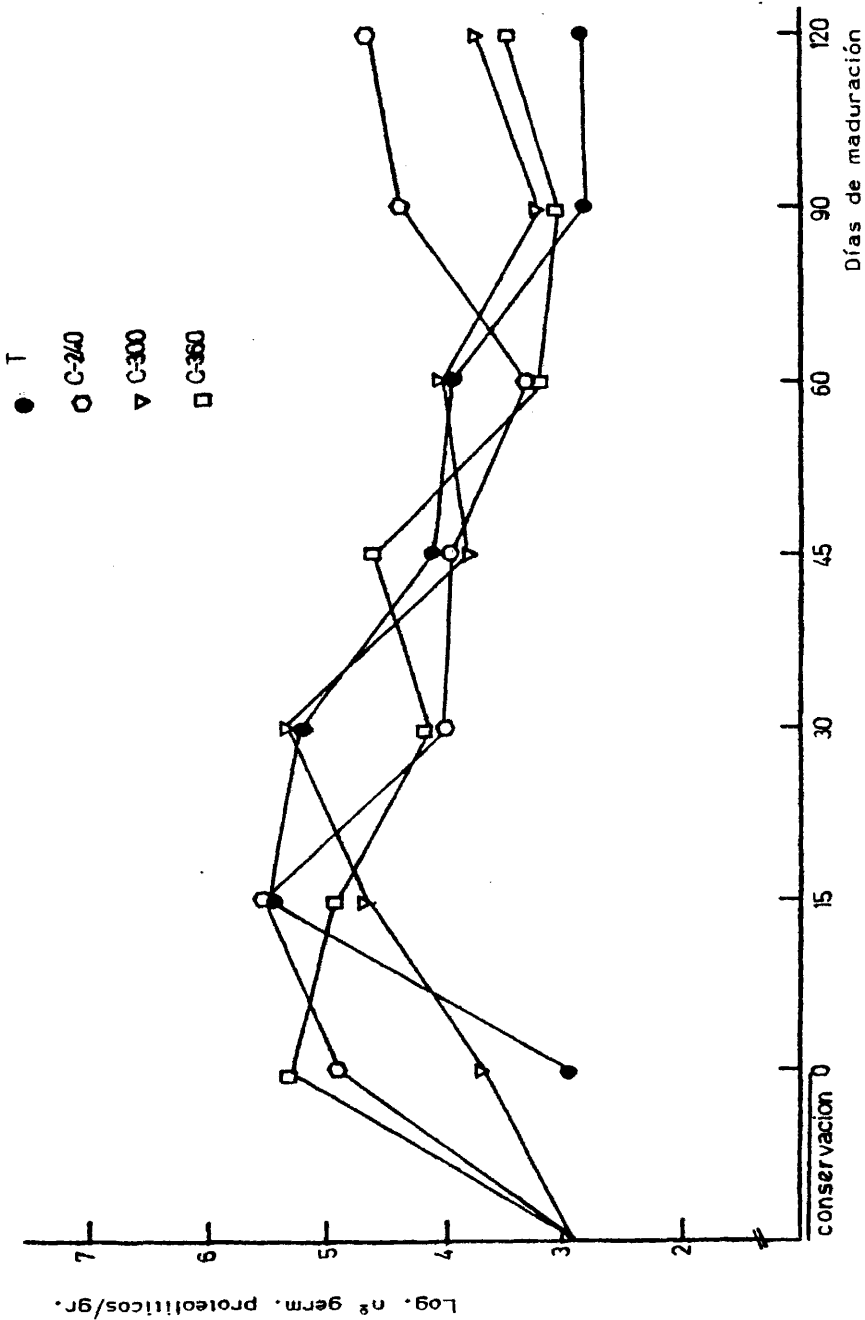


FIGURA.- 15. EVOLUCION DEL N° DE GERMENES PROTEOLITICOS A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-240, C-300, C-360)

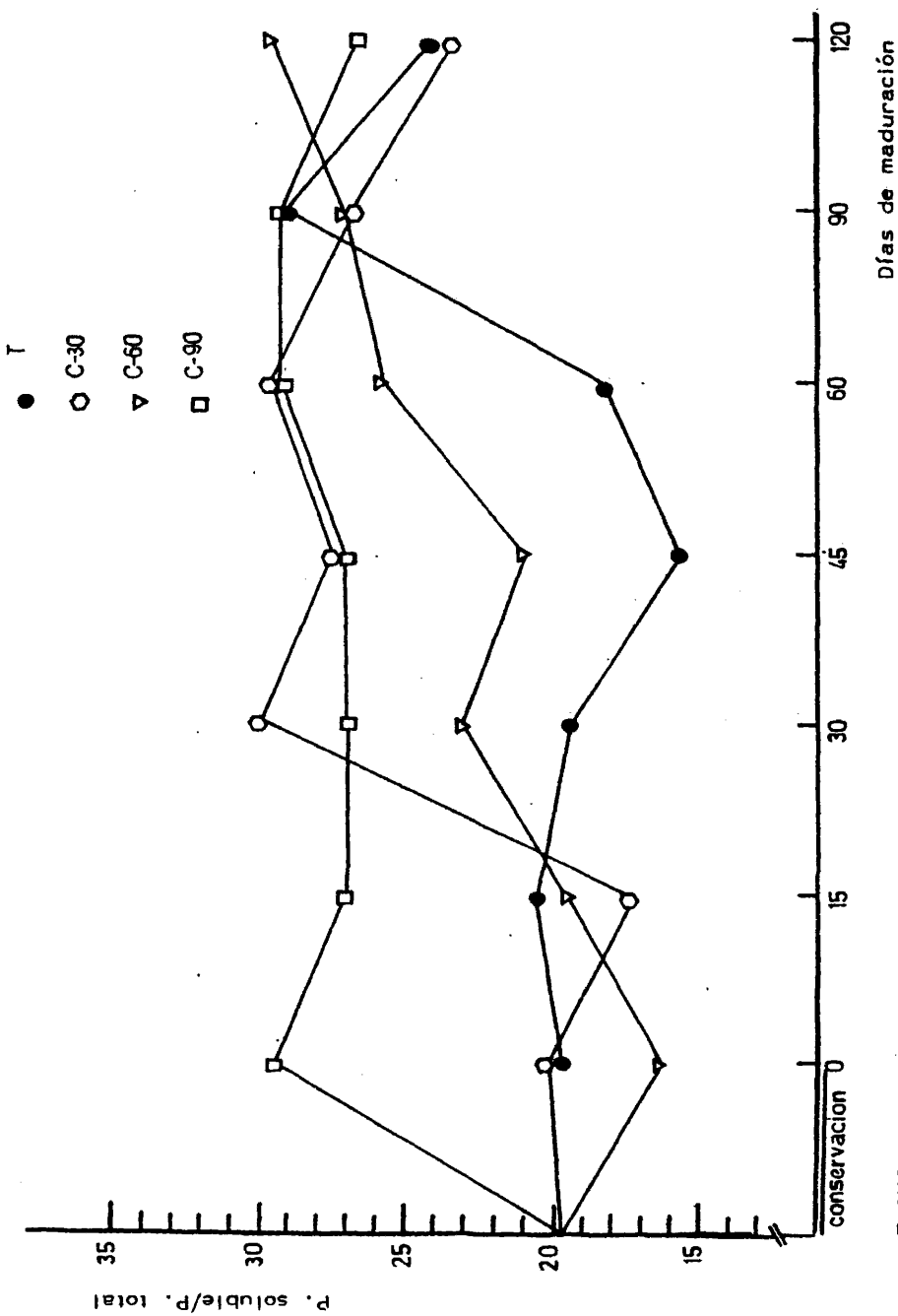


FIGURA.- 16. EVOLUCION DE LA RELACION PROTEINA SOLUBLE/PROTEINA TOTAL (Nx6.36) A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-30, C-60, C-90)

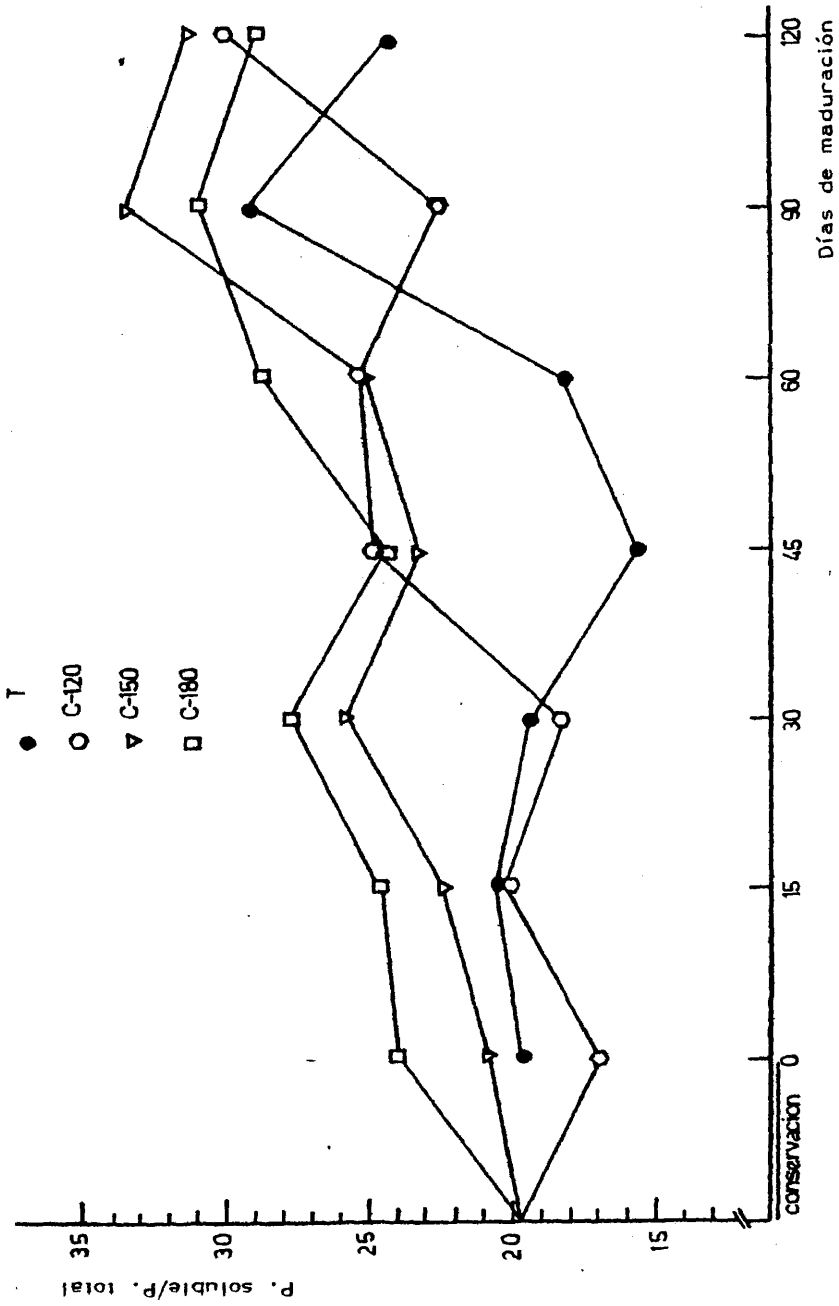


FIGURA.- 17. EVOLUCION DE LA RELACION PROTEINA SOLUBLE/PROTEINA TOTAL (Nx6.38) A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-120, C-150, C-180)

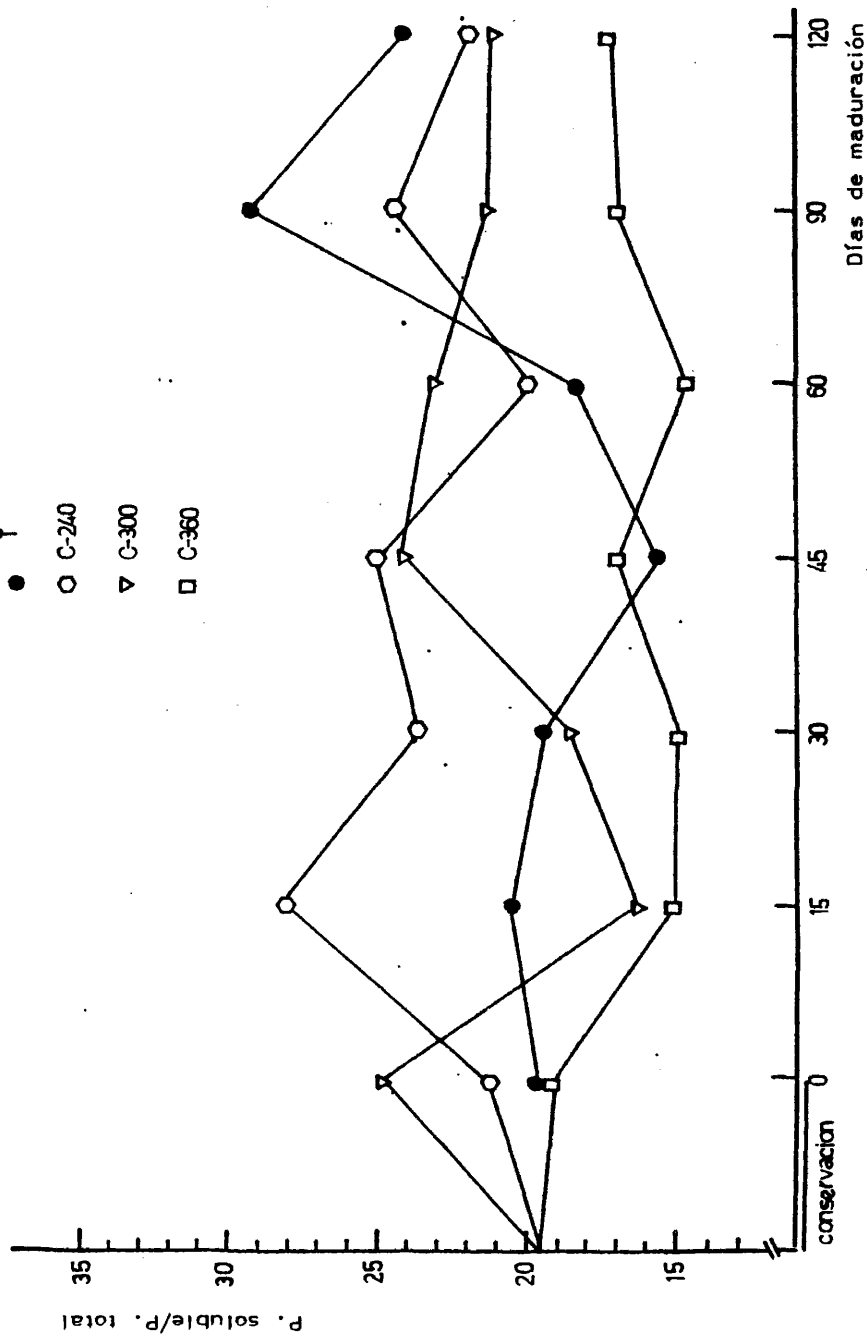


FIGURA.- 18. EVOLUCION DE LA RELACION PROTEINA SOLUBLE/PROTEINA TOTAL (Nx6.38) A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-240, C-300, C-360)

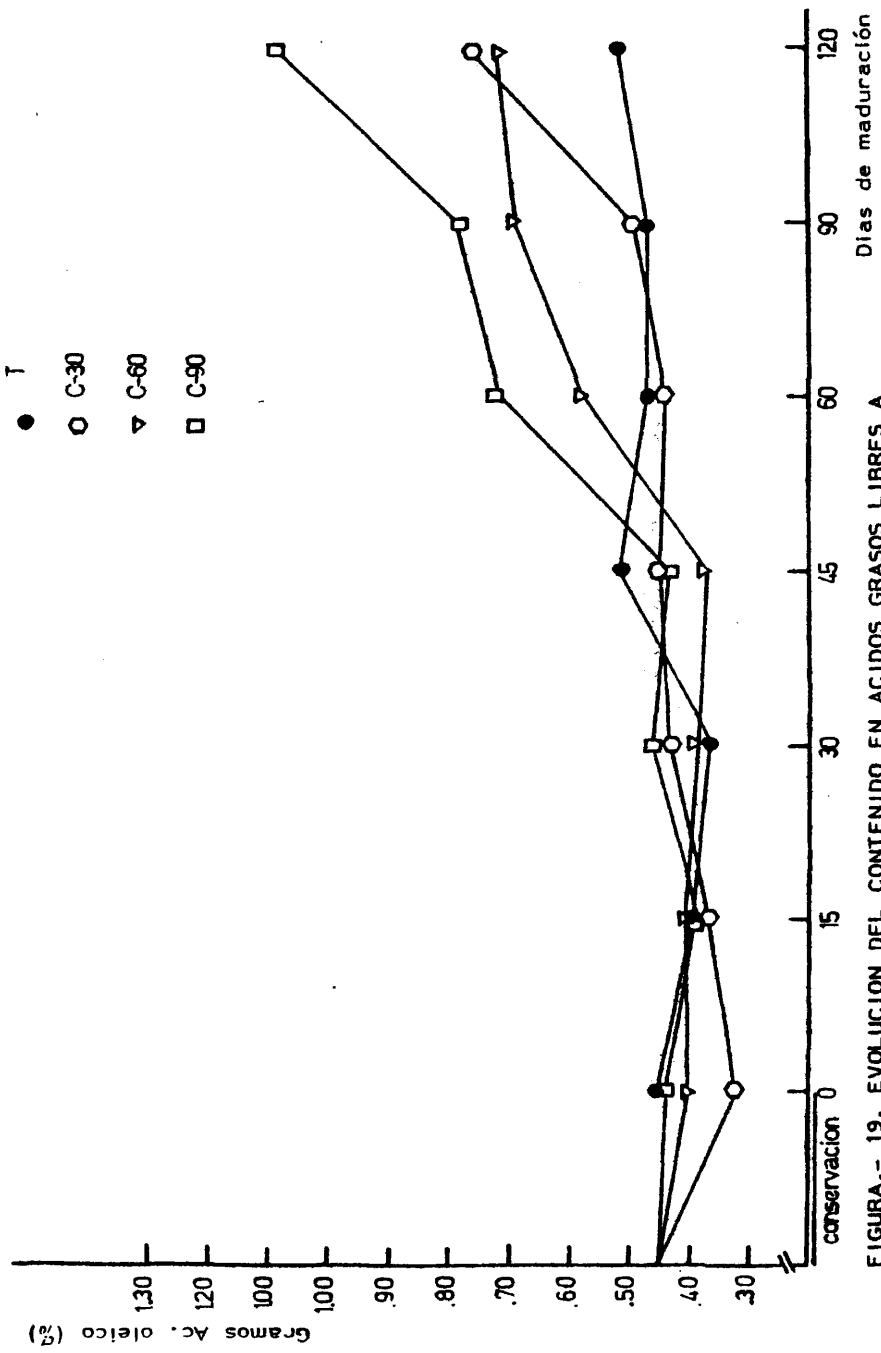


FIGURA.- 19. EVOLUCION DEL CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS LIBRES A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-30, C-60, C-90)

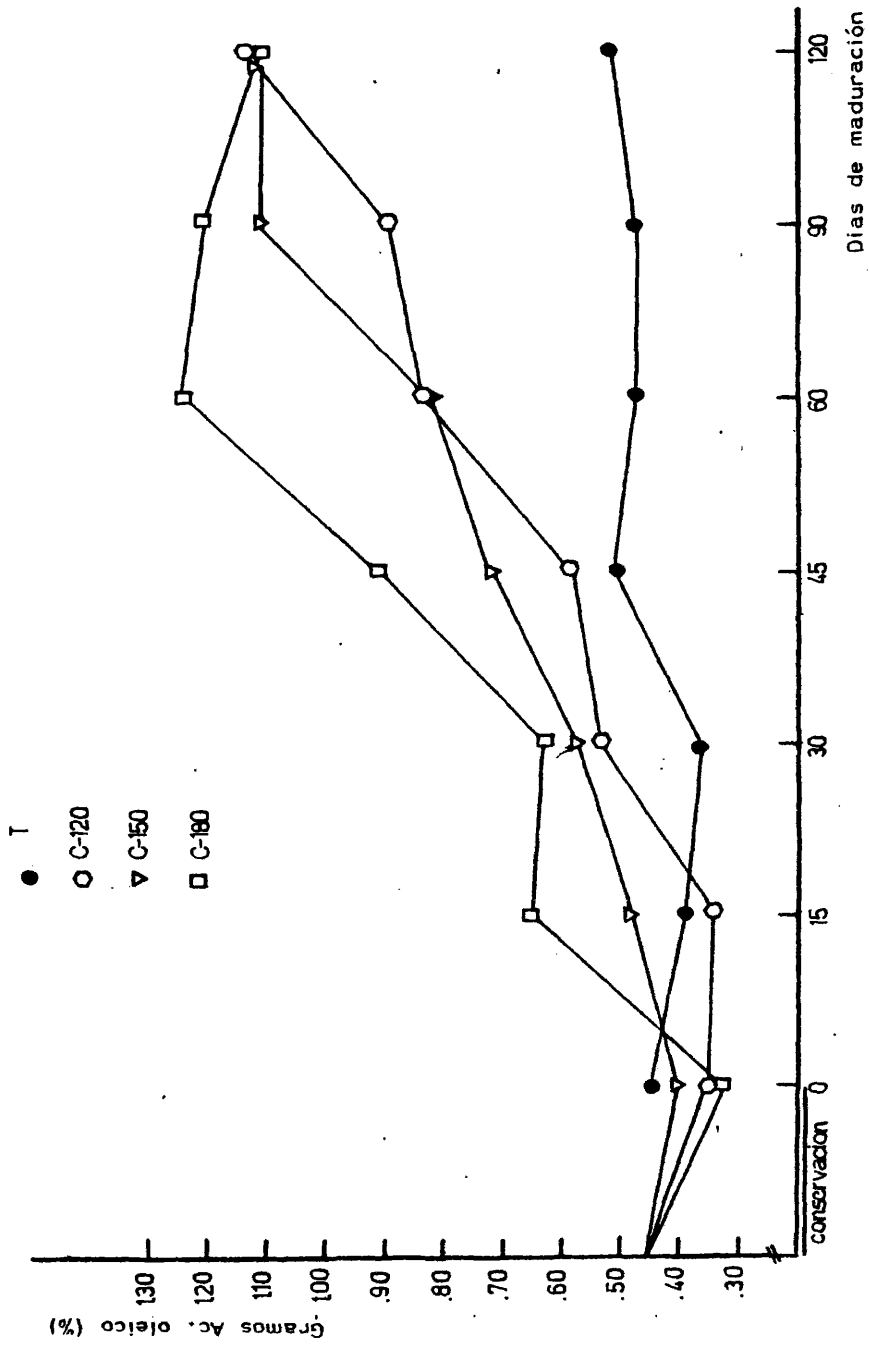


FIGURA.- 20. EVOLUCION DEL CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS LIBRES A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-120, C-150, C-180)

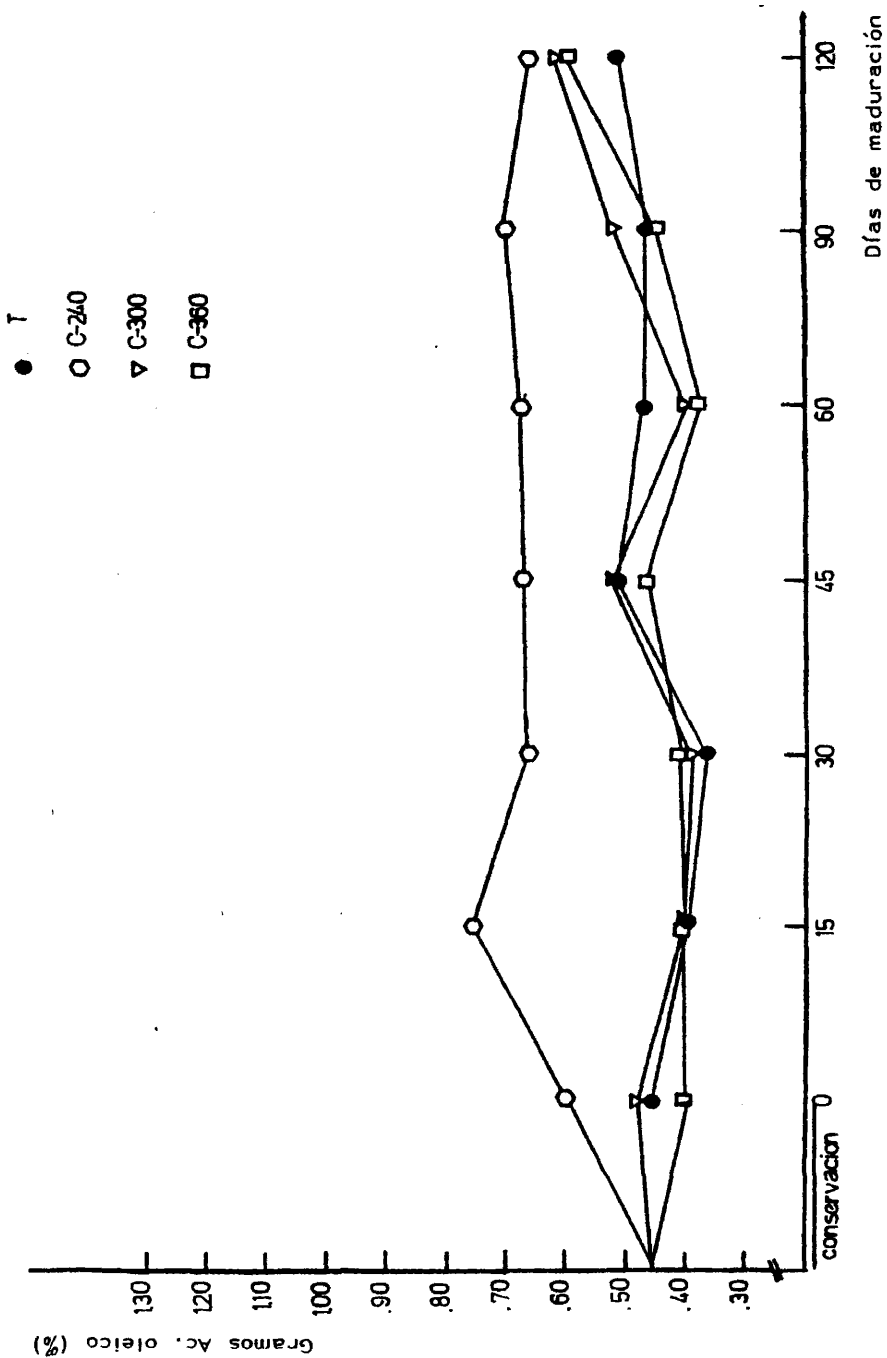


FIGURA.- 21. EVOLUCION DEL CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS LIBRES A LO LARGO DE LA MADURACION. LOTES (T, C-240, C-300, C-360)

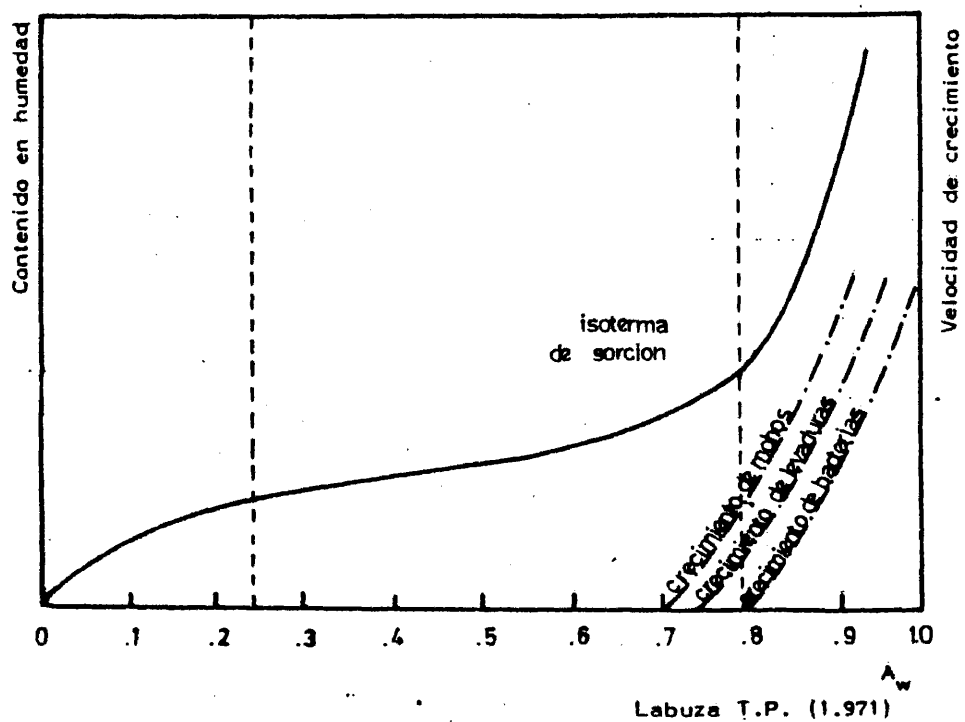


FIGURA.- 22. ISOTERMA DE SORCION Y CRECIMIENTO DE GERME-  
NES EN FUNCION DEL CONTENIDO EN HUMEDAD Y ACTIVIDAD  
DE AGUA DEL QUESO.

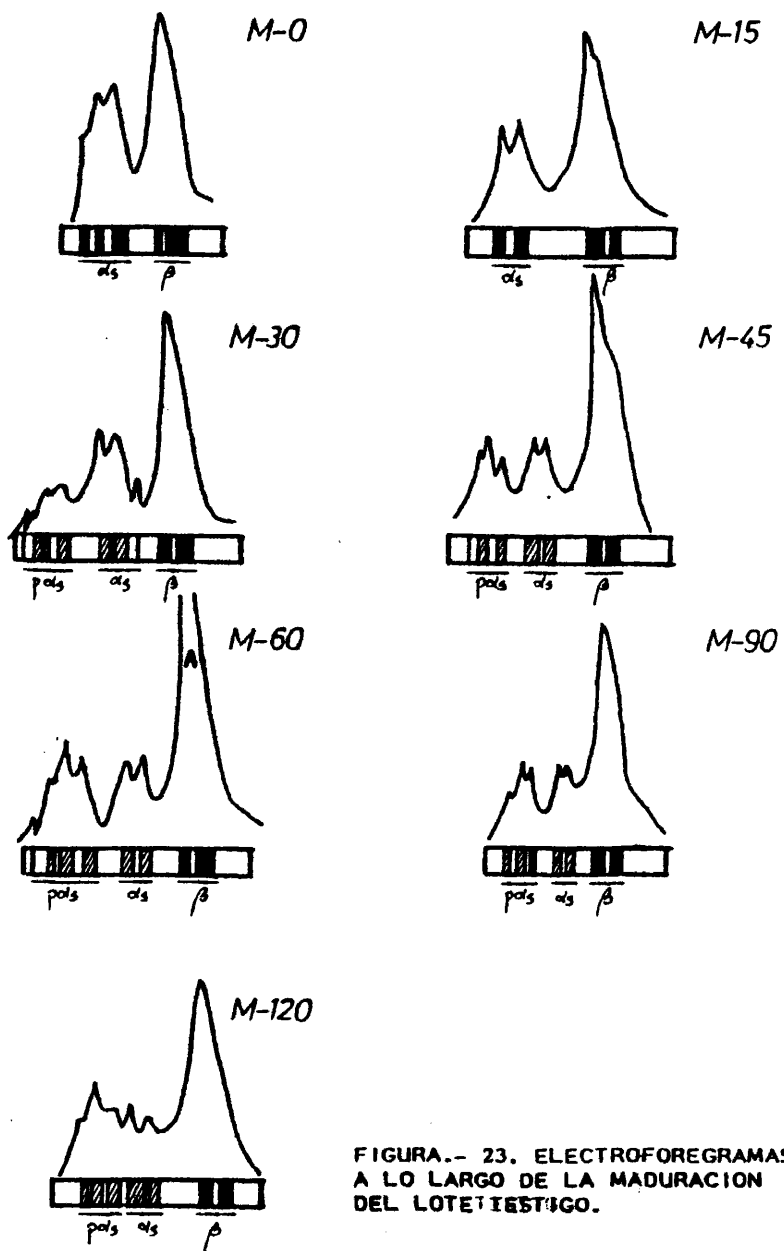


FIGURA.- 23. ELECTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTETESTIGO.

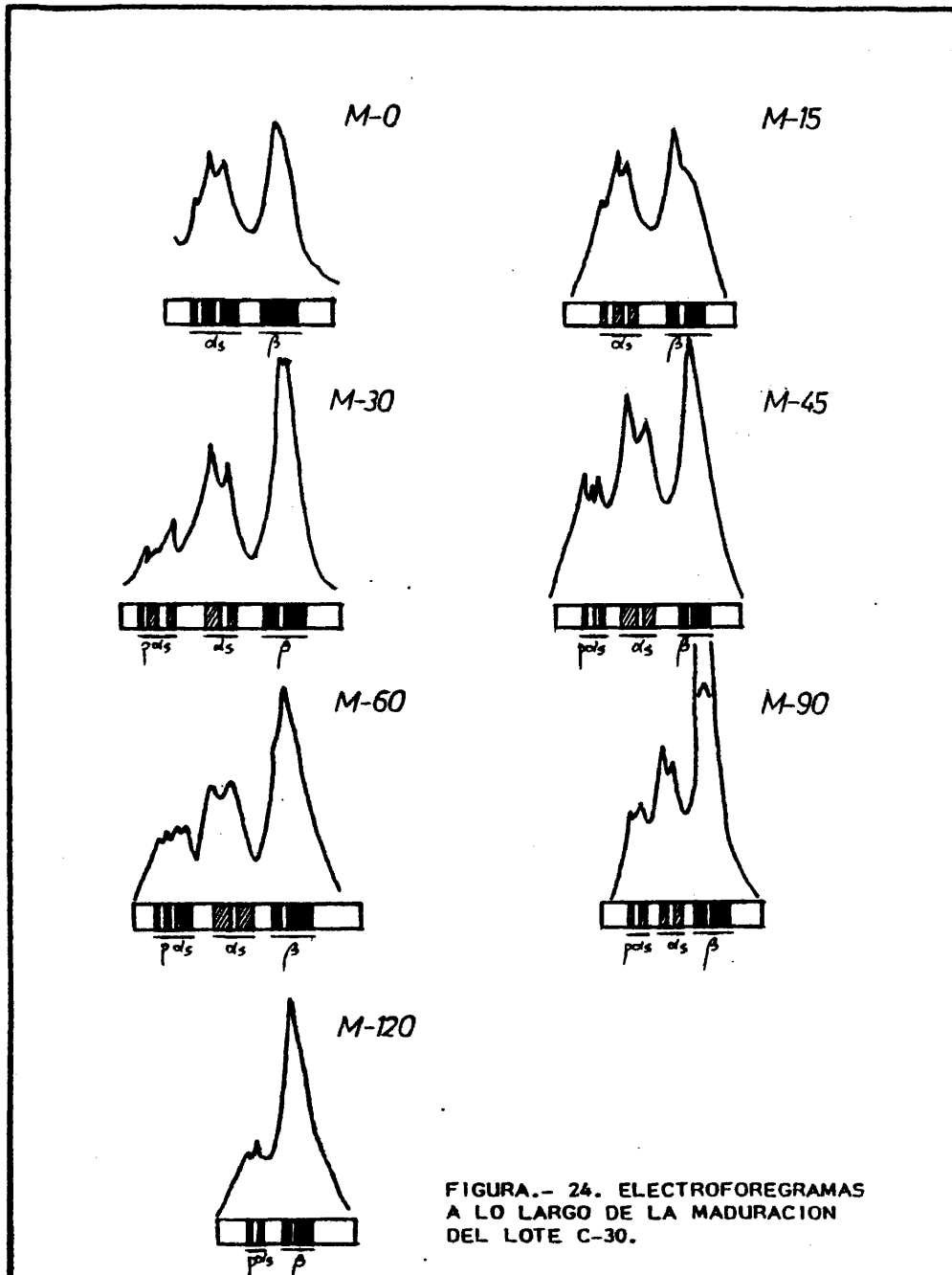


FIGURA.- 24. ELECTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTE C-30.

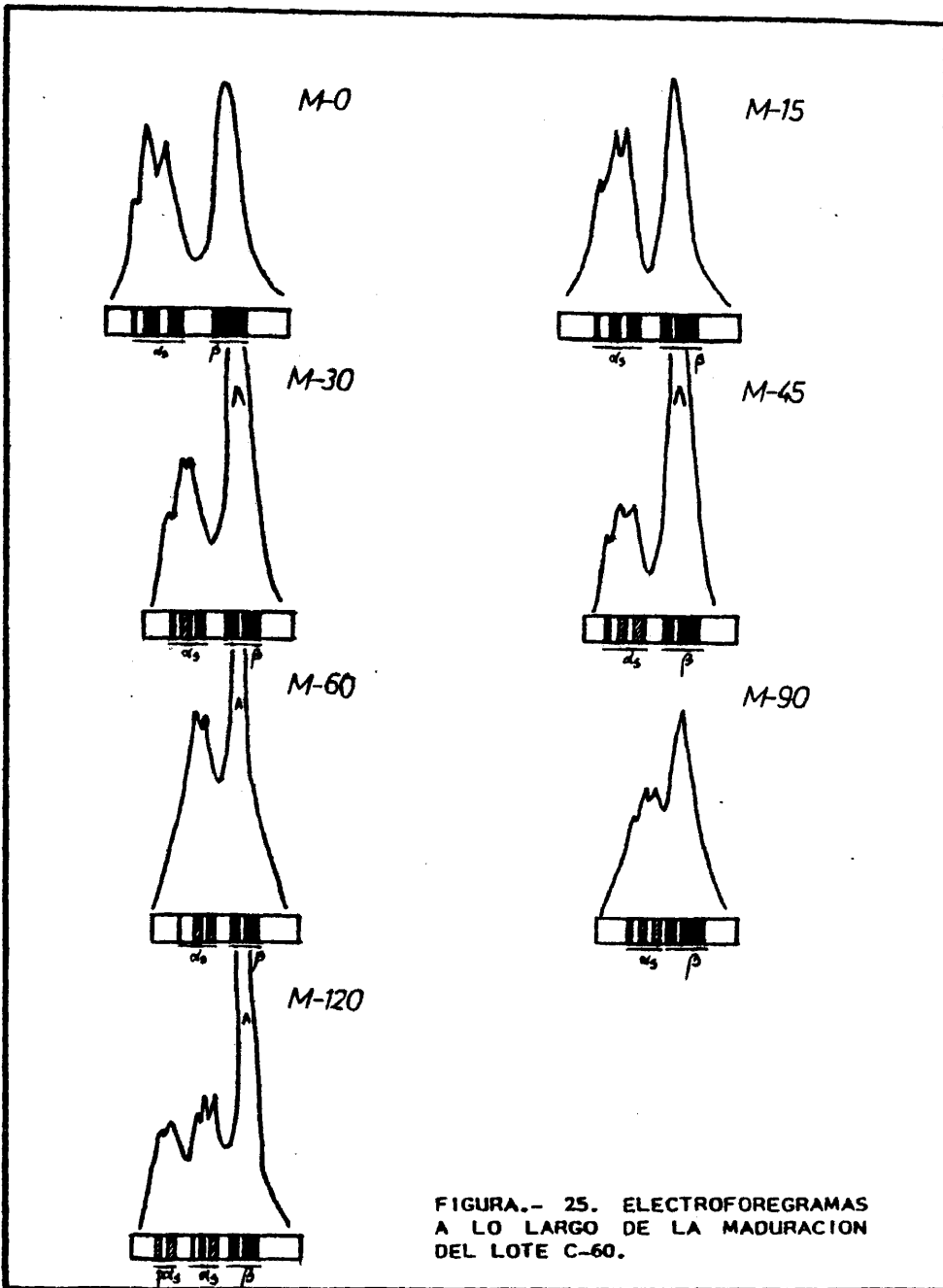


FIGURA.- 25. ELECTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTE C-60.

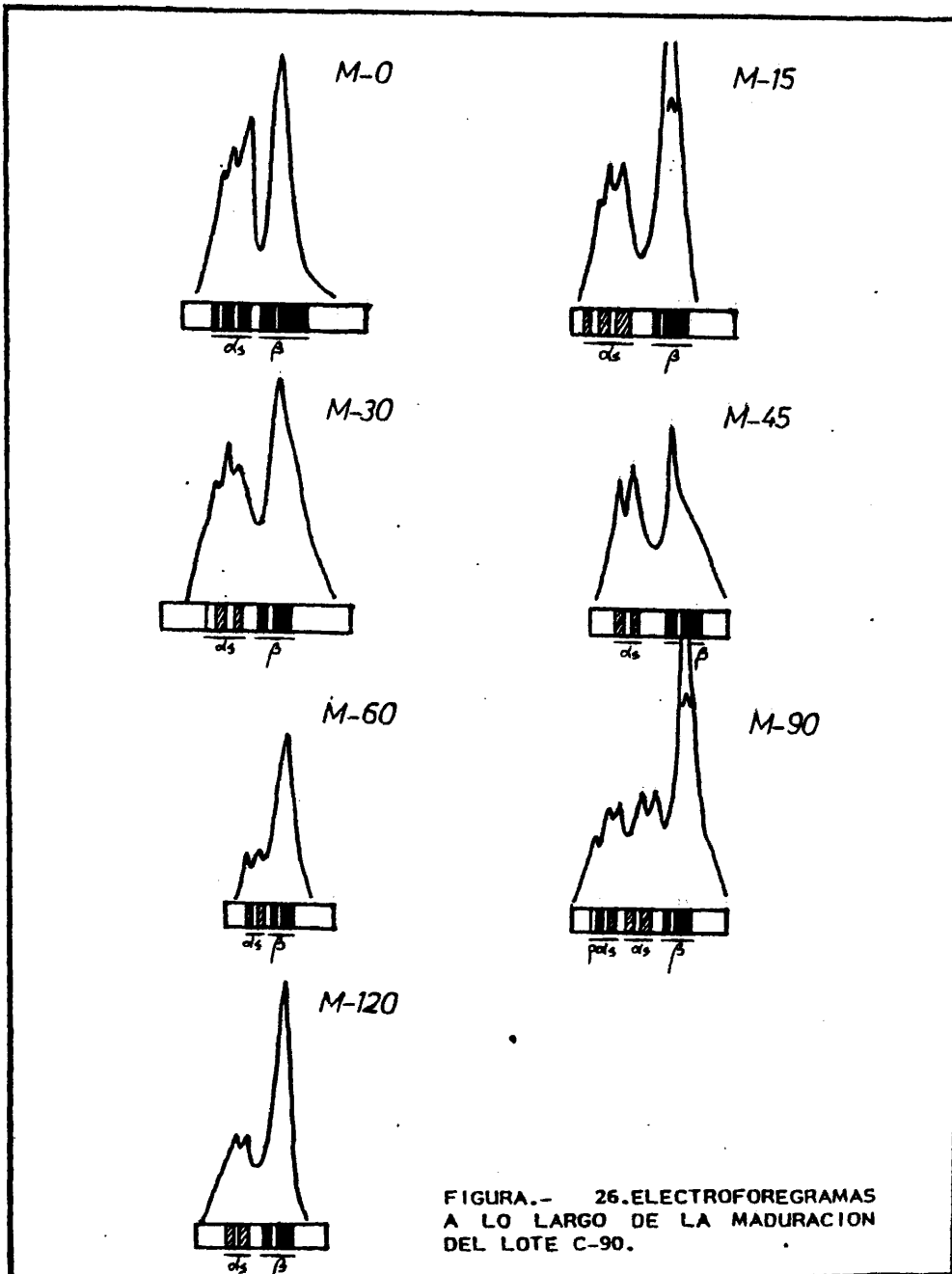
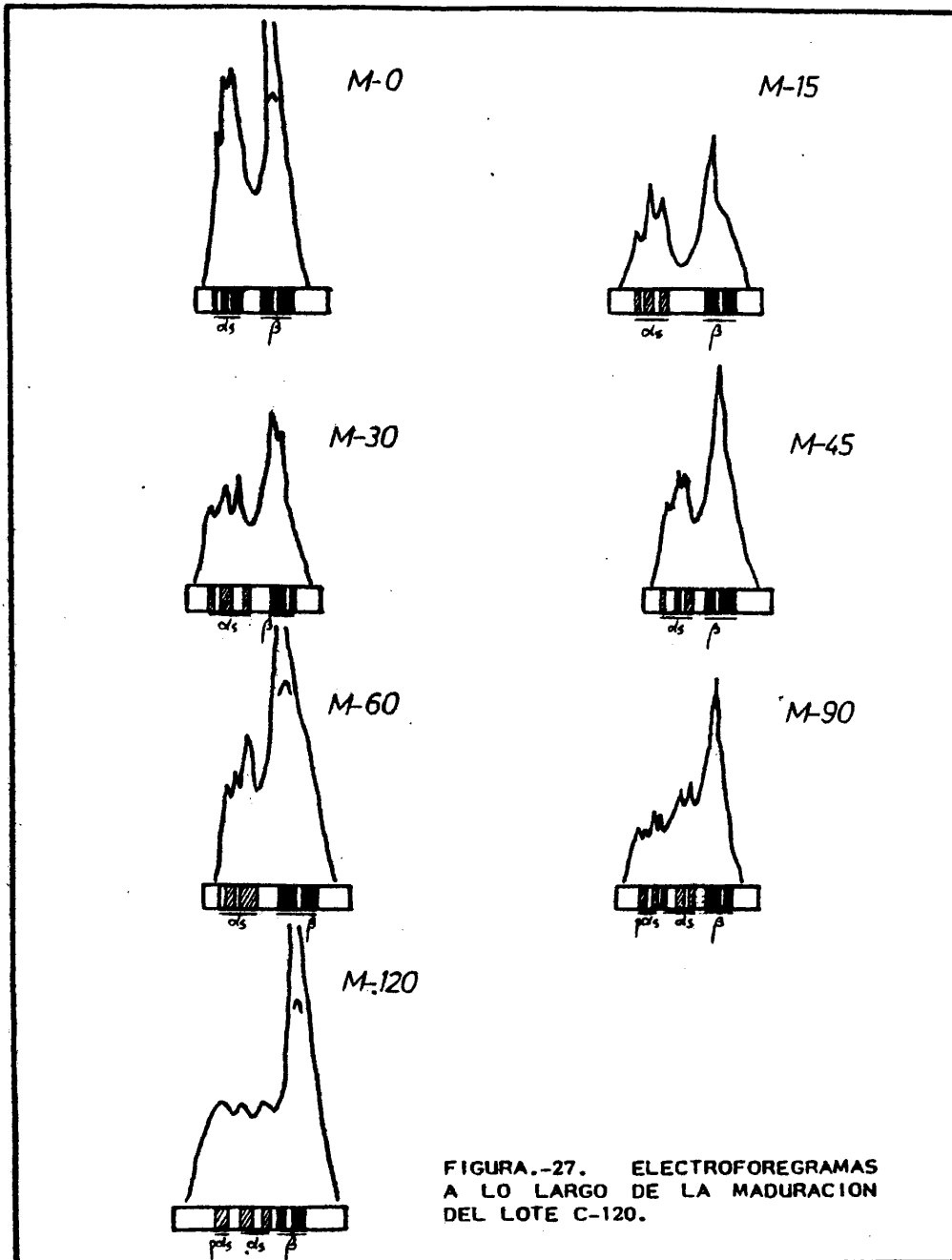


FIGURA.- 26.ELECTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTE C-90.



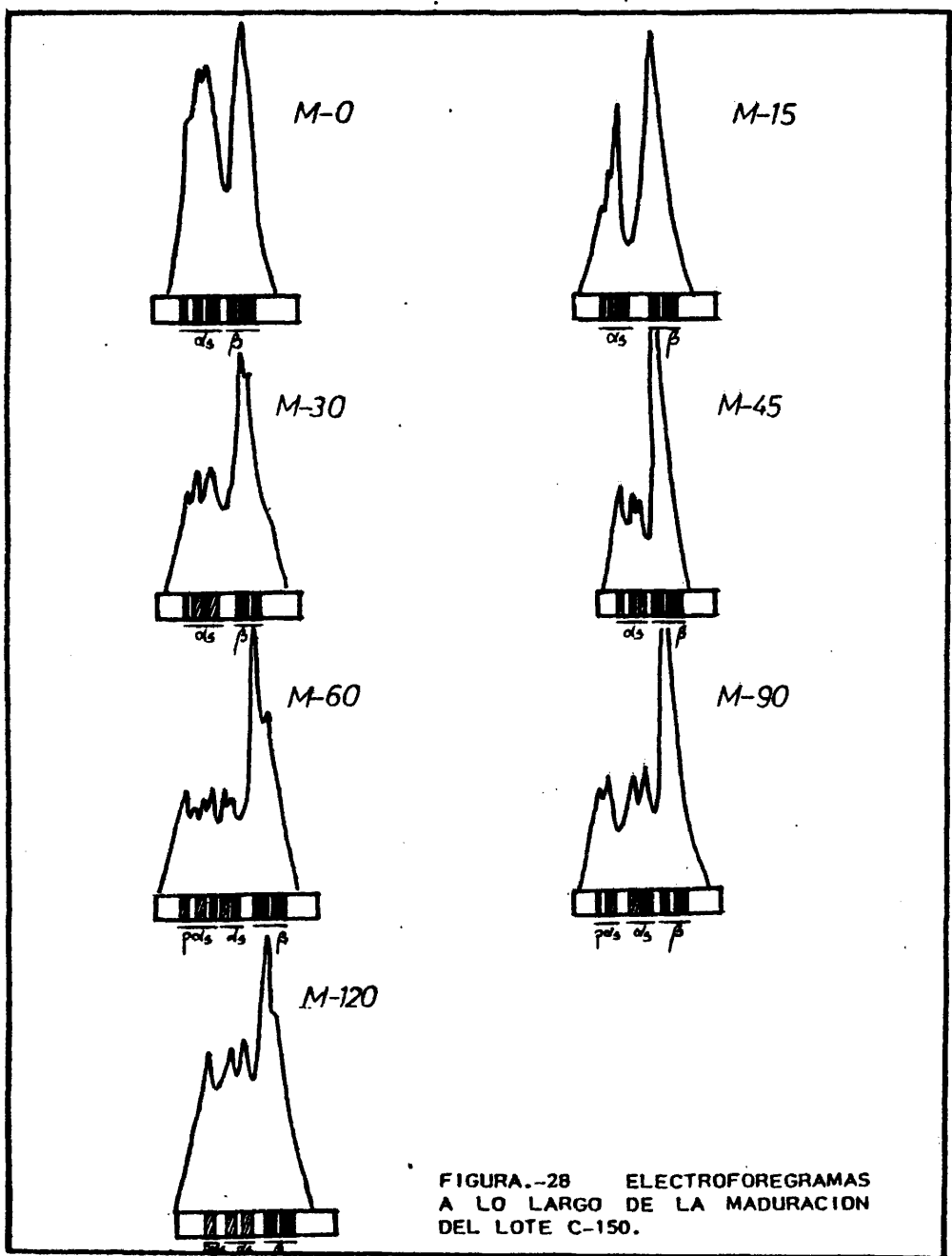


FIGURA.-28 ELECTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTE C-150.

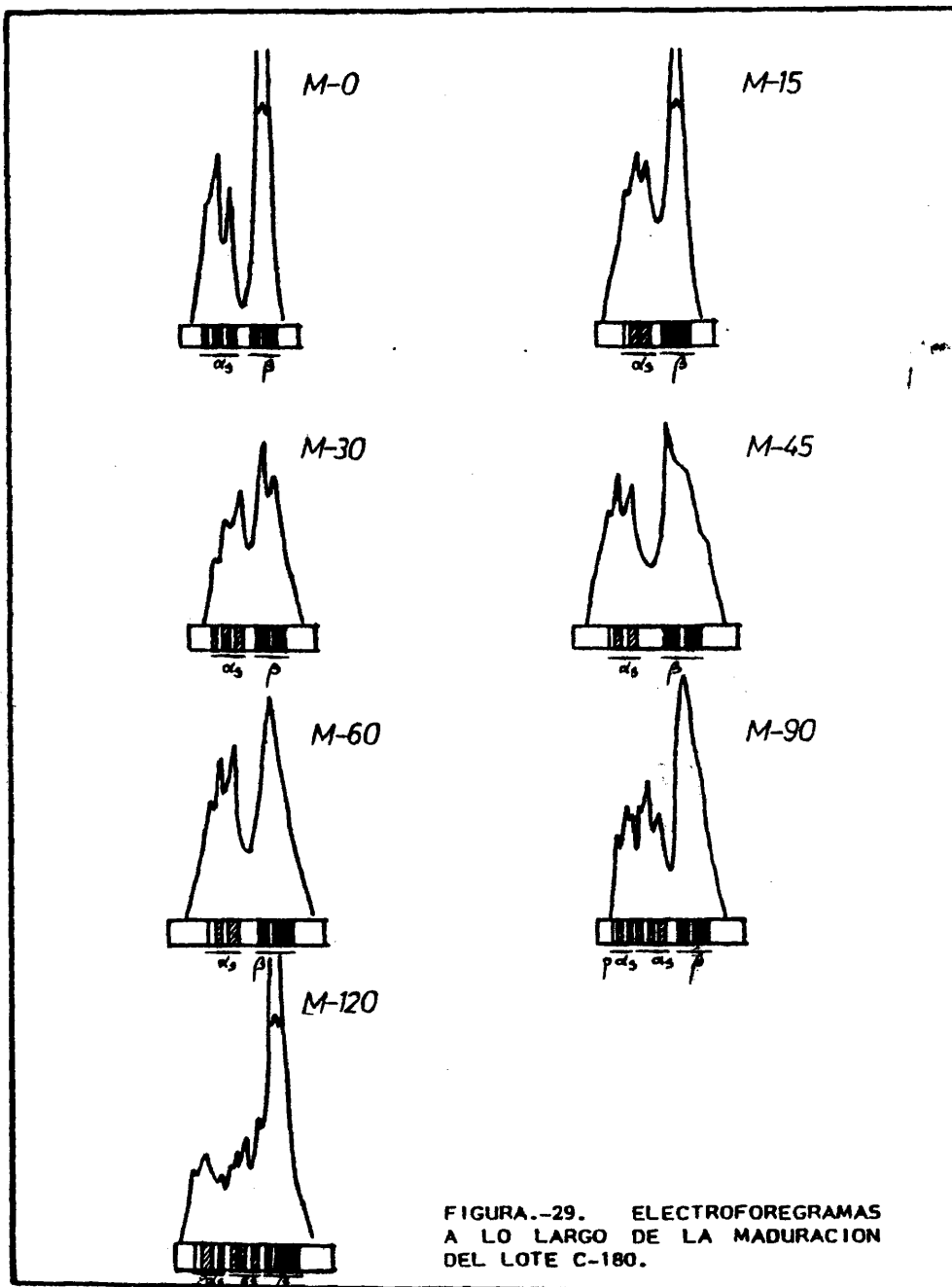


FIGURA.-29. ELECTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTE C-180.

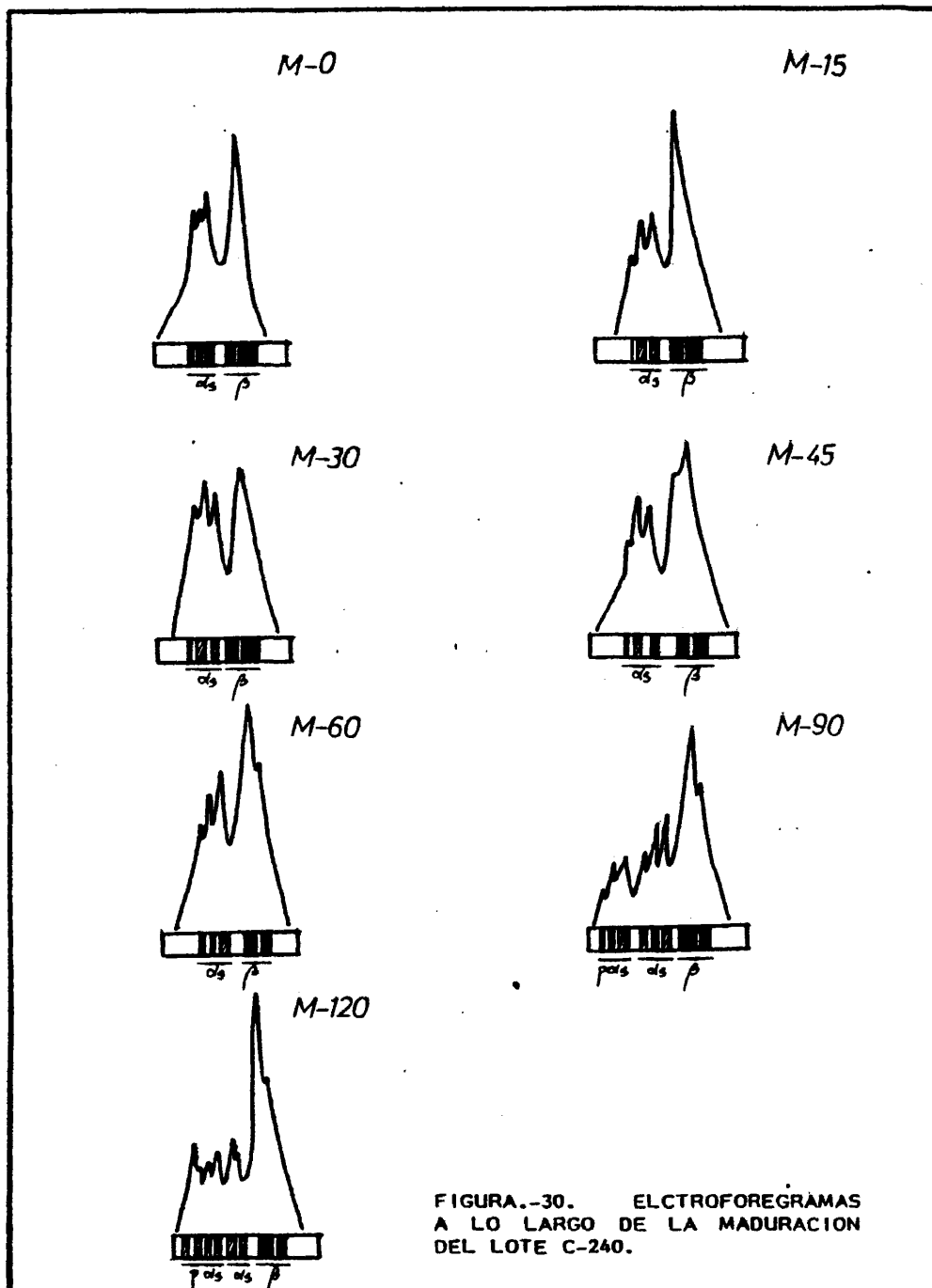


FIGURA.-30. ELCTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTE C-240.

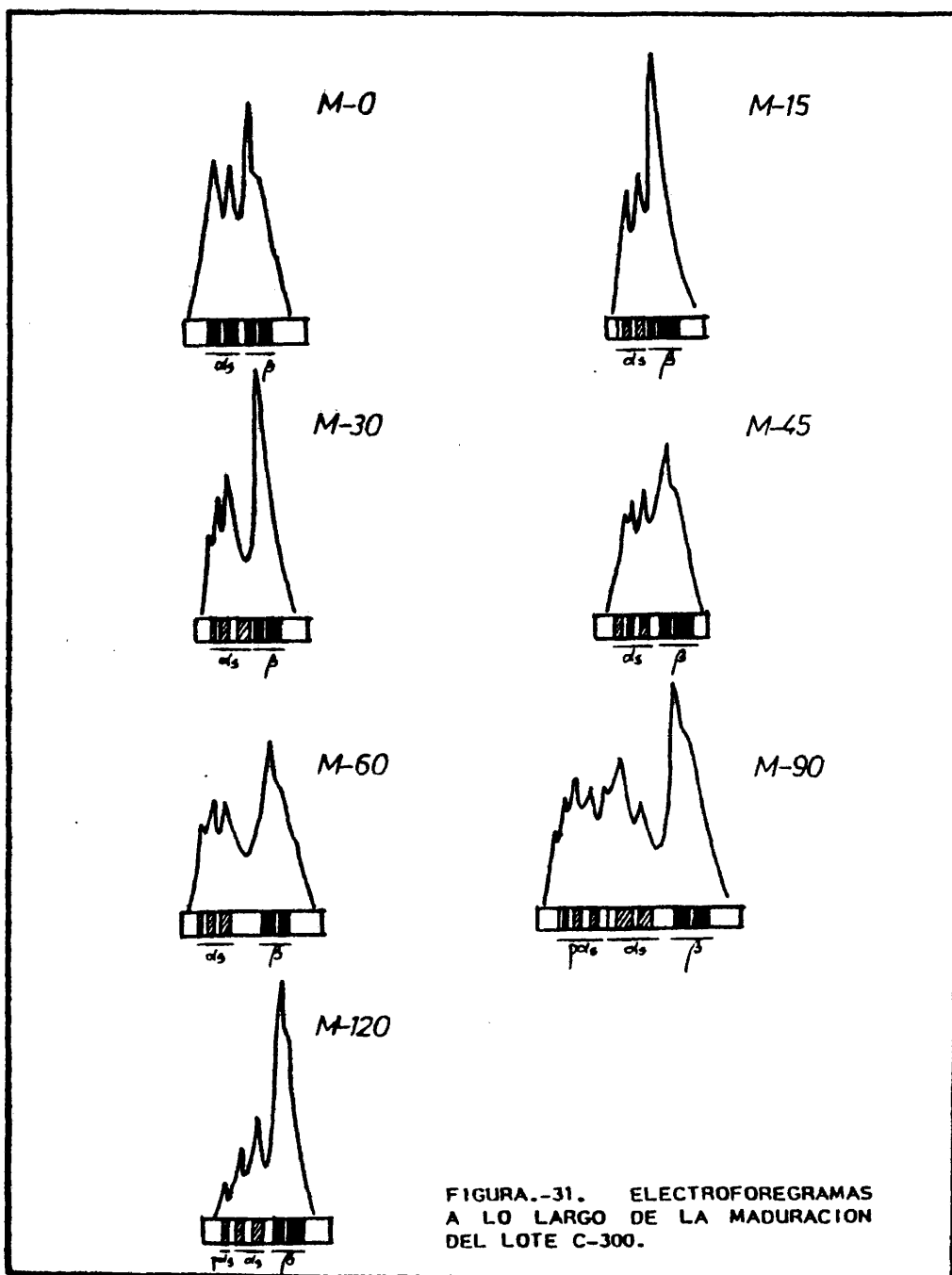


FIGURA.-31. ELECTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTE C-300.

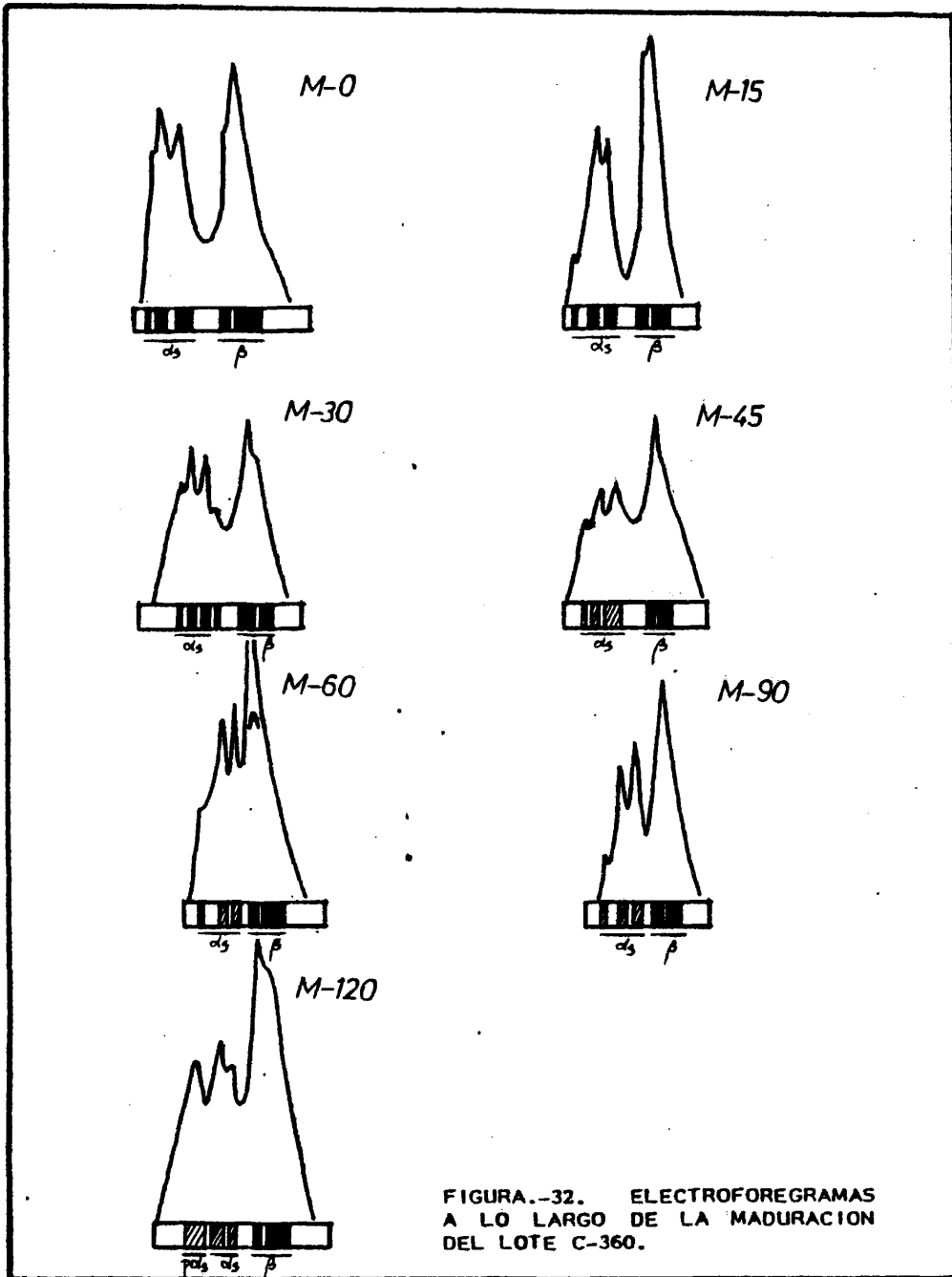


FIGURA.-32. ELECTROFOREGRAMAS A LO LARGO DE LA MADURACION DEL LOTE C-360.

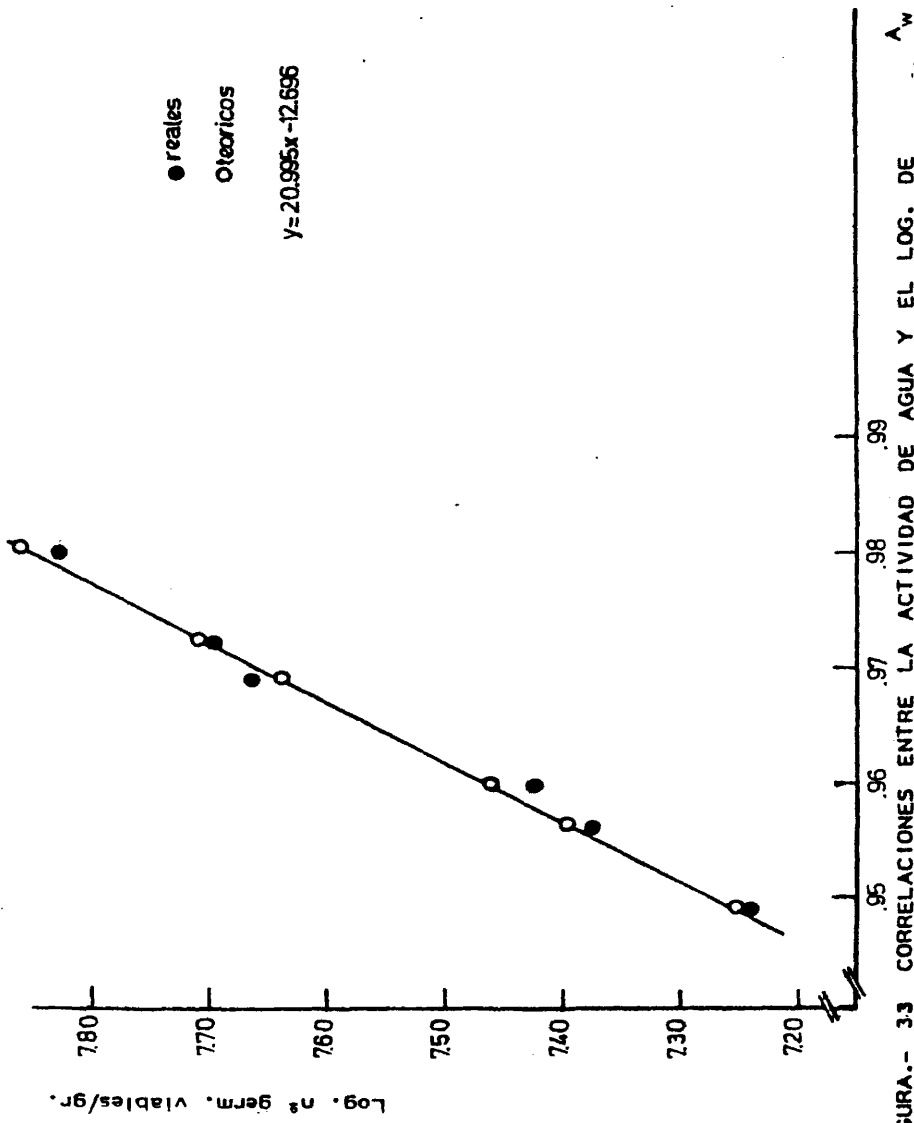


FIGURA.- 33 CORRELACIONES ENTRE LA ACTIVIDAD DE AGUA Y EL LOG. DE GERMENES VIABLES/GR. DE LA MADURACION GLOBAL DE TODOS LOS LOTES.

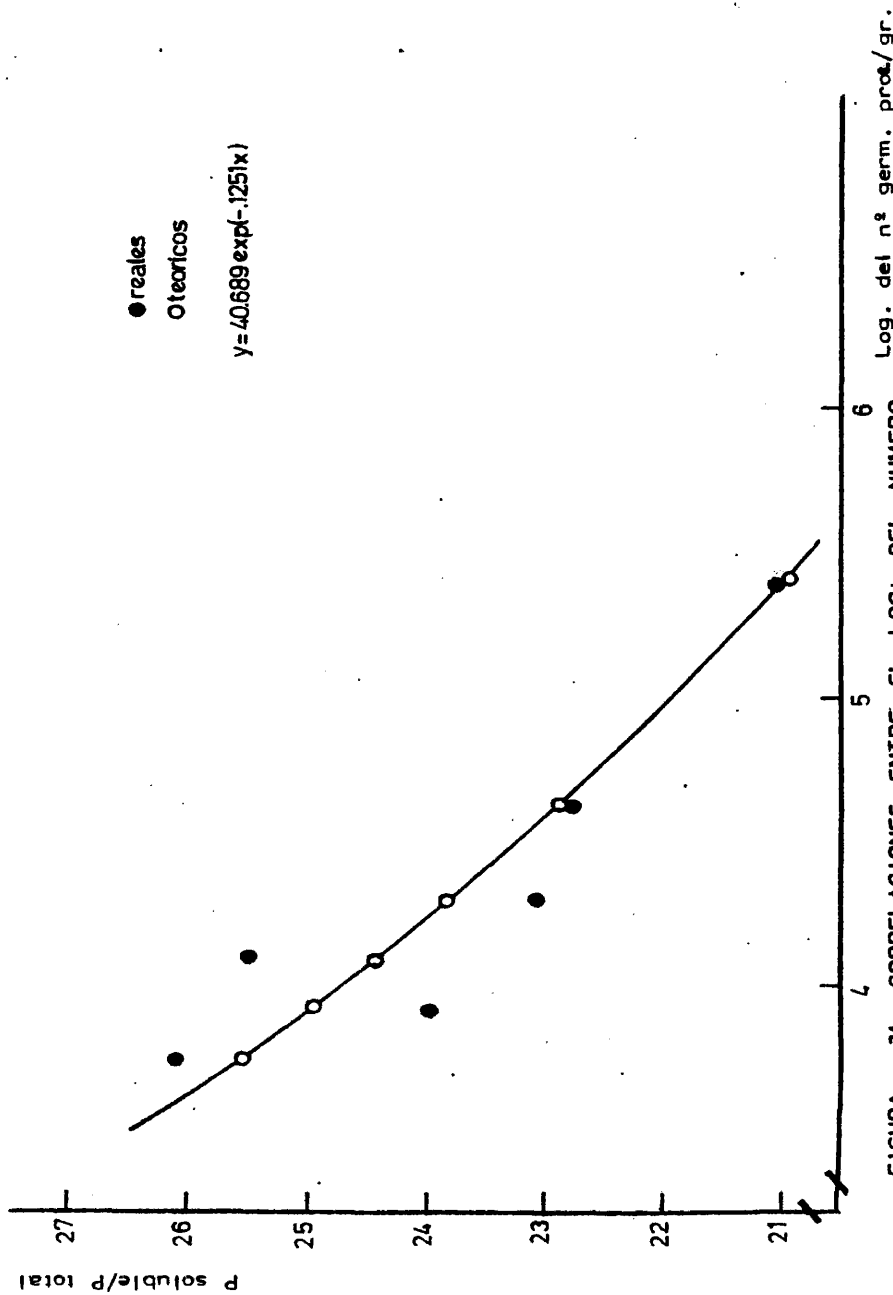


FIGURA.- 34. CORRELACIONES ENTRE EL LOG; DEL NUMERO DE GERMENES PROTEOLITICOS Y LA RELACION PROTEINA SOLUBLE/PROTEINA TOTAL DE LA MADURACION GLOBAL.

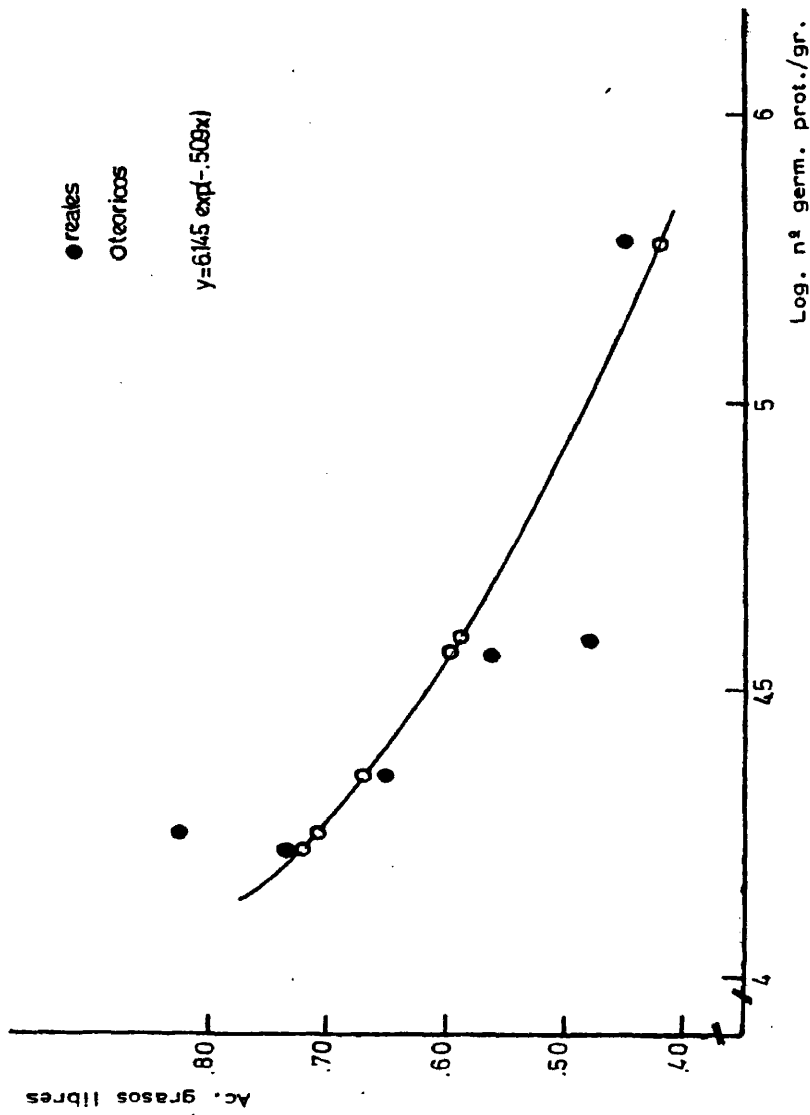


FIGURA.- 35 CORRELACIONES ENTRE EL LOG. DEL Nº DE GERMESES PROTEOLITICOS/GR. Y EL CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS LIBRES A LO LARGO DE LA MADURACION TOTAL DE DOS LOS LOTES.



BIBLIOTECA

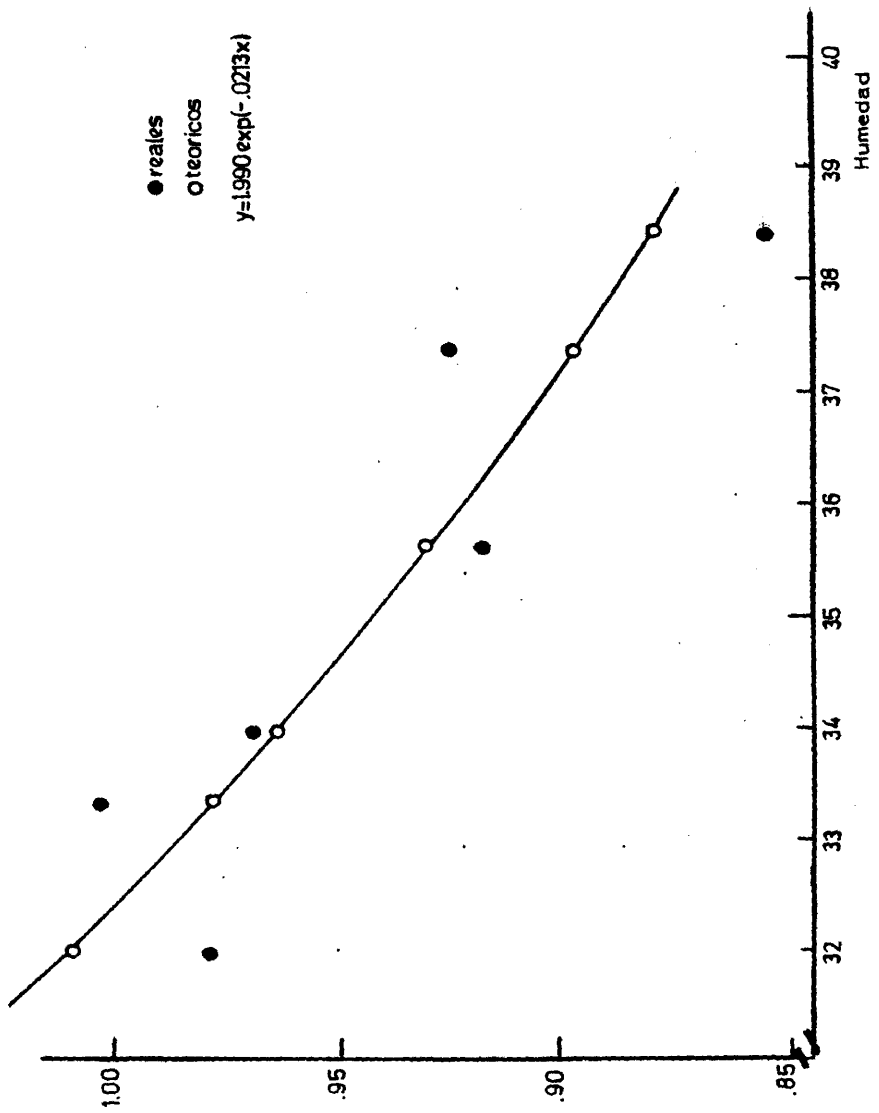


FIGURA.- 36. CORRELACIONES ENTRE EL CONTENIDO EN HUMEDAD Y LA DUREZA A LO LARGO DE LA MADURACION GLOBAL DE TODOS LOS LOTES.