

# LOS FERMENTOS LACTICOS

## SU UTILIZACIÓN

### EN LA FABRICACIÓN DE MANTECA (1)

POR

SANTOS S. SORIANO

---

**Generalidades.** — El conocimiento de la naturaleza biológica de la acidificación espontánea de la leche, se remonta a los estudios de Pasteur en 1857-1858.

El referido sabio demostró que calentando la leche en un recipiente convenientemente tapado, puede llegarse a conservarla por largo tiempo sin sufrir transformación, habiendo servido el calor para la destrucción de los gérmenes vivientes que según él motivaban las transformaciones, y estando aislado a la vez del medio ambiente por la tapa defensora.

Las primeras investigaciones culturales se deben a Lister (1878), que estableció la existencia de diversas formas de fermentos lácticos, muy probablemente también entre ellos al que más tarde debía ser llamado por Krüse *Srteptococcus lácticus*. En 1884 Hueppe (Hüppe) aisló el *Bacterium acidi lactici*, por un tiempo considerado como el organismo al cual principalmente se debía la acidificación espontánea de la leche. Leichmann en 1894 aisló el *Bacterium lactis acidi* que fué más tarde considerado por otros autores como un Streptococo y que se reconoció luego ser el agente más importante al cual debía atribuirse la acidificación de la leche.

Clauss, Grotenfeld, Schardinger, Kozai y Utz describieron microorganismos probablemente idénticos al de Hueppe. A esta lista de investigadores, podríamos agregar los nombres de Günther, Thierfelder, Esten, Schierbeck, etc., y otros que han hecho una serie de trabajos referentes a la fermentación láctica y a los fermentos: Beijerinck, Barthel, Jensen, Bertrand, Pottevin, Weigmann, Richet, Kayser, Macé, Löhnis, Freudenreich, Conn, Hastings, Evans, Henne-

---

(1) Tesis presentada para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad de Bs. Aires. Año 1922

berg, Boekhout, de Vries, Gorini, Rahn, V. Laer, Daire, Smit, Steenberge, etc.

La gran cantidad de fermentos lácticos señalados después de Leichmann, difieren más o menos unos de otros en caracteres cuya delimitación resulta muy difícil. Por ejemplo, estudiando su poder de coagulación, nos encontramos con fermentos lácticos que coagulan la leche rápidamente en pocas horas, mientras otros necesitan días y, en fin, otros la acidifican solamente, siendo la cantidad de ácido producido, insuficiente para provocar la coagulación. Sin embargo, sabemos que este poder de coagulación es una propiedad susceptible de modificarse especialmente bajo ciertas condiciones de laboratorio, de modo que una referencia a esta propiedad queda siendo bastante arbitraria.

*Se conocen con el nombre de fermentos lácticos en general, todos aquellos microorganismos que producen una cantidad notable de ácido láctico por descomposición de los azúcares y otros compuestos de carbono.*

Muchos autores, como Heinemann, quieren que se aplique el típico nombre de fermentos lácticos, sólo a aquellos microorganismos que teniendo esas propiedades, están contenidos normalmente en la leche.

Por otra parte, los fermentos lácticos (P. Van Steenberge), pueden dividirse en verdaderos o activos y pseudo fermentos lácticos, siendo los primeros aquellos que transforman integralmente (con aproximación de centésimos) los azúcares en ácido láctico, sin dar lugar a formación de grandes cantidades de productos secundarios, y distinguiéndose los segundos por la formación más o menos abundante y en proporción variable, al lado del ácido láctico, de ácido acético, ácido fórmico, ácido carbónico, alcohol etílico, glicerina, manita, etc.

Ciertas características de los fermentos lácticos verdaderos o activos fueron establecidos por Beijerinck y pueden enunciarse como sigue:

Inmóviles, anaerobios facultativos, no forman esporos, exigen para su nutrición determinados hidratos de carbono y ázoe en forma de peptonas o mejor de productos derivantes de la acción de la tripsina; se desarrollan en pequeñas colonias sobre los medios nutritivos sólidos comunes, aún sobre su medio preferido la gelatina o gelosa de mosto, obteniéndose con el extracto de malta líquido un desarrollo relativamente mayor; según la especie, forman a expensas de los azúcares atacados, ácido láctico casi integralmente, o,

al lado de una cantidad predominante de ácido láctico, dan dosis determinadas de ácidos volátiles y dosis proporcionales a estos últimos de alcohol y de anhídrido carbónico; y, por último, no poseen catalasa, es decir, no tienen la propiedad de descomponer el agua oxigenada. Según Beijerinck, este carácter negativo es muy específico, desde que todos los demás microbios poseerían esa propiedad.

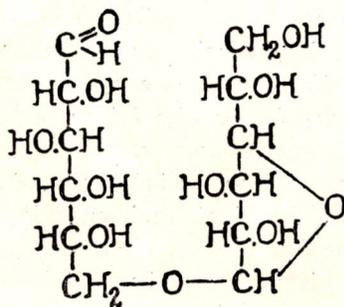
Los fermentos lácticos están extensamente difundidos en la naturaleza, encontrándoselos en la leche, en los extractos vegetales azucarados, en las heces animales, en el suelo, etc.

Toman activa intervención útil en lechería, fabricación de manteca y queso, fabricación de conservas alimenticias vegetales como el choucroute, etc., en el ensilaje de los forrajes, en destilería, panificación; cumpliendo además una acción perjudicial en las bebidas fermentadas, cuando ocasionan algunas enfermedades de los vinos, cervezas, sidras, etc. Además, en su actividad se basa la industria de fabricación del ácido láctico; y por fin, se ensayan también con fines terapéuticos de acuerdo a la teoría de Metschnikoff, referente a las intoxicaciones intestinales, pero con resultados no bien establecidos aún.

### LA FERMENTACION LACTICA

Se entiende por fermentación láctica el proceso de descomposición de un azúcar y más extensamente de un hidrato de carbono, en ácido láctico, llevado a cabo por la acción de los fermentos lácticos.

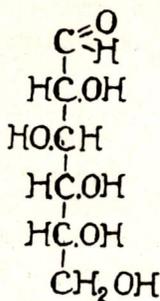
En el caso especial de la fermentación natural del azúcar de leche o lactosa, este disacárido de fórmula  $C_{12}H_{22}O_{11}, H_2O$ , que podemos representar así:



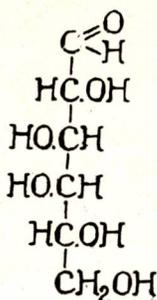
Lactosa.

es hidrolizado por la acción de una endo-diafata, la *lactasa* o *lactoglucasa* en dos monosacáridos:

d—glucosa y d—galactosa.

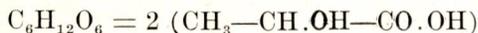


d.—Glucosa.



d.—Galactosa.

Estos a su vez darían ácido láctico por acción de una nueva diafata, la *lactocidasa*.



Basándose en experiencias de Buchner y Meisenheimer sobre el *Bact. Delbrücki* y de Herzog sobre *Bact. aërogenes* que aislaron preparados activos directamente sobre la lactosa, podría admitirse una descomposición directa de la lactosa en ácido láctico



### Alimentación hidrccarbonada

Los diversos compuestos de carbono son diversamente atacados por las distintas especies de fermentos lácticos, tanto en calidad como en cantidad, y precisamente es esta una de las características a las cuales como veremos, puede atribuirse la mayor importancia para la clasificación y diferenciación de las especies.

Entre los monosacáridos, la glucosa y la levulosa son los más frecuentemente atacados; de los disacáridos la lactosa es fermentada con más frecuencia que la sacarosa y maltosa, y los demás compuestos (pentosas, polisacáridos, poli-alcoholes, etc.), como la arabinosa, xilosa, rafinosa, dextrina, almidón, glicerina, manita, son todos diversamente atacados.

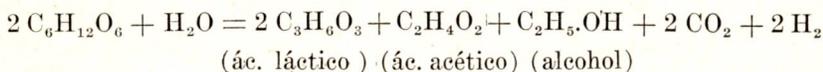
La dosis óptima de hidrato de carbono está comprendida según Kayser entre 0,5 y 2 o|o, pudiendo llegar a mayor cantidad en casos especiales,

Por la simplicidad de las fórmulas escritas que representan la síntesis del proceso de fermentación, se está inducido a creer que el pasaje de los monosacáridos por ejemplo, a ácido láctico, se hace directamente y sin formación de productos secundarios.

No es así, sin embargo, y al dar una definición de fermentos lácticos, dijimos ya que se consideraban tales siempre que diesen cantidades notables de ácido láctico por fermentación de los hidratos de carbono.

Especialmente en los pseudo fermentos lácticos es donde se nota mejor cuantitativamente la presencia de cuerpos secundarios.

Reduciendo a fórmulas las reacciones químicas que sobrevienen, Harden interpreta por ejemplo la fermentación láctica que el bacilo Coli hace sufrir a la glucosa, de la siguiente manera:



que a su vez podría deducirse del conjunto de: dos veces la fórmula:



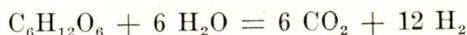
más seis veces la fórmula:



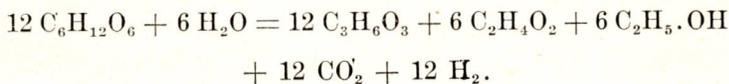
más tres veces la fórmula:



más la fórmula:



y el todo sería:



que dividido por seis, nos da la fórmula primitiva.

Sin embargo, y a pesar de las dificultades que se tienen para el reconocimiento de la proveniencia de estos productos secundarios desde que no se puede alimentar a los microorganismos en general solamente con azúcares o hidratos de carbono sino que a la vez necesitan alimentación azoada, sales minerales, etc., lo cual dificulta la interpretación de donde provienen dichas substancias secundarias, así y todo, en los fermentos lácticos del grupo que más directamente nos interesa (tipo Streptococo) no productor de

gases, casi todo el azúcar primitivo, es transformado en ácido láctico, con poquísima formación de productos secundarios, a saber, pequeñas cantidades de ácidos grasos volátiles, de alcoholes y de aldehidos.

En el caso inverso, podría citarse la fermentación de la lactosa por representantes del grupo Coli-aërogenes, alguno de los cuales en aeración, la transforman en ácido acético, ácido succínico y unas pequeñas cantidades de ácido láctico, ácido fórmico, anhídrido carbónico, alcohol, hidrógeno, etc.

En cuanto a la naturaleza óptica del ácido láctico producido, el asunto ha sido muy discutido. Algunos opinan que la obtención del compuesto dextrógiro, o del levógiro, o de la unión de ambos en partes iguales, lo que daría un compuesto inactivo por compensación o racémico, o en fin, del compuesto inactivo por naturaleza, depende de la especie considerada.

Por esta teoría están Kayser, Pottevin, Jensen, Herzov, Hörth, estos dos últimos dando, sin embargo, como posible, una cierta influencia de la alimentación azoada.

Otros en cambio, dan mayor importancia a las condiciones del medio ambiente y en especial a las condiciones de nutrición. Según Perú, en microbios del grupo Coli-aërogenes, una misma especie puede llegar a producir las tres formas de ácido láctico según el azúcar de donde provienen, pudiéndoselos aún obtener de un solo azúcar según la temperatura, naturaleza de los principios azoados, etcétera.

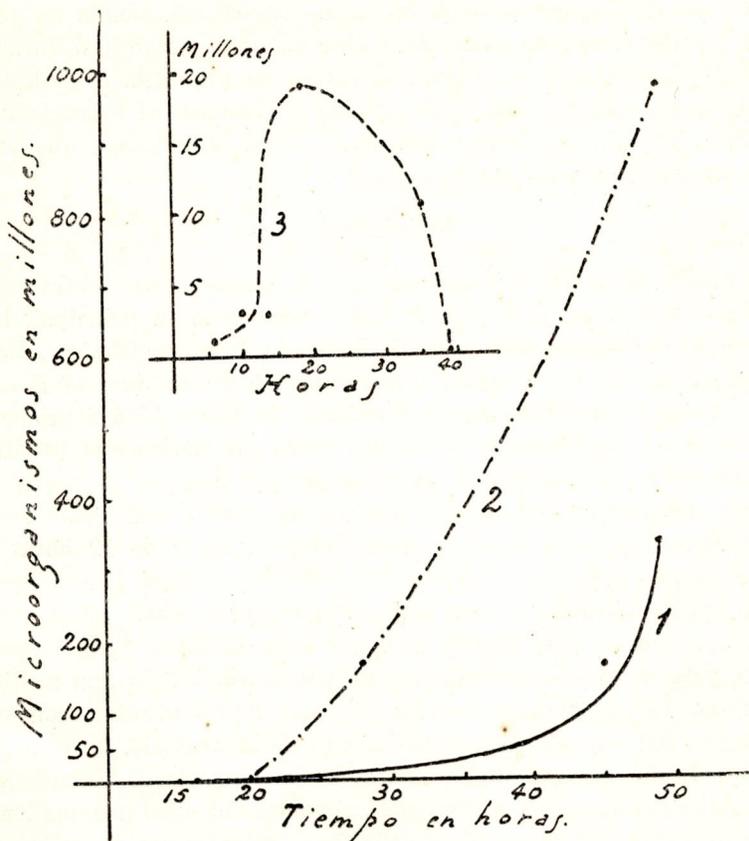
### Alimentación azoada

Además de los hidratos de carbono, la presencia de alimentos nitrogenados tiene marcada importancia para el buen desarrollo de una fermentación láctica. Las distintas especies son más o menos aptas para obtener su nitrógeno de tal o cual substancia, así algunas, como los ácido-proteolíticos utilizan directamente la caseína, a la cual atacan solubilizándola, mientras otras solamente pueden servirse de peptonas. Estas últimas substancias por otra parte, benefician a todos los fermentos lácticos, hecho que puede constatarse observando al aumento en el rendimiento de ácido que puede obtenerse de una cantidad dada de azúcar, cuando se agrega peptona en el medio de cultivo (Kayser).

Según Marshall, Köning, etc., la asociación de los fermentos lácticos con otras especies que son activos peptonizantes, como el *Bacillus subtilis*, el *Pseudomona fluorescens*, etc., puede resultar a los

primeros de gran provecho, acrecentado en mucho la actividad fermentativa que son capaces de desarrollar en cultivo puro. Con esto se explica el hecho frecuentemente observado de que en las condiciones naturales, la acidificación espontánea de la leche puede llegar a un grado de acidez más elevado que el que alcanzan a dar los más activos fermentos lácticos.

En el gráfico N.º 1 (Marshall), está representado lo que acaba-



N.º 1.—Asociación de *Streptococcus lacticus* con *Bacillus subtilis*.  
(Según datos de Marshall)

1. *Streptococcus lacticus* puro.
2. " " (con *Bac. Subtilis*),
3. *Bac. Subtilis* (con *Streptoc. lacticus*),

mos de anotar, haciendo constar de paso que la relación más conveniente a la actividad de los fermentos lácteos es de *Bac. subtilis* | *Strept. lácticus* = 22 | 10.000.

Como límite puede citarse que algunas especies parecen poder prescindir de toda substancia proteica, como algunos representantes del grupo de *Bact. acidii lactici* (*aërogenes*) que se desarrollan en el líquido de Uschinsky o de Fränkel, teniendo por toda substancia nitrogenada, la asparagina, y contentándose aún con tartrato de amonio.

La dosis de nitrógeno suficiente es de un 0,5 o/o. siendo en general buenos alimentos azoados, la caseína de la leche (en forma coloidal o soluble), la legumina, el gluten en presencia de fosfato de sodio, el extracto Liebig, la peptona de caseína, el extracto de levadura, el mosto de cervecería, etc., no así la gelatina, que resulta un mal alimento (Kayser).

### Actividad

La actividad de la fermentación láctica, puede variar según numerosas influencias, entre las cuales figura como la principal, la energía de descomposición específica de cada fermento láctico. Según de Rossi, Haacke calcula que un gramo de cultivo de *Bact. acidii lactici*, puede consumir en una hora, de 178 a 14.899 gramos de lactosa (?), y Wehmer señala un fermento láctico que produciría 10 veces su propio peso de ácido láctico por día.

Entre los distintos fermentos lácticos, se encuentran ejemplares que coagulan la leche en muy poco tiempo (menos de 12 horas), formando casi 1 o/o de ácido en 48 horas y otros que por el contrario apenas alcanzan a coagularla después de 5 días.

La cantidad total de ácido a alcanzar varía también según las especies, pero se mantiene según los grupos aldededor de una media que tiende a uniformarse en los diversos representantes, con el transcurso del tiempo, en las condiciones de laboratorio.

Conservando colonias de fermentos lácticos por largo tiempo (2 años), se observa, según Rogers y Davis, en todos ellos una tendencia a uniformar esa propiedad de rápida o lenta formación de ácido y de cantidad alcanzada. Es probable que esto sea debido a variaciones de vitalidad más bien que a variaciones en la función en particular, estando apoyada esta afirmación por el hecho frecuente de que los grandes productores de ácido siempre tienen un elevado desarrollo numérico comparados con otros (del mismo tipo se entiende), que forman menos ácido y se desarrollan en menor número.

### Influencias diversas

Las influencias de las causas exteriores sobre el curso de la fermentación láctica, son muy marcadas.

Considerando en primer lugar la temperatura, se observa que actuando sobre la vegetación de los fermentos, lo hace también sobre la actividad fermentativa.

Las temperaturas óptimas varían en los grupos considerados y en seguida las mencionaremos al tratar en especial cada uno de ellos. Las mínimas y máximas oscilan entre diversos límites, pudiendo tomarse como medias 10° y 50° C., dependiendo ellas en mucho del estado de vigor de los mismos fermentos.

Es necesario separar distintamente la intensidad, de la rapidez de acidificación: en muchas especies el máximo de acidez depende más de las condiciones alimenticias que de la temperatura, la cual sí influye muy directamente sobre la rapidez de formación del ácido.

La temperatura óptima vegetativa tampoco coincide con la óptima de acidez a alcanzar, siendo casi siempre la primera un poco superior.

De estudios de Gorini y de Barthel sobre cocos ácido-proteolíticos, lactobacilos y streptococos, se desprende que la temperatura puede influir además sobre algunas propiedades especiales, así por ejemplo mucho de esos fermentos lácticos que a temperaturas determinadas no parecen poseer ningún poder proteolítico, lo demuestran si se desarrollan a temperaturas inferiores.

Es por eso que se aconseja estudiar esta importante característica manteniéndose debajo de 20° y aún en los casos que se debe favorecer su desarrollo a más alta temperatura, se debe después descender a las más mínimas, propicias para el caso.

La influencia de la aereación se manifiesta diversamente, permitiendo dividir a este respecto los fermentos lácticos en aerófilos, oligoaerófilos e indiferentes. En términos generales, está establecido de los fermentos del tipo streptococo y lactobacilo, se encuentran bien tanto en presencia como en ausencia del aire atmosférico, prefiriendo vivir, sin embargo, en condiciones de anaerobiosis.

Los demás tipos de fermentos lácticos son favorecidos por la aereación.

Según Kayser, por otra parte, muchas especies producen mayor acidez en las profundidades y además la acidez acética aumenta en

la superficie, donde podría verificarse una combustión completa de los azúcares y de los ácidos.

	<i>Acidez fija</i>	<i>Acidez acética</i>
En superficie . . . . .	7,40 grs.	6,73 grs.
„ profundidad . . . . .	23,10 „	1,12 „

(Cifras referidas a un litro de caldo nutritivo. Kayser).

Evans utiliza para clasificarlos, la acidez acética que en algunas especies es superior a otras.

En cuanto a la sensibilidad demostrada por los fermentos lácticos hacia la presencia de ácidos minerales y orgánicos, podremos anotar que según de' Rossi, 0,07 a 0,15 oo de ácido clorhídrico y 0,04 o|o de ácido sulfúrico serían suficientes para suprimir toda fermentación. El ácido láctico, por otra parte, es el factor principal que obstaculiza la actividad de los fermentos lácticos, y a ese respecto, la tolerancia es muy variable dependiendo en mucho de la especie considerada. Tendremos ocasión, al estudiar los diversos grupos de fermentos lácticos, de observar la diferente manera de comportarse con relación a la cantidad de ácido tolerado.

En ese sentido, la adición de una substancia neutralizante a los medios de cultivo, como la creta por ejemplo, o de agentes destructores de la acidez, como es el caso de la simbiosis con las levaduras, resultan siempre de provecho.

### ETAPAS DE LA FERMENTACION

El curso de la acidificación espontánea de la leche puede resumirse como sigue (Heinemann):

En un primer período llamado por Soxhlet de incubación, y cuya duración depende de la temperatura (unas 3-8 horas a 37°, 15-20 horas a 20°, 50-70 horas a 10°), los cambios notados son escasos y la acidez natural de la leche (que, expresada en grados Dornic está comprendida entre 14-20 o sea 0,14-0,20 o|o de ácido láctico, y es debida a los fosfatos ácidos, ácidos libres y caseína), permanece estacionaria.

Muchos de los microorganismos existentes son perjudicados por la llamada acción bactericida de la leche, pero los fermentos lácticos sobreviven perfectamente.

En un segundo período, los fermentos lácticos aumentan francamente la acidez de la leche. Las proteínas han sido atacadas por los fermentos proteolíticos que son paulatinamente molestados

por la presencia de ácido, siempre en aumento, debida a la actividad de los fermentos lácticos de los tipos *Streptococo* y *Bacterium aërogenes*. Se forma más o menos gas, dependiendo esto de la cantidad relativa de representantes del grupo *Colibacilo* y de la temperatura, la cual, si sobrepasa los 30°, les crea muy favorables condiciones.

En el tercer período los fermentos proteolíticos son restringidos completamente en su desarrollo, y los del grupo *Coli*, cada vez se multiplidan con menos vigor llegando hasta un punto en que cesan completamente de hacerlo. Los *Streptococos* continúan aún, puesto que resisten mayor cantidad de acidez, pero al fin la cantidad llegada a un máximo, termina también por perjudicarlos y disminuyen su actividad.

En el cuarto período intervienen los mohos y levaduras, que, prefiriendo el medio ácido, atacan los primeros las proteínas y las segundas el azúcar de leche remanente. Como resultado de la descomposición de los albuminoides, se forma amoníaco que neutraliza poco a poco el ácido, el cual también es destruído en parte por utilización directa de los hongos.

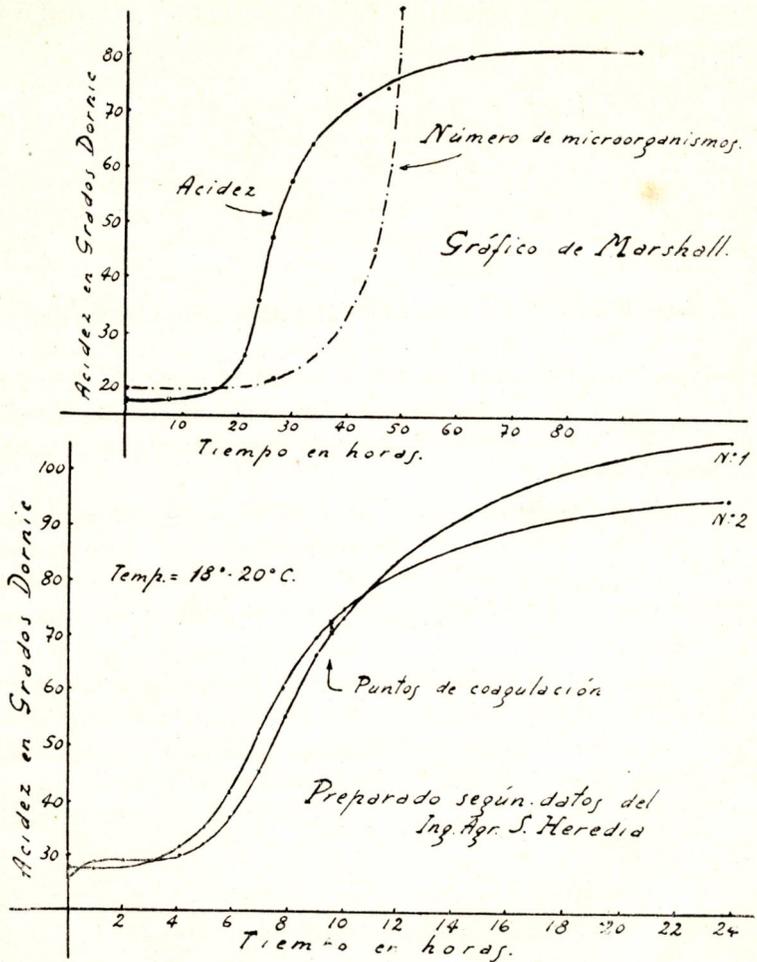
En un quinto y último período, habiendo desaparecido gradualmente el ácido, los fermentos proteolíticos que han podido sobrevivir en forma esporulada, comienzan de nuevo a ejercer su acción y transforman las substancias proteicas en términos menos complejos y solubles.

Si la temperatura varía desde un principio, este proceso general puede seguir muy distinto camino, así por ejemplo, si oscila entre 30-37°, son los fermentos del tipo *Aërogenes* que prevalecen desde un principio formando considerables cantidades de gas. Si ocasionalmente la temperatura es mayor (37-50°), entonces son los *Lactobacilos* del tipo *Bulgárico* que se encuentran en mejores condiciones, y es tal la acidez alcanzada por ellos que llegan a impedir la aparición de los mohos y levaduras destructores de ácidos, y como consecuencia, de los fermentos proteolíticos.

A veces sucede que desde un principio escasean enormemente los fermentos lácticos y entonces toman buen desarrollo los proteolíticos, que pueden coagular la leche enzimáticamente, conociéndose este hecho con el nombre de coagulación dulce.

En cultivo puro, los fermentos lácticos se comportan como en los períodos iniciales de la acidificación espontánea, y a continuación damos el gráfico N.º 2, mostrando la actividad del *Streptococcus*

*lacticus* expresada por el aumento y variaciones de la acidez, que puede ser tomada como un índice del progresivo ataque de la lactosa, o sea, del curso de la fermentación láctica.



N.º 2.—Marcha de la acidez en cultivos de *Streptococcus lacticus*

### VITALIDAD

La vitalidad de los fermentos lácticos es muy débil en su medio de cultivo natural, la leche; el ácido formado los hace perecer rá-

pidamente, y es para evitarlo que suelen agregarse a los medios de cultivo un neutralizador como la creta (Belonowsky). Especialmente beneficiosa para prolongar su vitalidad les resulta su asociación con las levaduras (Northrup, Steenberge), las cuales llegarían a mantenerlos activos por más de un año en leche.

Además de la destrucción del ácido, verificada por la levadura, quizás exista también un cierto beneficio por el mejoramiento de la alimentación azoada.

En los medios sólidos su vitalidad es un poco mayor que en los líquidos pero el acceso de aire los perjudica.

En fin, los cultivos en picadura, puesto que reducen la desecación y presentan poco contacto con el aire, serían muy convenientes para su conservación.

### CLASIFICACIONES DE LOS FERMENTOS LÁCTICOS

Basándose en el estudio de los caracteres morfológicos, culturales y biológicos de los numerosos microorganismos descriptos, se ha podido llegar en estos últimos tiempos a poner un poco de orden en las clasificaciones.

Es necesario precaverse, como lo ha hecho resaltar Gorini, contra los defectos que pueden imputársele a todas las clasificaciones que se basan especialmente en caracteres morfológicos y culturales, sin tener mayormente en cuenta la importancia de las propiedades fisiológicas.

Prácticamente, y por la participación de los fermentos lácticos en los diversos procesos de transformación de la leche, sus propiedades fisiológicas presentan la mayor importancia y es este seguramente el punto de vista moderno sobre la cuestión.

Antes de comenzar a esbozar algunas clasificaciones, haremos notar que Gorini, por observaciones hechas en los fermentos lácticos ácido-proteolíticos descriptos por él por primera vez, llega a la conclusión de que resultaría sumamente beneficioso para la simplificación en este asunto de los fermentos lácticos, que en lugar de hablar de especies, sub-especies, razas y variedades, sólo se trataría (como se desprende de sus estudios. ver *Le Lait. Revue générale des questions laitiers*, Año 2 N.º 1 Enero 1922), de variaciones o *mutaciones* de la especie, ligadas a diferencias normales en los individuos celulares.

Los ensayos para establecer especies definitivas se ven contra-

restandos por la dificultad de poder identificar las descripciones hechas. Es difícil comparar una descripción con un cultivo o series de cultivos, primero por la dificultad en transponer al papel con palabras lo que existe realmente y por las diferencias cuantitativas y cualitativas de apreciación individual. En segundo lugar, y más especialmente, por la inestabilidad de muchos de los caracteres usados para separar las especies o formar variedades, por ejemplo, al entrar a describir especies de fermentos lácticos, se nota que muchos caracteres no pueden tener la importancia sistemática que en otras especies.

Su forma, a más de ser pequeña, no presenta diferencias constantes y seguras. El desarrollo en los medios comunes de cultivo es pobre. En cambio, algunas de las características fisiológicas, como la fermentación de los azúcares, permiten una diferenciación entre los componentes de este grupo de microorganismos.

Rogers y Davis, han tratado de determinar cuáles entre los diferentes caracteres de los fermentos lácticos cumplen con dos de los más importantes principios en la elección de las propiedades para una clasificación, a saber: los caracteres deben ser constantes, y además, deben ser de tal naturaleza que demuestren una verdadera relación biológica entre los individuos que se comparan.

Para un estudio metódico de identificación de fermentos lácticos, y para conseguir su clasificación, los citados autores observan los caracteres morfológicos, agrupación de los individuos entre sí, coloración, sus caracteres culturales, su desarrollo en leche y la fermentación que hacen sufrir a diversos azúcares e hidratos de carbono. Suele darse la mayor importancia a este último punto, dado que constituye una característica fisiológica que facilita datos de valor para la clasificación.

Al hacer las observaciones, es menester tener en cuenta muchos factores secundarios que no pueden eliminarse tan fácilmente. Por ejemplo, la reacción de algún ejemplar de gelatina puede producir marcadas diferencias en el tamaño de las colonias desarrolladas, indicando una mayor o menor tolerancia a ciertas condiciones.

En el cultivo en caldo, el enturbiamiento demuestra un desarrollo rápido. A veces permanece claro el caldo y, sin embargo, aumenta la acidez, pudiendo explicarse esta aparente anomalía, por el hecho de que los individuos se agrupan en cadenas que por gravedad caen al fondo. En general, según Müller, el enturbiamiento se relaciona a la formación de individuos aislados o en pares, mientras que el hecho negativo (habiendo depósito) a la formación de cade-

nas. Cuando el no enturbiamiento del caldo es constante, puede ser de utilidad en la clasificación.

La reducción de nitratos (observación 7 días a 30°C), es una característica que puede ser utilizada con provecho para descartar individuos que resentan otras analogías con el grupo de los fermentos lácticos del tipo *Streptococo*, dado que sus representantes no dan en ese medio absolutamente desarrollo. La composición del medio puede verse en la pág. 229, al tratar de los medios de cultivo. La aparición de nitritos se demuestra por la reducción de yoduros a yodo metálico o por la reacción del alfa-naftil-amina y ácido sulfanílico.

Otra característica importante aunque de difícil aplicación es la reducción del rojo neutro (ver su composición pág. 229), que se observa en anaerobiosis después de 7 días a 30°C. Habiendo una cierta relación entre la reducción del rojo neutro, la licuación de la gelatina y la fermentación de los azúcares, puede ser utilizada esa propiedad como una comprobación de las nombradas.

La licuación de la gelatina se investiga sembrando en la superficie de los tubos sólidos con unas pocas gotas de cultivo líquido. Se marca el trazo superior con una seña y al cabo de unos 30 días se mide la cantidad licuada en milímetros.

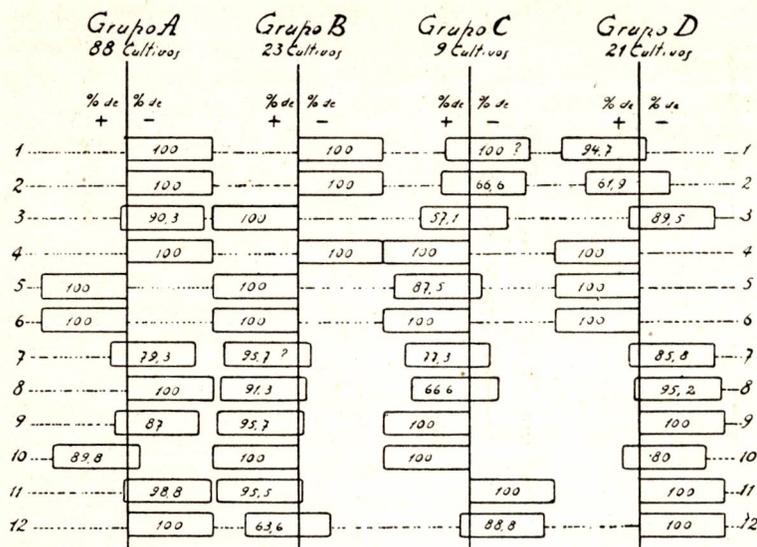
La fermentación de los hidratos de carbono, que constituye por otra parte un excelente dato para la clasificación, se estudia por el desarrollo en caldo con adición de la substancia cuya fermentación se busca, y tornasol. El cambio de coloración nos dice si la reacción es positiva o negativa. Para investigaciones cuantitativas, se dosa el ácido formado con NaOH N/10, usando fenolftaleína como indicador, y se expresa en ácido láctico por ciento. (La preparación del medio de cultivo puede verse en el capítulo sobre aislamientos).

La observación se hace después de 7 días a 30°C, salvo para la glicerina, en que se efectúa a los 14 días.

La producción de gases, se averigua con caldo glucosado (o lactosado), en los tubos de fermentación en U graduados, o más fácilmente, en pequeños tubos invertidos dentro de otros más grandes.

Damos a continuación, como ejemplo, el cuadro N.º 3 sacado de los trabajos de Rogers y Davis, que nos ilustra sobre las substancias que pueden utilizarse, y los resultados obtenidos. Se verá que los autores han podido distribuir un gran número de colonias estudiadas en cuatro grupos, dos de los cuales licúan la gelatina, mientras que los otros dos no lo hacen, y en cada uno de los dos de esta

primera división, uno de ellos fermenta la mayoría de los hidratos de carbono sometidos a prueba y el otro sólo algunos de entre ellos.



N.º 3.—Agrupación de fermentos lácticos  
(Según Rogers y Davis)

1. Buen desarrollo en gelosa.	7. „ „	„ sacarosa.
2. Reducción de nitratos.	8. „ „	„ glicerina.
3. Decoloración del Rojo neutro.	9. „ „	„ manita.
4. Licuación de la gelatina.	10. „ „	„ galactosa.
5. Fermentación de glucosa.	11. „ „	„ rafinosa.
6. „ „ lactosa.	12. „ „	„ inulina.

La fermentación de la rafinosa y la glicerina, y la licuación de la gelatina, tienen especial importancia. La sacarosa usada tan frecuentemente, presenta desde este punto de vista menos interés.

En cada grupo, no todos los individuos dan idénticas reacciones y deberá juzgarse con buen criterio observando el acercamiento que puedan presentar alrededor de un cierto tipo ideal. En cuanto a la constancia de las distintas propiedades, las opiniones no están aún de acuerdo y no se ha dicho en ese sentido la última palabra; pero si se tienen en cuenta los innumerables casos de diferencias que, cuando se las estudia perfectamente muchas de ellas resultan ser sólo individuales y no transmisibles por herencia, se espera entonces que se pueda admitir bien pronto una clasificación satisfactoria de los fermentos lácticos.

En el estado actual de nuestros conocimientos (de' Rossi), ni aún el nombre de fermento láctico se halla sólidamente establecido, puesto que existen otros organismos (quizás algunas levaduras, el *Rhizopus chinensis* según Saito), que producen también ácido láctico en pequeñas cantidades y además, en la fermentación láctica se producen otros ácidos orgánicos como el acético, etc., lo cual impide una completa delimitación y forma más bien toda una serie de pasajes entre fermentaciones diversas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, podemos afirmar que el valor de las clasificaciones existentes de los fermentos lácticos, debe ser tomado desde el punto de vista científico de un modo bien relativo. Pero prácticamente, algunas de ellas nos ilustran de una manera bastante satisfactoria sobre el reconocimiento de muchos microorganismos.

Como la mayoría de las descripciones existentes, están basadas sobre características morfológicas y de cultivo, no podrán dejarse de lado estos puntos, esperando quizás que el estudio cada vez más profundizado de estos microorganismos nos permitirá con el tiempo agruparlos en una clasificación lo menos artificialmente posible.

A continuación insertamos algunas clasificaciones, optando definitivamente por la de Löhnis modificada por de' Rossi, que nos parece ser la más completa.

#### CLASIFICACIONES DE BEIJERINCK Y JENSEN

Beijerinck considera dos grupos:

- 1.º Los *lactococos* que vegetan generalmente en la crema; prosperan entre 25° y 35°C. y dan ácido láctico dextrógiro.
- 2.º Los *lactobacilos* que prefieren los mostos de destilería, son frecuentes en el ensilage, en el choucroute, etc., se hallan bien con temperaturas superiores a 30° y dan ácido láctico levógiro.

Orla Jensen, divide los fermentos lácticos en verdaderos y pseudo-fermentos lácticos.

En los primeros reúne dos grupos separados entre ellos por la formación de catalasa, reducción de nitratos y desarrollo superficial en los medios de cultivo comunes. Dentro de cada uno establece subdivisiones basadas en caracteres morfológicos.

Entre los pseudo-fermentos lácticos, considera el *Bact. lactis aerogenes*, el *Bac. Coli* y afines.

I.º Fermentos lácticos verdaderos:

—A. No forman catalasa, reducen los nitratos, no se desarrollan en superficie:

- a. Solamente trazas de productos secundarios al lado de ácido láctico:

Formas alargadas: Género: *Thermobacterium*: *Tbm. helvecitum* (*Bact. casei* 'epsilon'), *Tbm. bulgaricum* (*Bacillus bulgaricus*), *Tbm. jugurt*; y Gé-

nero: *Streptobacterium*: Sbm. casei (Bacterium casei alfa). Sbm. plantarum.

Formas esféricas: Género *Streptococcus*: Sc. lactis (Bact. lactis acidi, Leichmann), Sc. faecium, Sc. liquefaciens, Sc. thermophilus, Sc. hollandicus, Sc. mastiditis (Sc. agalactiae), Sc. cremoris, Sc. pyogenes.

- b. Generalmente con producción de gas y otros productos secundarios al lado de ácido láctico:

Formas alargadas: *Betabacterium*: Bbm. breve (Bact. casei gama), Bbm. longum (Bact. casei delta), Bbm. caucasicum.

Formas esféricas: *Betacoccus* Leuconostocis; Sc. Brassicae.

- B. Forman generalmente catalasa, reducen nitratos y se desarrollan en superficie:

Formas alargadas: *Microbacterium*: Bac. acidophilus.

Formas esféricas: *Tetracoccus*. (Micrococcus y Sarcina).

- II.º Pseudo-fermentos lácticos:

A. Tipo Aerogenes.

B. Tipo Coli.

#### CLASIFICACION DE ROGERS Y DAVIS

Rogers y Davis dividen los microorganismos que toman parte en la acidificación de la leche, en cuatro grupos principales:

- 1er. *Grupo*: Incluyen los microorganismos que acidifican sin peptonización o formación de gases. Crecen mal en los medios artificiales y no licúan la gelatina.

Morfológicamente comprenden diversas formas, siendo en general cocos o cortos bastoncitos en grupos de dos o en cadenas de longitud variada. Los constituyentes de este grupo son los más comunes fermentos lácticos y su presencia en la leche es de tal manera constante que se los considera habitantes naturales de ese medio.

- 2.º *Grupo*: Lo constituyen los acidificadores con formación de gas. Abarca variedades del *Bacillus coli*, *Bacterium aërogenes* o *Bacillus acidi lactici* de Hueppe. Se distinguen fácilmente de los del primer grupo por su crecimiento abundante en los medios artificiales y por la formación de gases.

En la leche, su número aumenta por la influencia del calor y de las malas condiciones higiénicas en que ha sido obtenida.

- 3er. *Grupo*: Comprende los microorganismos que habiendo coagulado la leche en medio ácido, vuelven a disolver parcial o totalmente el coágulo. Este grupo puede abarcar formas que tienen especialmente con el grupo primero y aún con otros, una estrecha relación.

- 4.º *Grupo*: Incluye los bacterios de alto porcentaje de acidez, que responden al tipo de *Bacillus bulgaricus*. Este microorganismo se caracteriza por su forma alargada, por el aspecto de sus colonias en gelosa, por su inapetitud en crecer en los medios artificiales ordinarios de cultivo, y por su desarrollo en presencia de dosis relativamente elevadas de ácidos libres. Debido a que este grupo de microorganismos no prospera a las temperaturas normales, no es probable que sea un factor de importancia en la acidificación espontánea de la leche.

Puede observarse de paso que la más típica relación entre estos distintos grupos, la constituye, el poder de fermentar el azúcar de leche o lactosa, a ácido láctico coagulándose por consecuencia la caseína.

### Clasificación de Löhnis

Löhnis clasifica los fermentos lácticos en los siguientes cuatro grupos:

**Grupo 1.º:** *Bacterium pneumoniae* (Friedländer): Bastoncitos más bien gruesos, Gram. negativos, que forman gas, crecen bien en los medios comunes artificiales de laboratorio y no licúan la gelatina.

Representantes: *Bacillus acidi lactici* (Hueppe) y otros del grupo coli-aérogenes.

**Grupo 2.º:** *Streptococcus pyogenes* (Rosembach): Cocos esféricos, ovales, lanceolados o aplastados. Tienden a formar cadenas y a la anaerobiosis. Gram positivos. Poco desarrollo en los medios de cultivo comunes favoreciéndoles la presencia de hidratos de carbono.

Representantes: *Streptococcus lacticus*, los *Streptococos* del kefir y otras leches fermentadas, el *Bacillus acidi paralactici* 1 y 2 de Conn y Esten, el *Streptococcus acidi paralactici non liquefaciens Halensis* de Hasimoto, varios *Streptococos* aislados de queso, *Bact. lactis acidi Leichmann*, y muchos otros con propiedades y morfología de *Streptococos*.

**Grupo 3.º:** *Bacterium caucasicum* (Kern). Bastoncitos largos, más o menos delgados. De preferencia viven en anaerobiosis y forman filamentos. Gram positivos en cultivos jóvenes y negativos en cultivos viejos. Muchos producen elevada cantidad de ácido. Algunos y como excepción producen gases. Crecen poco en los medios comunes de laboratorio. En general coagulan la leche, pero algunos no llegan a hacerlo. Algunos tienen una óptima de temperatura muy elevada.

Representantes: *Bacillus bulgáricus*, *B. caucasicum* y *B. casei* Freudenreich, *B. Delbrücki*, Leichmann y otros.

**Grupo 4.º:** *Micrococcus pyogenes* (Rosenbach). Stafilococos, Gram positivos, aerobios, licúan la gelatina. Algunos coagulan la leche, otros no, y otros tienen tendencia a volverla "filante".

Representantes: *Micrococcus lactis acidi* de Marpmann, *Micr. acidi paralactici liquefaciens Halensis* de Kozai, *Micr. varians lactis* Conn, los *Micrococos ácido-coagulantes* de Gorini y otros.

### Clasificación de Löhnis modificada por de' Rossi

De' Rossi considera cinco grupos detallados a continuación:

#### 1er. Grupo. Streptococos lácticos

*Forma y disposición:* Elementos de forma variada, globulosa, ovalada, a veces alargada, reunidos ee dos en dos, o en cadenas de longitud variable.

*Movilidad:* Inmóviles.

*Formación de esporos y cápsula:* No forman esporos y están a menudo provistos de cápsula.

*Coloración de Gram:* Positiva.

*Influencia del aire:* Son anaerobios facultativos, encontrándose generalmente mejor en ausencia de aire.

*Temperaturas:* Temperatura óptima de vegetación: 30°-35°C.

*Desarrollo en los medios de cultivo comunes:* Crecen relativamente en los medios de cultivo peptonados, pero su desarrollo es en especial favorecido por la presencia de azúcares.

*Caracteres de las colonias en gelatina en caja de Petri:* En gelatina azucarada, las colonias producidas son muy pequeñas, circulares blancas o amarillentas, apareciendo el microscopio de estructura uniforme o granulosa, de color gris o amarillento y casi siempre más oscuras en la parte central, con borde liso u ondulado o con finísimas prolongaciones.

*Gelosa en estría:* Su desarrollo es escaso, apenas visible, transparente y de color blanco o grisáceo.

*Gelatina en picadura:* No licúan la gelatina, y su desarrollo se verifica a lo largo de la punción, en pequeñas colonias aisladas.

*Cultivo en caldo:* En caldo hay enturbiamiento o bien queda límpido y se forma depósito compacto. La producción de indol es rara. En caldo azucarado hay fuerte enturbiamiento.

*Cultivo en leche:* La leche es coagulada en 24 horas o más, de manera homogénea y compacta, y en general sin producción de gas.

*Azúcares fermentados:* Además de la lactosa los Streptococos lácticos hacen fermentar frecuentemente la glucosa, levulosa, galactosa, sacarosa, maltosa, glicerina y manita.

*Productos de fermentación:* Producen casi exclusivamente ácido láctico en general dextrógiro, con pequeñísimas cantidades de otros ácidos grasos. Excepcionalmente dan lugar a desprendimiento de anhídrido carbónico.

Como representante típico de este grupo de microorganismos, que

es en nuestro asunto el que nos interesa más directamente, insertamos a continuación la descripción del *Streptococcus lacticus* de Krüse: (1)

*Streptococcus lacticus* Krüse: (*Bact. lactis acidi* Reichmann, *Microc. (Streptoc.) acidi lactici* Grotenfeld, *Bat. Güntheri* Lehmann et Neumann, *Bac. acidi paralactici* Kozai, etc.).

*Formas, dimensiones y disposición:* Cocos o bacilos cortos, ovalados o lanceolados de 0,5-1 x 0,3-0,6 micrones, reunidos de dos en dos o en cortas cadenas.

*Movilidad:* Inmóviles.

*Formación de esporos:* No forman esporos.

*Coloración de Gram:* Gram positivos.

*Influencia del aire:* Anaerobios facultativos.

*Caracteres de las colonias en gelatina en caja de Petri:* En gelatina común dan colonias puntiformes, redondas, blancas o amarillentas. En gelatina azucarada alcanzan un desarrollo un poco mayor, pero siempre son pequeñas, delicadas, amarillentas, de márgenes bien delimitados y frecuentemente profundas.

*Gelosa en estría:* Desarrollo casi nulo y apenas visible.

*Gelatina en picadura:* No licúa la gelatina y corrientemente hay sólo desarrollo en profundidad.

*Caldo común:* Desarrollo escaso.

*Caldo glucosado o lactosado:* Hay fuerte enturbiamiento.

*Cultivo en papa:* Escaso desarrollo. Casi nulo.

*Cultivo en leche:* Se acidifica rápidamente y coagula en forma densa y homogénea.

*Azúcares fermentados y ácido láctico producido:* La glucosa y lactosa son fermentadas produciéndose ácido láctico dextrógiro sin formación de gas. La maltosa, sacarosa, arabinosa, manita y glicerina son también atacadas y con intensidad variable según los cultivos.

Las dos especies patógenas: *Streptococcus pyogenes* y *Streptoc. lanceolatus* Gameleia (= *Diploc. pneumoniae* Fraenkel et Weichselbaum), y el *Enterococo* descrito por Thiereelin como un común habitante del intestino y susceptible en algunos casos de adquirir propiedades patógenas, presentan todas una gran analogía de caracteres con *Streptoc. bacticus*. Pero varios autores, según de' Rossi, opinan que estos microorganismos, como también los que producen la mastiditis en las vacas, representados típicamente por *Streptoc. mastiditis* Guillebeau (= *Streptoc. agalactiae* Adametz), deben ser considerados como razas de los *Streptococos* lácticos comunes adaptadas a la vida parasitaria, mientras

(1) Las descripciones y citas provienen de de' Rossi,

otros creen que se trata de especies que presentan caracteres muy semejantes a aquellas, pero netamente distintas y su especial por su poder patógeno.

Al lado de los Streptococos lácticos típicamente *no productores de gas*, se cita un pequeño subgrupo de *gasógenos*, y otro de *productores de muco*, no siendo estos últimos, según Burri y Allemann, sino simples variedades de especies normales que sólo se diferencian de ellas por la presencia, en sus membranas celulares, de una substancia semejante a la quitina en estado de hinchamiento.

## 2.º GRUPO.—LACTOBACILOS, O BACILOS DEL TIPO BULGARICO, O FERMENTOS LACTICOS ALARGADOS

*Forma, dimensiones y disposición:* Bacilos rectos o ligeramente encurvados, de 2-3 x 0,5-0,7 micrones como término medio; frecuentemente dispuestos en largas cadenas o presentándose en forma de filamentos sin tabiques de separación, largos hasta 50 micrones o más.

Su forma puede aproximarse a la de los Streptococos en las condiciones desfavorables de vegetación, mientras que estando en buenas condiciones de nutrición se facilita la formación de filamentos. Según Kuntze y Barthel, la presencia de las granulaciones endo-celulares observadas en los lactobacilos (que pueden ponerse de manifiesto con el Bleu de Löffler por ejemplo, sería un carácter constante de este grupo.

*Movilidad:* Inmóviles.

*Formación de esporos y cápsula:* No forman esporos, y generalmente no son capsulados.

*Coloración de Gram:* Positiva.

*Influencia del aire:* Anaerobios facultativos u obligados.

*Condiciones de temperatura:* Para algunos la temperatura mínima es de 25° C. y la óptima 40-50°, sin embargo otros crecen todavía bien a 20° C.

*Desarrollo:* En general su desarrollo en los medios comunes de cultivo, es escaso. La presencia de un azúcar asimilable favorece su actividad vegetativa.

*Caracteres de las colonias en gelatina en caja de Petri:* No licuantes y de aspecto semejante a las del grupo anterior.

*Gelosa en estría:* Desarrollo muy escaso, constituido a veces por pequeñas colonias aisladas.

*Cultivo en caldo:* Las especies capaces de desarrollarse en el caldo común, forman sedimento sin enturbiarlo.

*Caldo glucosado o lactosado:* Se verifica enturbiamiento y el sedimento es más abundante.

*Cultivo en leche:* Algunos se desarrollan mal en leche, pero en general la acidifican formando un coágulo denso y homogéneo, sin separación de suero y generalmente sin desprendimiento gaseoso. Temperatura óptima de coagulación: variable según las especies de 30° a 50° C.

*Azúcares fermentados:* Todos los lactobacilos atacan los monosacáridos (glucosa, levulosa, galactosa) y muchos atacan también los disacáridos (sacarosa, lactosa, maltosa).

*Productos de fermentación:* El ácido láctico producido es el levógiro o el inactivo (raramente el dextrógiro). Además se producen: ácido succínico, ácidos volátiles (acético, fórmico, a veces propiónico, etc.). La acidez volátil

alcanza según Barthel al 1-7 o/o de la acidez total. Las especies productoras de gases parecen desprender solamente anhídrido carbónico.

Muchos lactobacilos aunque no licúan la gelatina, son capaces, sin embargo, de peptonizar la caseína.

*Vitalidad:* Según Barthel, en cultivos tenidos a 37° C, la vitalidad era de 5-10 días, y sólo de 2-5 días a 43° C.

La alta acidez alcanzada por los individuos de este grupo, llega a efectuar en ellos una autoesterilización en los cultivos en leche.

El grupo de los Lactobacilos puede ser dividido (de Rossi), en varios sub-grupos, a saber: 1.º *No productores de gas*. 2.º *Productores de gas*, 3.º *No productores de gas que acidifican la leche sin llegar a coagularla*, 4.º *Productores de gas que acidifican la leche sin llegar a coagularla* y 5.º *Productores de moco*.

Al 1er. *Subgrupo*, el de los Lactobacilos que coagulan la leche sin formación de gas, y que son los de mayor importancia, pertenece la especie colectiva *Bacillus bulgaricus* (*Bacterium bulgaricum*) Lürssen et Kühn.

### 3er. GRUPO.— GRUPO COLI-AEROGENES O FERMENTOS LACTICOS DEL TIPO BACTERIUM ACIDI LACTICI

*Forma, dimensiones y disposición:* Bacilos más bien cortos que miden en general 1-1,5 x 0.7-1 micrones, pero pueden ser más gruesos o bien de forma filamentososa, y que quedan aislados, reunidos de dos o formando cadenas.

*Movilidad:* Generalmente inmóviles.

*Formación de esporos y cápsula:* Nunca forman esporos y a veces son capsulados.

*Coloración de Gram:* Negativos.

*Influencia del aire:* Anaerobios facultativos.

*Temperaturas:* El óptimum de temperatura para su desarrollo es de 28° a 42° C.

Para la coagulación, la mínima es de 15° C, la óptima de 30°-40° y la máxima de 45° C.

*Desarrollo:* Se desarrollan bien sobre los medios de cultivo comunes.

*Caracteres de las colonias en gelatina en caja de Petri:* Las colonias superficiales son hemisféricas, de contornos netos o bien planas y de contornos irregulares, a veces transparentes y casi incoloras, y a veces blancas o amarillentas.

Vistas al microscopio, aparecen sin estructura definida, o finamente granulosas, o radiadas o bien Colisímiles, y de color amarillento o marrón y más obscuras en el centro. Las colonias profundas aparecen opacas al microscopio, son globosas de márgenes netos, y blancas o de color marrón.

*Gelosa en estría:* El desarrollo es abundante, de aspecto mucoso o gelatinoso y de color blanco, gris o amarillento.

*Gelatina en picadura:* No licúan la gelatina, y el desarrollo es a veces abundante, a veces escaso a lo largo de la punción; en la parte superior forma cabeza de clavo.

*Cultivo en caldo:* El desarrollo en caldo común de carne es abundante, hay enturbiamiento y depósito mucoso o velloso, formándose con frecuencia una película superficial delgada.

La producción de Indol es variable según las especies, habiendo algunas

que producen apreciables cantidades, mientras otras dan cantidades escasas o nulas.

*Cultivo en papa:* Su desarrollo es variable: en ocasiones es pobre e incoloro y en otras abundante, blanco, amarillento o marrón, produciéndose a veces burbujas de gas.

*Cultivo en leche:* Generalmente coagula en 1-2 días con producción de gas. A veces se vuelve filante y excepcionalmente no se observa transformación aparente.

*Azúcares fermentados:* Además de la glucosa y lactosa, algunas especies fermentan también la levulosa, galactosa, sacarosa, maltosa, arabinosa, xilosa, manita y glicerina.

*Productos de la fermentación:* Además del ácido láctico, que en general es levógiro y raramente dextrógiro o inactivo, producen en proporciones muy variables, ácido acético, succínico, fórmico, alcohol etílico y casi siempre gas, consistente en anhídrido carbónico e hidrógeno y a veces también en metano.

Los fermentos lácticos de este grupo, pueden también reunirse en varios subgrupos teniendo en cuenta las características principales.

El 1er. *Subgrupo*, o sea, los que coagulan la leche con producción de gas. y que es el más numeroso, está constituido por especies colisímiles que se agrupan alrededor de un tipo característico, el *Bact. aërogenes* (Escherich) *Migula*, o *Bact. acidi lactici* Hueppe, que sólo se diferencia del típico *Bac. Coli* por la ausencia de movilidad. Algunos autores han encontrado también diferencias entre *Bact. aërogenes* y *Bact. acidi lactici*, pero parece tratarse de pocos caracteres que entran en el campo de la variabilidad.

Casi idéntico a los anteriores es el *Bact. acidi lactici* Grotenfeld.

Además en el *Subgrupo* de los productores de gas que no llegan a coagular la leche. se comprenden *Bact. pneumoniae* y otros bacterios capsulados que carecen aquí de importancia.

#### 4.º GRUPO.—MICROCOCOS LÁCTICOS

*Forma, dimensiones y disposición:* Cocos. de 0,8 a 1,6 micrones de diámetro, aislados o reunidos de dos en dos, o en fin, dispuestos irregularmente (*Staphilococcus*) pero nunca formando cadena.

*Movilidad:* Inmóviles.

*Formación de esporos y cápsula:* No forman esporos y raramente son capsulados.

*Coloración de Gram:* Gram positivos.

*Influencia del aire:* Anaerobios facultativos, siendo sin embargo algunos, muy favorecidos por la presencia de oxígeno.

*Temperaturas:* Se desarrollan bien entre 20º y 30º C. Habiendo algunos que lo hacen asimismo a más baja o más alta temperatura.

*Desarrollo:* Sus exigencias nutritivas son pocas, por lo tanto se desarrollan bien en los medios de cultivo comunes, pudiendo hacerlo aún en medios privados de albúmina.

*Caracteres de las colonias en gelatina en caja de Petri:* Las superficiales son circulares, algo cóncavas o convexas, de aspecto húmedo y de color blanco-amarillento o marrones. Al microscopio aparece un núcleo opaco gris-amarillento, marrón o negro, de estructura granulada, y los bordes son generalmente

lisos y continuos, pero a veces presentan una zona periférica irregular, con fisuras o ramificaciones.

*Gelosa en estria*: Se desarrollan bien presentando un aspecto húmedo y un color blanco o pigmentado.

*Gelatina en picadura*: Algunas especies licúan la gelatina. Hay desarrollo superficial, siendo a lo largo de la picadura, a veces escaso a veces abundante.

*Cultivo en caldo*: El caldo queda claro o enturbia, formándose un depósito a veces finamente algodonoso y a veces más firme. Producen frecuentemente Indol.

*Cultivo en papa*: Desarrollo de aspecto húmedo o seco, y blanco o pigmentado.

*Cultivo en leche*: La coagulación se verifica en finísimos copos o bien de manera compacta, volviéndose a veces filante, mucoso o amargo.

*Productos de fermentación*: Además de ácido láctico, producen ácidos volátiles y es raro el desprendimiento gaseoso.

Los Micrococos lácticos pueden dividirse en dos subgrupos:

1er. *Subgrupo*: *Proteolíticos* (licuantes de la gelatina): son los más interesantes y en realidad pertenecen al grupo siguiente de los Acido-proteolíticos.

2.º *Subgrupo*: *No proteolíticos* (que no atacan la gelatina), al cual pertenecen *Micrococcus lactis acidii* Marpmann, y los micrococos productores de ácido láctico en el vino, como *Microc. malolacticus*, etc.

Existen además una gran cantidad de cocos que sólo producen en la leche escasas cantidades de ácido láctico y que también se refieren a este grupo.

#### 5.º GRUPO.—FERMENTOS LACTICOS ACIDO-PROTEOLITICOS

Comprende un grupo fisiológico que reúne especies correspondientes también a cualquier otro de los grupos anteriores, pero que poseen la propiedad de coagular la leche *por medio de diastasas en medio ácido* y efectuar posteriormente una parcial o total *redisolución de la caseína*. Constituye éste un grupo aún no perfectamente estudiado y es probable que vaya enriqueciéndose en nuevos representantes a medida que se estudia mejor en las diversas especies la propiedad caseinolítica, y que según estudios de Gorini está bajo la dependencia inmediata de diversos factores que pueden hacerla alterar. Es conveniente recordar también que el poder de disolución sobre la caseína no implica a la vez la licuación de la gelatina, de modo que por este último carácter no será posible reconocer todas las especies proteolíticas con acción sobre la caseína.

Pueden citarse: *Bact. minimum mammae*, *Microc. acido-proteolyticus I y II*, y *Bac. acidificans presamigenis casei* descriptos por Gorini, *Microc. acidii lactis liquefasciens* Krüger; estando los Micrococos relacionados con *Microc. pyogenes*. Además se incluyen varias *Sarcinas* proteolíticas y en fin algunos *Colisímiles* licuantes de la caseína.

A continuación damos un esquema de la división de los Fermentos lácticos en grupos y subgrupos, y en seguida un cuadro general donde figuran la mayoría de las características de cultivo de los grupos mencionados.

*Grupos*

*Subgrupos*

- |  |   |   |                        |   |  |                                    |   |   |
|--|---|---|------------------------|---|--|------------------------------------|---|---|
| I). Streptococos lácticos: .                         | } | 1.° No productores de gas.<br>2.° Productores de gas.<br>3.° Productores de mucos.  |                        |   |  |                                    |   |   |
| II). Lactobacilos: .....                             | } | <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: middle;">Que coagulan la leche:</td> <td style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> <td style="vertical-align: middle;">           1.° No productores de gas.<br/>           2.° Productores de gas.         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: middle;">Que no llegan a coagular la leche:</td> <td style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> <td style="vertical-align: middle;">           3.° No productores de gas.<br/>           4.° Productores de gas.         </td> </tr> </table> 5.° Productores de mucos. | Que coagulan la leche: | } | 1.° No productores de gas.<br>2.° Productores de gas.                | Que no llegan a coagular la leche: | } | 3.° No productores de gas.<br>4.° Productores de gas. |
| Que coagulan la leche:                               | } | 1.° No productores de gas.<br>2.° Productores de gas.   |                        |   |  |                                    |   |   |
| Que no llegan a coagular la leche:                   | } | 3.° No productores de gas.<br>4.° Productores de gas.   |                        |   |  |                                    |   |   |
| III). Grupo Coli-aérogenes:                          | } | <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: middle;">Productores de gas:</td> <td style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> <td style="vertical-align: middle;">           1.° Que coagulan la leche.<br/>           2.° Que no llegan a coagular la leche.         </td> </tr> </table> 3.° No productores de gas.<br>4.° Productores de mucos.  | Productores de gas:    | } | 1.° Que coagulan la leche.<br>2.° Que no llegan a coagular la leche. |                                    |   |   |
| Productores de gas:                                  | } | 1.° Que coagulan la leche.<br>2.° Que no llegan a coagular la leche.  |                        |   |  |                                    |   |   |
| IV). Micrococos lácticos:..                          | } | 1.° Proteolíticos.<br>2.° No proteolíticos.   |                        |   |  |                                    |   |   |
| V). Fermentos lácticos ácido-proteolíticos (Gorini). |   |   |                        |   |  |                                    |   |   |

## Streptococœs lácticos

## Lactobacilos

<i>Forma, dimensiones y disposición:</i>	Coccos o muy cortos bacilos de forma variada. Reunidos de dos en dos o en cadena.	Bacilos. Término medio 2-3 x 0,7 $\mu$ . Frecuentemente en cadena. A veces filamentosos continuos hasta 50 $\mu$ .
<i>Movilidad:</i>	Inmóviles.	Inmóviles.
<i>Formación de esporos:</i>	No forman esporos.	No forman esporos.
<i>Coloración de Gram:</i>	+	+
<i>Influencia del aire:</i>	Anaerobios facultativos. Se encuentran mejor generalmente en ausencia de aire.	Anaerobios facultativos u obligados.
<i>Influencia de la temperatura:</i>	Optima de vegetación alrededor de 30° C. Se desarrollan también bien alrededor de 20° C.	Mínima media 25° C. Optima 40°-50°. Optima de coagulación variable 30°-50°.
<i>Desarrollo en los medios de cultivo comunes:</i>	Poco. Son favorecidos por la presencia de azúcares.	En general escaso. Favorecido por la presencia de azúcares.
<i>Licuefacción de la gelatina:</i>	No licúan la gelatina.	No licúan la gelatina.
<i>Cultivo en caldo común:</i>	Poco desarrollo. Enturbia o queda límpido formándose depósito compacto.	Algunos se desarrollan pero forman depósito sin enturbiar.
<i>Cultivo en papa:</i>	En general escaso o nulo.	En general escaso o nulo.
<i>Cultivo en leche:</i>	Coagula en forma homogénea y compacta.	En general coagula homogéneamente sin separación de suero ni desprendimiento gaseoso.
<i>Producción de gas:</i>	En general negativa.	Algunos producen.
<i>Producción de Indol:</i>	Raramente.	
<i>Naturaleza del ácido láctico:</i>	En general dextrógiro.	Levógiro o inactivo. Raramente dextrógiro.

## Grupo Coli-aerogenes

## Micrococcos lácticos

## Acido-proteolíticos

Bacilos. En general 1-1,5 x 0,7-1  $\mu$   
Aislados, en par o en cadena.

Cocos. Diámetro 0,8-1,6  $\mu$ . Aislados, en par o reunidos irregularmente. Nunca formando cadena.

Variable y de acuerdo con los grupos anteriores a que también pertenecen.

Generalmente inmóviles.

Inmóviles.

Id. id. id.

No forman esporos.

No forman esporos.

Id. id. id.

—

+

Id. id. id.

Anaerobios facultativos.

Generalmente anaerobios facultativos.

Id. id. id.

Optima de desarrollo 28°-42°. Mínima de coagulación 15°. Optima 30°-40°. Máxima 45°.

En general se desarrollan bien entre 20° y 30° C.

Id. id. id.

Bueno. En gelosa es abundante.

Bueno. Se desarrollan aún en ausencia de albúmina.

Id. id. id.

No licúan la gelatina.

Algunas especies licúan.

En general licúan la gelatina, pero pueden aún no licuarla y atacar sin embargo la caseína. Quedan incluidos en este grupo cualquiera de los representantes de los otros, siempre que coagulen, con baja acidez, por medio de diastasas, y tengan posteriormente acción disolvente sobre el coágulo.

Desarrollo abundante. Enturbiamiento, depósito y con frecuencia película superficial.

Queda claro o enturbia. Formación de depósito.

Desarrollo variable. A veces con burbujas de gas.

Hay desarrollo blanco o pigmentado.

En general coagula con producción de burbujas de gas.

Coagula en finos copos o en forma compacta.

Generalmente positiva. (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> a veces CH<sub>4</sub>).

Rara.

Variable pero frecuente.

Producen Indol con frecuencia.

En general levógiro. Raramente dextrógiro o inactivo.

## AISLAMIENTO

Para el aislamiento de los fermentos lácticos, se tiene en cuenta las diferencias existentes entre los diversos grupos y las propiedades específicas.

En general, puede utilizarse la gelatina o la gelosa común lactosada o glucosada al 1-2 o/o.

La gelatina o gelosa de suero de leche, tornasolada (pág. 226), o con adición de  $\text{CaCO}_3$  (1-2 o/o) según aconseja Beijerinck, da aún mejores resultados; de esta manera, las colonias ácidas se distinguen fácilmente por el viraje al rojo del tornasol o la aparición de una aureola clara por la descomposición del carbonato.

Van Steenberge emplea métodos de aislamientos y de enriquecimiento que se basan en los siguientes principios generales, los tres primeros ya establecidos por Beijerinck:

1.° La presencia de la levadura alcohólica favorece en mucho el desarrollo de los fermentos lácticos.

2.° Su cultivo puede hacerse en anaerobiosis.

3.° A determinadas temperaturas corresponde la pululación de determinadas especies.

4.° La autólisis de la levadura de destilería constituye un medio favorable al desarrollo de ciertas especies, siendo impropio al desarrollo de otras.

El 3.° de estos principios es el más comúnmente usado para el enriquecimiento de ciertas especies, a raíz del cual se hace un aislamiento en el medio más conveniente.

Del primero se puede echar mano en caso de existir al principio muy pocos fermentos lácticos y de los otros dos en casos especiales.

Además, como ahora veremos, algunos otros procedimientos son utilizados.

1.—Para el aislamiento de los representantes del grupo de los *Streptococos lácticos*, el más típico de los cuales sería el *Streptococcus lacticus* de Krüse puede utilizarse la propiedad de desarrollarse muy bien a temperatura alrededor de 20° C. En general puede considerarse establecido, como lo han demostrado diversos autores, que las temperaturas más bien bajas favorecen el desarrollo de los fermentos lácticos de los tipos Micrococos y Acido-proteolíticos; de 15° a 25° predominan los del tipo Streptococo; a temperaturas más elevadas se encuentran mejor los del tipo Coli-aérogenes, prevaleciendo en absoluto los Lactobacilos a temperaturas sobre 40° C.

Para los Streptococos se hace un cultivo de enriquecimiento dejando a la temperatura ambiente o mejor de 20-22° una muestra de leche, y una vez que sobreviene la coagulación se pasa por una o dos veces más en leche esterilizada hasta nueva coagulación, permaneciendo siempre a 20-22°.

Prácticamente, cuando la leche inicial ha sido tomada en buenas condiciones y puesta en seguida a esa temperatura, puede hacerse el aislamiento directamente después de la primera coagulación.

Un buen índice del predominio de estos microorganismos, es la falta de burbujas gaseosas en el coágulo ácido.

El aislamiento puede hacerse en gelatina o gelosa comunes o mejor glucosada o lactosada. De preferencia se utiliza gelatina o gelosa de suero de leche (gelatina al suero-peptona de Leichmann). Al final de este capítulo daremos unas cuantas fórmulas para la preparación de estos medios de cultivo.

Los caracteres de las colonias en las cajas de Petri, y demás observaciones culturales, se comparan con las descripciones de las características generales que se dan en cada grupo. (Véase también el cuadro preparado al efecto).

2.—Para aislar los *Lactobacilos*, o sea los fermentos lácticos pertenecientes al tipo bulgárico, suelen hacerse cultivos de enriquecimiento a la temperatura de 40° C. en leche u otros substratos nutritivos, como el caldo de carne glucosado al 2 o|o, con adición de 0,5 o|o de ácido acético glacial, aprovechando las propiedades de su desarrollo a altas temperaturas y de su tolerancia por la acidez.

Otros medios de enriquecimiento que se basan en la positiva ventaja que les reporta su simbiosis con las levaduras, pueden ser el suero de leche con extracto de levadura o la leche con levadura. (Ver fórmulas N.° 4 y 5).

Su aislamiento, se hace en gelatina o gelosa de suero de leche con creta o la gelosa común con 2 o|o de glucosa y 0,5 o|o de ácido acético (Heinemann y Hefferan).

3.—Los fermentos lácticos del grupo *Coli-aërogenes* pueden aislarse en los medios comunes de cultivo. Teniendo en cuenta que su óptima de temperatura oscila entre 25°-40° C. (óptima media =32°), puede hacerse un cultivo de enriquecimiento en leche haciéndola coagular, si se prefiere, durante varios pasajes, manteniéndola a esa temperatura.

Como métodos especiales aplicables al aislamiento y determinación de este grupo, suelen emplearse, especialmente cuando la proporción en que se encuentran en los medios de donde se los quiere

aislar es muy escasa, diversos métodos de enriquecimiento, colocándolos en condiciones tales de medio ambiente, temperatura, etc., de permitirles invadir el medio, evitando a la vez el desarrollo de la mayor parte de las demás especies. Estos métodos fueron aplicados en un principio a la investigación del Coli-bacilo en el agua, pero se utilizan igualmente cuando se trata de su investigación y la de sus congéneres, en la leche.

Por una parte se encuentran los métodos basados en la resistencia a las altas temperaturas ( $41^{\circ}$ - $45^{\circ}$ ) y a la facultad de desarrollarse en presencia de ciertas sustancias, como el ácido fénico, el cristal violeta, etc., que resultarían nocivas para los demás microorganismos, permitiendo sólo el desarrollo de los del grupo Coli-bacilo y de algunos otros pocos como por ejemplo el Bac. subtilis. Se reúnen los dos factores: temperatura (de unos  $42^{\circ}$  C.) y presencia de ácido fénico (cantidad suficiente como para tener una concentración en el medio de 0,10-0,15 o/o) haciendo un cultivo de enriquecimiento como se acostumbra para el aislamiento del Coli-bacilo en el agua.

A las 24 horas en el caldo fenicado se observaría desarrollo en el caso de contener la leche especies Coli-símiles. En mérito al contenido de microorganismos de la leche es necesario sembrar diluido o en pequeñas cantidades.

Como medio electivo, de Rossi cita además el método de Neri, consistente en hacer un cultivo de enriquecimiento al  $37^{\circ}$  con el siguiente medio: Agua 1000 + Extracto de carne Liebig 10 + Peptona Witte 10 + NaCl 5 + Glucosa 10 + Rojo neutro 0,05, que como se ve no es más que caldo salado, peptonado y glucosado con adición de Rojo neutro. Se siembra diluido, preferentemente en tubos de fermentación y a las 24 horas se produce desarrollo de gases, pasando el color rojo del líquido a amarillo-canario con fluorescencia verdosa.

En ambos casos debe seguirse el aislamiento en uno de los medios sólidos comunes o bien pueden emplearse con provecho algunos medios de cultivo con indicadores apropiados, que si bien no dan una exacta identificación, limitan mucho las observaciones que se circunscriben así a un menor número de colonias.

La gelosa común lactosada al 2 o/o, ligeramente alcalinizada y tornasolada (ver fórmulas N.º 1-3), constituye el agar de Wurtz, en el cual, a  $37^{\circ}$  de temperatura, en 24-48 horas, las colonias del grupo Coli-aérogenes, aparecen rodeadas de una aureola rosada debida a la acidez.

El agar de Ayers y Johnson, es semejante al anterior, también tornasolado, pero además con asparagina y fosfato de sodio, y que según los autores, es el más conveniente entre los numerosos medios de cultivos controlados por ellos, para aislar el Coli-bacilo y los Coli-símiles.

El agar de Drigalski-Conradi, es agar común peptonado, salado y lactosado, al cual se agrega tornasol y cristal violeta, las colonias aparecen rojizas sobre fondo azulado.

El agar de Endo, en fin, es agar lactosado, con fuchsina y sulfito de sodio, el cual reduciendo la fuchsina, decolora el substrato.

Las colonias vuelven a colorear el medio en el punto en que crecen, de intensamente rojo.

4.—Para el aislamiento de los representantes del grupo de los *Micrococos lácticos*, pueden usarse los mismos métodos referidos al hablar de los del tipo Streptococo, insistiendo además en la propiedad de desarrollarse bien también a temperaturas menores, y de no exigir mayormente substancias nutritivas, llegándose a desarrollar en medios privados de albúmina.

5.—En fin, en el aislamiento de los fermentos lácticos, del grupo de los *Acido-proteolíticos* de Gorini, siendo que están relacionados a algunos de los demás grupos descritos antes, especialmente a los Streptococos y Micrococos lácticos, salvo la propiedad característica de disolver el coágulo formado en un principio con muy baja acidez, debido a la secreción de enzimas especiales, pueden utilizarse los métodos citados, identificándose ulteriormente por dicha propiedad de disolver la caseína en medio ácido.

Por lo demás, estas no dejan de ser normas generales, que dan siempre lugar a la aplicación de uno u otro de los métodos convenientes según el criterio personal.

A continuación detallamos la mayoría de las fórmulas citadas para el aislamiento de los fermentos lácticos:

1. **Gelatina y gelosa común lactosada o glucosada:**

Agua . . . . .	1000 c.c.
Extracto de carne Liebig . . . . .	10 grs.
Peptona Witte . . . . .	10 "
NaCl . . . . .	5 "
Glucosa o lactosa . . . . .	10-20 "
Gelatina . . . . .	120-140 "
o Gelosa . . . . .	15-18 "

**2. Gelatina y gelosa de suero de leche (Gelatina al suero-peptona de Leichmann):**

Suero de leche ... ..	1000 grs.
Peptona Witte ... ..	10 „
NaCl ... ..	5 „
Gelatina ... ..	120-140 „
o Gelosa ... ..	15-18 „

El suero se obtiene coagulando con cuajo la leche a 35° C., llevando a 70° y filtrando.

**3. Gelatina y gelosa con creta o tornasol:**

La *creta* se agrega a las fórmulas anteriores, en proporción de 1-2 por ciento.

La solución de *tornasol* se mezcla en el momento de usarse con la gelatina o la gelosa licuadas, a razón de 1 c.c. por cada tubo.

*Solución de tornasol:* Se extraen los panes pulverizados con agua destilada caliente. La solución filtrada se evapora, se satura con ácido acético (desprendiéndose CO<sub>2</sub>) y se sigue evaporando hasta consistencia siruposa.

A la masa se agrega en un frasco una mayor cantidad de alcohol de 90°, precipitándose así una materia colorante azul, mientras queda en solución una materia colorante roja y acetato alcalino. Se filtra y lava con alcohol y el residuo azul se disuelve en agua caliente y se filtra .

La solución se prueba, coloreando unos 100 c.c. de agua con una pequeña cantidad, se divide en dos partes agregando a una un mínimo de un ácido muy diluído y a la otra un mínimo de un álcali muy diluído. Si en el primer caso se observa una coloración roja y en el segundo una azul, la solución está bien preparada.

Se conserva en frascos con tapón de algodón, después de haber sido esterilizada.

**4. Leche con levadura (Rubinsky):**

Leche ... ..	1000 c.c.
Levadura comprimida ... ..	10-50 grs.

**5. Suero de leche con extracto de levadura (Stevenson):**

Suero de leche ... ..	1000 c.c.
Extracto de levadura ... ..	100 „

El extracto de levadura se obtiene tratando 100 grs. de levadura con 100 c.c. de agua en autoclave por 1|2-1 hora, filtrando tres veces y llevando el filtrado a 100 c.c.

**6. Agar de Ayers y Johnson:**

Agua . . . . .	1000 c. e.
Asparagina . . . . .	3 grs.
Fosfato disódico . . . . .	1 „
Lactosa . . . . .	10 „
Gelosa . . . . .	15 „
Solución sat. de tornasol . . . . .	20 c. e.

**7. Agar de Drigalsky-Conradi:**

A. Agua . . . . .	1000 c. e.
Extracto de carne Liebig . . . . .	10 grs.
Peptona Witte . . . . .	10 „
Nutrosa . . . . .	10 „
NaCl . . . . .	5 „
Gelosa . . . . .	15 „
B. Solución de tornasol (Kahlbaum). . . . .	150 grs.
Lactosa . . . . .	15 „
C. Cristal violeta (Höchst) 1 o oo . . . . .	10 c. e.

Se esterilizan aparte A y B, se mezclan y se neutralizan con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10 o|o y se alcalinizan con 2 c. e. más.

Se esteriliza el todo y se agrega el Cristal violeta en solución en agua destilada y esterilizada.

Se distribuye en cajas de Petri y se hacen los aislamientos en superficie.

**8. Agar de Endo:**

Caldo común neutralizado . . . . .	1000 c. e.
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ al 10 o o . . . . .	10 grs.
Lactosa . . . . .	10 „
Solución alcohólica de Fuchsina . . . . .	5 c. e.
Solución acuosa de sulfito de Na. frescamente preparada al 10 o o . . . . .	25 „

**9. Gelosa de suero de Klimmer y Sommerfeld (sin intervención de altas temperaturas):**

A. Suero de leche . . . . .	
B. Agua destilada . . . . .	1000 c. e.
Na. Cl . . . . .	5 grs.
Gelosa . . . . .	20 „

Se coagula la leche por el cuajo a 40°, se filtra por papel y por amianto hasta pasar casi claro. Se recoge en recipiente esterilizado, se agrega el 5 o|o de cloroformo y se cierra con tapón de goma. Después de unos 15 días el suero está esterilizado y entonces se separa el depósito de cloroformo, se calienta a 40-42° y se

mezcla en partes iguales a la solución de gelosa B. previamente esterilizada y enfriada a 42°. El todo se tiene a 40-42° por 1|2-1 hora, y luego se agrega la leche cuyo cultivo quiere hacerse y se distribuye en cajas de Petri.

**10. Agua de peptona nitrada.** (Para la reducción de los nitratos):

Agua destilada . . . . .	1000 c.c.
Peptona . . . . .	10 grs.
KNO <sub>3</sub> . . . . .	2 „

**11. Rojo Neutro:**

Caldo común neutro . . . . .	1000 c.c.
Glucosa . . . . .	5 grs.
Solución de Rojo neutro (Grübler) al 0,5 o o . . . . .	10 c.c.

El caldo neutro puede hacerse con:

Agua . . . . .	1000 c.c.
Extracto de carne . . . . .	4 grs.
Peptona . . . . .	10 „

**12. Medio de cultivo para el estudio de la fermentación de los Hidratos de Carbono.** (Rogers y Davis):

Agua . . . . .	1000 c.c.
Extracto de carne . . . . .	4 grs.
Peptona . . . . .	10 „
Monofosfato de K. . . . .	5 „
Substancia fermentescible . . . . .	20 „

El fosfato de potasio se agrega para neutralizar al principio la acidez producida y facilitar así el desarrollo y la formación de nueva acidez.

**Médios de cultivo sintéticos**

**13. Líquido de Uschinsky.** (En substitución del caldo común):

Agua destilada . . . . .	1000 c.c.
Glicerina . . . . .	30-40 grs.
Asparagina . . . . .	3-4 „
Lactato de amonio . . . . .	6-7 „
NaCl . . . . .	5-7 „
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	0,1 „
MgSO <sub>4</sub> . . . . .	0,2-0,4 „
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	2-3 „

14. **Lactosuero (Bordas y Joulín). (En substitución de la leche):**

Agua destilada . . . . .	1000 c.c.
Albúmina de huevo pulverizada . . . . .	18 grs.
Lactosa . . . . .	55 „
NaCl . . . . .	0,6 „

Alcalinizar con Na(OH).

## 2.<sup>a</sup> PARTE.—FABRICACION DE MANTECA CON FERMENTOS LACTICOS

El origen de la moderna fabricación de manteca utilizando los fermentos lácticos, debe buscarse en el hecho, hace ya mucho tiempo comprobado, de que las mantecas elaboradas de cremas que hayan alcanzado una cierta acidez, poseen un aroma, un "bouquet" característico, del cual carecen o tienen en mucho menor grado aquellas que provienen de cremas dulces o de baja acidez.

Este hecho se puso especialmente de relieve cuando, alrededor de 1880 comenzaron a usarse las primeras desnatadoras. Por la razón de verificarse con ellas un trabajo rapidísimo, se obtenían cremas llamadas dulces, de muy baja acidez, las cuales si eran batidas sin que hubiera transcurrido mucho tiempo, daban mantecas que carecían del aroma y sabor característicos de aquellas provenientes de cremas que habían sido separadas con el antiguo método del desnatado natural. En estas últimas, debiendo transecurrir un cierto tiempo para la separación de la materia grasa que subía a la superficie por diferencia de densidad, la crema sufría a la vez una acidificación natural y obligada.

La acidez era el índice de referencia de la fermentación láctica que se verificaba en dichas cremas abandonadas a sí mismas.

Establecida la comparación entre cremas dulces y cremas ácidas o fermentadas, y vista la relativa ventaja de estas últimas en lo que a sabor y aroma se refiere, nace de aquí la utilización de los fermentos lácticos para la fabricación de manteca.

Hoy día se presenta esta utilización bajo distintas formas, la más sencilla de las cuales consiste en la misma acidificación natural y espontánea que puede hacerse sufrir a la crema dulce.

Sin embargo, sólo con el empleo de los cultivos puros de fermen-

tos lácticos preconizados por Storeh de Copenhague, en Dinamarca, en 1890, se ha podido llegar, en estos últimos tiempos, al máximo de seguridad en sus resultados y a los mejores éxitos en la práctica, como más adelante veremos.

Muchos de los caracteres que poseen las mantecas de cremas fermentadas, son de tal naturaleza que actúan como causas principales para justificar su fabricación, pero en último caso siempre queda como razón de su existencia, la demanda de cierta clase de consumidores, cuyo paladar está educado en tal forma que no tolera la presencia de la materia grasa por sí sola sin estar acompañada por ese sabor característico que incita a consumirla.

A propósito de este renglón, cito gustoso la opinión de uno de los Directores de las más renombradas fábricas entre nosotros, el cual, hablando del consumo que se hace de las mantecas, decía que aquí el público en general no está acostumbrado aún a diferenciar los distintos tipos que se le puedan presentar, utilizando el producto tal cual viene y con una única preocupación: que el contenido de agua sea el más bajo posible. Sólo se hace la diferencia entre manteca salada y manteca dulce, pero nada más.

Sin embargo, una enseñanza, de parte de los grandes productores, no dejaría de tener inmediato provecho para ellos y para los consumidores en general. Al principio, la manteca de crema fermentada quizás sería un artículo de lujo precisamente por su delicadeza en el consumo, pero una vez conocida en circulación, constituiría uno de los tipos de plaza perfectamente definidos e individualizados.

Aun haciendo abstracción de las razones apuntadas, hoy día es evidente que la fabricación de manteca con utilización de los fermentos lácticos no puede tardar mucho para figurar como parte activa entre los métodos industriales, en unión especialmente con la manteca de crema dulce y ambas pasteurizadas. Varios factores lo motiavn directamente, y en especial el modo particular de recolección de las cremas en las grandes cremerías en nuestro país, a las cuales llegan siempre en un grado avanzado de fermentación, que, desgraciadamente no es sólo láctica, ni pululan en ellas los microorganismos deseables, por razones de medio ambiente, la más importante de las cuales es la temperatura.

Por eso en nuestro país, uno de los problemas mantequeros más principales consiste en la habilitación de vagones frigoríficos en todas las vías de transporte.

La implantación de una activa fermentación láctica en el perío-

do de recolección, suprimiría en su mayor parte todo otro desarrollo nocivo en las cremas a utilizarse.

### **OBJETOS DE LA FERMENTACION DE LAS CREMAS**

El objeto que se persigue en la fabricación de manteca con utilización de fermentos lácticos, puede ser resumido en las diversas modificaciones que la fermentación láctica de las cremas efectúa en éstas, dando como resultado diferencias apreciables en diversos caracteres de las mantecas elaboradas. Entre estas modificaciones son dignas de notarse, en primer lugar, la producción del buen sabor y aroma, la alteración del color, las modificaciones en el rendimiento y la conservabilidad, cosas que iremos pasando gradualmente en revista.

#### **Sabor y aroma:**

Cualquiera que sea la naturaleza de las modificaciones que se verifican con la fermentación láctica de las cremas se ha comprobado que la producción de un buen sabor y aroma sólo puede ser obtenido por una buena fermentación. De una manera general, los diversos autores están conformes en afirmar que la obtención de un buen sabor y aroma debe atribuirse a productos que derivan del desarrollo de microorganismos, y especialmente de los productores de ácidos. Es en este sentido que el desarrollo de especies apropiadas de fermentos lácticos en las cremas dulces, que establecen en ellas una buena fermentación, toma la mayor importancia, en la fabricación de mantecas de cremas ácidas.

Tiemann indica que la obtención del buen sabor y aroma en una manteca sólo puede ser conseguido por fermentación, basándose en el resultado negativo a ese respecto, de la acción de una pequeña cantidad de ácido clorhídrico sobre las cremas. Storch, además, sostiene que los fermentos lácticos son esenciales en lo que se refiere a una buena maduración de las cremas y cree que numerosas especies de ellos toman parte activa en el proceso de fermentación que da como resultado la obtención de un buen sabor y aroma. Asimismo Eckles asigna a los fermentos lácticos el rol principal en la obtención de las antedichas características.

Weigmann afirma que se obtienen los mejores resultados cuando son varias las especies de fermentos lácticos que trabajan juntas en la crema; y en fin Conn, cree que además de los fermentos lácticos que cumplen con la mayor acción cuantitativa, debe atribuirse también a los microorganismos proteolíticos que actúan sobre las materias albuminoideas, la producción de modificaciones deseables,

Refiriéndose a la causa específica del aroma, Pouriau dice: "El ácido láctico producido a expensas de la lactosa, pone en libertad pequeñas cantidades de ácidos grasos volátiles (ác. caproico y butírico) de aroma especial. Los productos de desasimilación de los bacterios, parecen igualmente jugar un rol (Henseval), como también los productos resultantes de la descomposición de la lactosa (Mazé)".

Martin opina asimismo que, "los ácidos grasos libres unidos a los productos de desasimilación de los microbios son los que dan a la manteca el aroma".

Estos principios volátiles resultantes de la fermentación láctica de las cremas, se fijarían sobre la materia grasa, constituyendo su mezcla el aroma especial de las mantecas, según afirma Pouriau.

A su vez Kayser opina que en la maduración de las cremas se trata probablemente de efectos simbióticos, entre los cuales pueden citarse, al lado de los fermentos lácticos, las levaduras de la lactosa, que forman un poco de alcohol, posible generador de éteres, y los fermentos de las materias albuminoideas.

En realidad el sabor de la manteca que proviene de crema en la cual se ha verificado una buena fermentación láctica, es radicalmente distinto del de una manteca de crema dulce.

Esta comparación es, sin embargo, en la práctica, bastante difícil, especialmente en nuestro país, en que las cremas llegan al tiempo de ser batidas con una cierta acidez más o menos avanzada y lo que es peor, con fermentaciones no del todo deseables, y entonces también las mantecas que corrientemente se designan como de crema dulce, tienen una cierta cantidad de acidez proveniente de fermentación.

Pero comparando como decíamos, manteca de crema fermentada ácida y manteca de crema dulce, puede notarse netamente la marcada diferencia existente en el sabor de ambas: en la primera, al lado del gusto especial de la manteca, se advierte en seguida otro que lo modifica radicalmente, y en conjunto se obtiene un sabor ácido agradable al paladar.

Los buenos gustadores de manteca aprecian diferencias entre estas mismas, lo cual nos hablaría de toda una gradación, que probablemente, abstracción hecha de las diferencias que también pueden provenir de cremas distintas, tendremos que referir a las propiedades especiales de cada fermento láctico (diferencias individuales), como por ejemplo, se nota sembrando cantidades de la misma crema

con distintos fermentos lácticos de un solo tipo (*Streptococcus lacticus*) y comparando las mantecas obtenidas.

Por otra parte, las mantecas de crema dulce tienen como se sabe, su sabor característico que admite a su vez diferenciaciones según la calidad de las cremas de que provienen.

Es necesario hacer resaltar la gran dificultad que se encuentra al hablar de la gustación de las mantecas, por el hecho de traducir en una cosa simple como un sabor definido, cuestiones muy complejas de modificaciones que pueden ser bastante diversas.

Dejando de parte estas consideraciones, nos referiremos al segundo punto de que hablábamos, es decir, a la modificación, casi diríamos a la "creación" del aroma en las mantecas de crema fermentada.

Como hemos anteriormente anotado, algunos consideran la formación de sustancias olorosas por la pequeña saponificación inicial de la materia grasa, llevada a cabo por el ácido láctico de fermentación (Dornie), o por el parcial desarrollo de microorganismos especiales lipolíticos (Weigmann) y proteolíticos (Conn).

Haciendo una enumeración de los organismos especiales a los cuales se atribuyen directamente los aromas característicos que dan a las mantecas, de Rossi cita, entre los pertenecientes al grupo del *Bac. coli*, a los siguientes:

*Bact. Connii* Migula (*Bac. N.º 41 Conn*), que da agradable olor y es de acidez débil.

*Bac. (Bact.) acidoaromaticus* van der Leek que se distingue del anterior por una mayor producción de ácido.

*Bac. aromaticus lactis* Grimm, también de olor agradable.

*Bac. aromaticus butyri* Severín, de débil acidificación y agradable olor a fruta.

*Bac. aromaticus* van der Leek, con olor aromático, coagulación ácido-enzimática y sucesiva digestión del coágulo.

*Pseudomonas fragi* Eicholz, con olor de frutilla y alcalinización del medio.

*Pseudom. fragariae II.* Gruber, también de olor aromático de frutilla.

Entre los referidos al grupo de *Pseudomona fluorescens*, cita:

*Pseudom. fragaroidea* Huss, con coagulación enzimática, y sucesiva peptonización, dando al principio olor de frutilla y luego de ananás.

*Pseudom. fragariae* I. Gruber, que en los medios comunes da olor de frutilla, y en leche olor característico de vaca (de establo), con reacción alcalina y peptonización.

Aún queda por citar *Bacillus esterificans* Maassen, fuera de esos grupos, con olor que recuerda al de ananás en los diferentes medios de cultivo y en la leche.

Con diferente modo de pensar, muchos sostienen en cambio, que el aroma de las mantecas, debe atribuirse a la actividad de los fermentos lácticos, preferentemente de alguna de sus especies capaces de producir pequeñas cantidades de ácidos grasos volátiles, alcoholes, éteres, etc.

Terminaremos citando que Hammer y Bailey en la "Agricultural experiment station" del colegio de Yowa, aislaron de la leche unos microorganismos, que agrupan por pequeñas diferencias en dos tipos A y B, proponiendo para el primero el nombre de *Streptococcus citrovorus* y para el segundo el de *Strept. paracitrovorus*, cuya detallada descripción puede encontrarse en la segunda de las publicaciones citadas pág. 91-95. (The volatile acid production of starters and of organisms isolated from them. Research Bulletin N.º 55, y Volatile acid production of *Streptoc. lacticus* and the organism associated with it in starters, Research Bulletin N.º 63).

Estos fermentos lácticos presentan la característica de tener una alta acidez volátil, comparada con la acidez volátil que pueden tener los mismos fermentos lácticos comunes (*Bact. lactis acidi* Leichmann = *Streptoc. lacticus* Krüse). La acidez total en cambio es mayor en estos últimos que en los organismos citados. Ahora lo que llama grandemente la atención y lo que constituye la importancia del caso, es que estos microorganismos, asociados a los comunes fermentos lácticos, aumentan notablemente (al doble) su propia acidez volátil, aumentando también un poco la acidez total de los fermentos lácticos comunes, como se desprende del cuadro adjunto que copiamos, entre otros, de la primera de las publicaciones citadas, pág. 244.

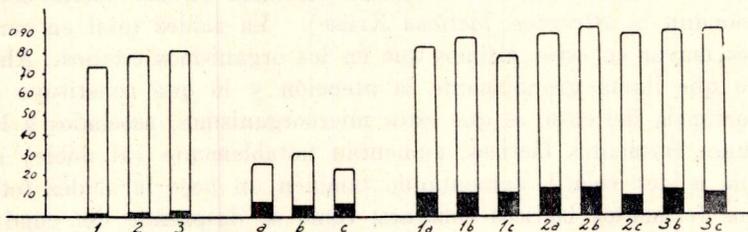
Tabla 27.—Producción de acidez volátil del *Bact. lactis acidi* solo, del *Organismo asociado* solo y de los dos en combinación, usando 3 aislamientos de *Bact. lactis acidi* y 3 del *Organismo asociado*.

Material usado para sembrar		Acidez total (1)	Ac. volátil (2)
Bact. lactis acidi	1	0,73	4,5
" " "	2	—	6,3
" " "	3	0,81	7,5
Organismo asociado	1	0,26	18,1
" "	2	0,31	15,9
" "	3	0,24	16,0
Bact. l. ac. 1 + Org. as.	1	0,83	32,2
" " " 1 + " "	2	0,87	33,1
" " " 1 + " "	3	0,78	29,5
" " " 2 + " "	1	0,88	37,5
" " " 2 + " "	2	0,92	39,2
" " " 2 + " "	3	0,89	28,7
" " " 3 + " "	2	0,90	35,0
" " " 3 + " "	3	0,90	33,2

(1) Expresada en porcentaje de ácido láctico.

(2) C.e. de NaOH N|10 utilizados para neutralizar el 1er. litro del destilado de 250 grs. de leche por arrastre con vapor de agua previa adición de aproximadamente 15 c.e. de  $H_2SO_4N|_1$ .

El gráfico N.º 4 está preparado sobre el cuadro anterior.



N.º 4.—Aumento de la acidez volátil en los cultivos de *Bact. lactis acidi* (= *Streptococcus lacticus*) por asociación con otros microorganismos.

Columna entera = acidez total.

Parte negra = acidez volátil.

Después de haber expuesto las diferentes interpretaciones que se dan a estas cuestiones sobre el aroma de las mantecas, y ya sea que uno u otro de estos factores tomen parte en su origen, o lo que es más probable, varios de ellos a la vez, lo cierto es que siempre interesa mantener una activa fermentación láctica en las cremas en maduración para ajustar a un límite la actividad de los microbios lipóli-

ticos y proteolíticos, cuyo excesivo desarrollo es siempre nocivo y especialmente advertible cuando se trata de conservar mantecas de aroma intenso, lo que se hace con resultado casi siempre negativo. (En el caso de Hammer y Bailey, acabado de citar, el total de la flora lo constituye siempre más de un 90 o|o de *Stroptoc, lacticus* y generalmente sólo menos de 10 oo| (en muchos casos 1-3 o|o) del organismo asociado).

#### Color:

El color natural de la manteca proviene según Palmer y Eckles ("The principal natural yellow pigment of milk fat", Univ. Mo. Agr. Exp. Sta. 1914), de la carotina y la xantófila, pigmentos contenidos en las plantas, que a raíz de su introducción en el organismo son eliminados en la leche.

Después del parto, se suele tener por un corto tiempo, materia grasa muy coloreada, pero esto debe derivar de las condiciones fisiológicas especiales de ese estado en que se establece una mejor secreción.

Dejando de lado lo que se observa en las mantecas en general, en las variaciones del color por las diferencias de estación y de raza e individuales de las vacas, cuando se comparan mantecas de crema fermentada ácida con mantecas de crema dulce, se nota en seguida una marcada diferencia en el color. Las mantecas de crema fermentada aparecen de un color amarillo de oro más subido que las comunes. Esto es debido quizás, a la mejor eliminación de la caseína que permiten estas mantecas durante el batido, por estar en ella al estado de finos copos coagulados, y cabe preguntar todavía si no habrá una modificación directa de la materia colorante por el mismo ácido.

En la escala de puntos (score), el color óptimo es clasificado con 15 puntos en Norte América, y el índice de referencia, varía como es natural, según las estaciones y las condiciones y exigencias del mercado.

*Rendimiento y eliminación de la caseína.*—El pequeño aumento en el rendimiento total que se nota en las mantecas de crema ácida sobre las de crema dulce, y a la vez la mejor eliminación de la caseína, es debido al hecho de que en las cremas acidificadas la viscosidad de la masa disminuye pasando a la vez la caseína en suspensión a un estado de precipitación que pone en mejores condiciones a los glóbulos grasos más pequeños para soldarse entre sí en la operación del batido, y que de otra manera se hubieran eliminado como pérdida en el suero y en el lavado.

La caseína que se encuentra en ese estado especial de coagu-

lación por efecto de la acidez existente, es eliminada así de manera más perfecta. A este respecto no poseemos datos demostrativos, y hemos concebido para justificar las anteriores afirmaciones e identificarnos con ellas, una serie de experiencias, sobre el rendimiento comparado de una y otra clase de manteca, y el contenido de nitrógeno total, que trataremos de llevar a cabo en la primera ocasión.

### **Conservabilidad:**

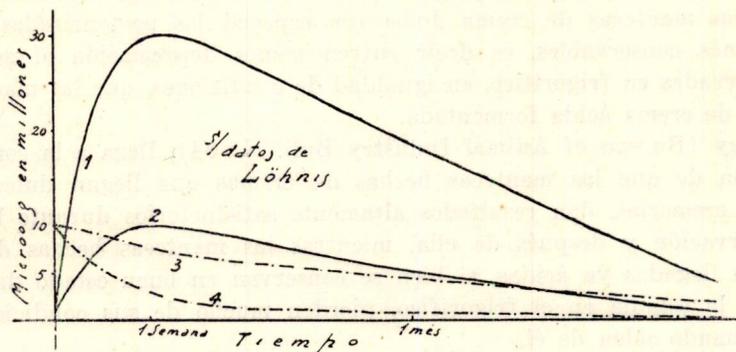
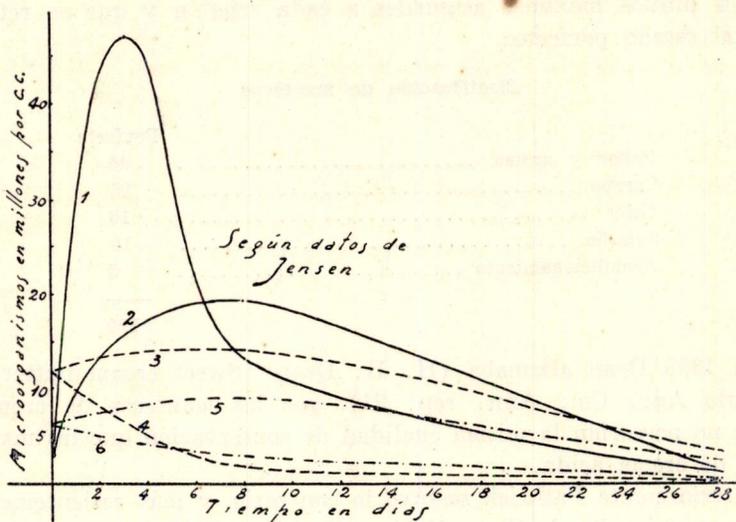
Los autores franceses e italianos, especialmente los primeros, afirman que las mantecas de crema fermentada ácida presentan sobre sus similares de crema dulce, las ventajas de una más larga duración. Este hecho queda por ellos íntimamente relacionado y explicado por la presencia en las primeras del fermento láctico común, el cual toma el predominio casi absoluto durante la maduración sobre las demás clases de microorganismos que pudieran existir en las cremas. Además el ácido láctico producido inhibe a las demás especies de todo desarrollo aun después de la fabricación y durante el período de almacenaje.

Si bien es cierto, como lo comprueba el gráfico N.º 5, preparado sobre datos numéricos de Löhns y de Jensen, que el número de microorganismos en las mantecas en conservación aumenta muy poco en algunos casos, y en general decrece paulatinamente en las mantecas de crema fermentada ácida, mientras que se eleva enormemente durante los primeros días en las de crema dulce y en especial en la parte externa, también es necesario notar por otra parte, que la explicación de las variaciones en la conservabilidad de las mantecas, se ha venido afirmando en estos últimos tiempos no ya sobre la presencia de un elevado número de microorganismos que presuponen una acción destructora, sino precisamente sobre la acción de la acidez presente en las mantecas al comienzo de su almacenaje.

De los datos concretos recogidos en los diversos autores, se desprende especialmente de los norteamericanos, que en realidad si las mantecas de crema fermentada ácida presentan algunas ventajas positivas que hacen que se recomiende su fabricación, ello sólo es propiamente cuando se trata de mantecas de consumo más bien rápido y no de un largo período de conservación.

Una experiencia efectuada en el sentido de poder orientarse en esta difícil cuestión, nos hubiera resultado de la más grande importancia, pero nos hemos visto completamente imposibilitados de efectuarla debido especialmente a la falta de apreciación sobre la cali-

dad de las mantecas, apreciación que por otra parte sólo es posible valiéndose del empleo de una escala de puntos y eso después de una larga práctica. En nuestro país, recién comienzan a bal-



N.º 5.—Número de microorganismos en mantecas en conservación  
 Según Jensen: 1,2, = Manteca dulce (1, parte exterior; 2 interior).  
 3,4 = Manteca de crema acidificada espontáneamente (3, exterior; 4, interior).  
 5,6 = De crema acidificada con fermentos lácticos (5, exterior; 6, interior).  
 Según Löhnis: 1,2 = Manteca dulce (exterior, interior).  
 3,4 = Manteca fermentada (exterior, interior).

bucearse las primersa palabras en este sentido, y nos hemos enterado con satisfacción de que el Ministerio de Agricultura en su nueva Inspección que está por organizarse sobre productos de lechería, tiende a adoptar alguna de las escalas de puntos como "Sco-

re" de referencia, y que probablemente será la usada en el comercio de Norte América, por ser de las más sencillas y exactas.

Como simple presentación, la intercalamos, con la especificación de los puntos máximos asignados a cada renglón y que se refieren al estado perfecto:

**Clasificación de mantecas**

	Perfecto
Sabor y aroma .....	45
Cuerpo .....	25
Color .....	15
Salazón .....	10
Acondicionamiento .....	5
	100

En 1895 Dean afirmaba (H. H. Dean "Sweet cream butter", Ontario Agr. Col. Ann. rep. 21), que las mantecas de crema dulce no poseerían la misma cualidad de conservación que las mantecas de crema ácida.

Anteriormente Pathrick sostuvo lo contrario, y más recientemente las experiencias de Gray, McKay, Guthrie y Rogers, demuestran que las mantecas de crema dulce (en especial las pasteurizadas), son más conservables, es decir sufren menos depreciación al ser conservadas en frigorífico, en igualdad de condiciones, que las mantecas de crema ácida fermentada.

Gray (Bureau of Animal Industry Bull. N.º 84), llega a la conclusión de que las mantecas hechas de cremas que llegan dulces a las cremerías, dan resultados altamente satisfactorios durante la conservación y después de ella, mientras las mantecas hechas de crema llegadas ya ácidas, si bien se conservan en buen estado durante la estadía en el frigorífico, pierden mucho de sus condiciones cuando salen de él.

Rogers y Gray (B. of A. I. Bull 114, 1909), afirman que la intensidad de las modificaciones que sufren las mantecas, aun cuando son conservadas a muy bajas temperaturas, es mayor cuanto más elevada es la acidez de la crema de donde provienen.

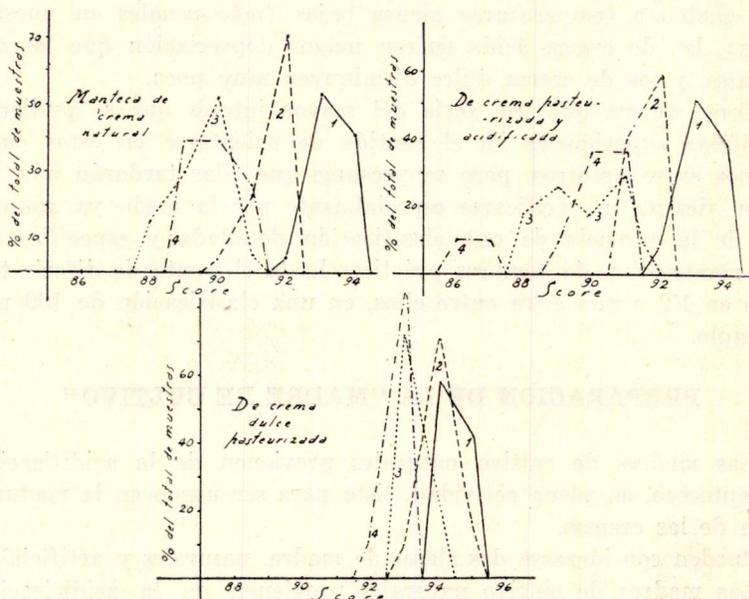
En fin, llegan a la conclusión de que dichas modificaciones, que afectan a su depreciación, son debido, no a la presencia de microorganismos ni de enzimas en la manteca, sino a la cantidad de ácido láctico proveniente de fermentación, "el cual actuaría químicamente sobre algunas substancias lábiles de la manteca".

Terminaremos exponiendo la opinión de Dyer (Progressive oxidation of cold-storage butter, Journal of Agr. VI-24. Dept. of

Agr. Wáshington, Sept. 1916), que parece coincidir con la anterior, y que afirma que el desarrollo del sabor y aroma no deseable en las mantecas conservadas en frigorífico, causa principal de su depreciación, aún a temperaturas de 0°F. (—18° C), no depende de una oxidación de la materia grasa, sino que debe referirse a un cambio químico verificado por lenta oxidación en las sustancias “no grasas”.

Esta modificación química, es, además, directamente proporcional a la cantidad de ácido de la crema originaria.

A continuación adjuntamos el gráfico N.º 6, tomado de los trabajos de Rogers, Thompson y Keithley (B. of A. I. Bull. 148),



N.º 6.—Depreciación de mantecas en conservación.  
(Según Rogers, Thompson y Keithley).

1. Manteca fresca.
2. Conservada a 0°F.
3. " " 10 .
4. " " 20 .

que se refiere a la disminución del “score” de las mantecas de crema natural, de crema pasteurizada y acidificada y de crema dulce pasteurizada.

De su estudio se deduce que las mantecas de crema natural y

de crema pasteurizada y acidificada, cuando frescas obtienen más o menos el mismo número de puntos (entre 92 y 94), distribuidos en porcentajes semejantes, salvo pequeñas diferencias, que constan en el gráfico. En cambio las mantecas de crema dulce pasteurizada también cuando frescas, resultan de un "score" mayor comprendido entre 94 y 95 puntos. Después de su conservación en frigorífico, puede observarse que cuanto más baja es la temperatura, menos es la disminución del "score" sufrido por cualquiera de las tres clases de manteca. Además, que a temperaturas muy bajas casi se conservan de igual manera las mantecas de crema ácida que las de crema natural (según se interprete en el cuadro), manteniéndose siempre más altas las de crema dulce pasteurizada, pero en cambio a temperaturas menos bajas (más usuales en nuestro país), las de crema ácida sufren mayor depreciación que las naturales, y las de crema dulce disminuyen muy poco.

Comó quiera que sea, sería del mayor interés que se pudieran verificar experiencias en el sentido de orientarse en estas cuestiones entre nosotros, pero se presume que ellas tardarán aún un buen tiempo en verificarse especialmente por la razón ya apuntada de la carencia de una clasificación detallada y específica de las mantecas, y de hombres prácticos hasta el punto de diferir tan solo en 1|2 o una cifra entre ellos, en una clasificación de 100 por ejemplo.

### PREPARACION DE LA "MADRE DE CULTIVO"

Las madres de cultivo naturales provienen de la acidificación Streptococo, en plena actividad, listo para ser usado en la maduración de las cremas.

Pueden considerarse dos clases de madre, naturales y artificiales.

Las madres de cultivo naturales provienen de la acidificación espontánea y natural, en buenas condiciones, de la leche o varios de sus productos como leche descremada, suero de leche o crema.

Con estas clases de madres los resultados obtenidos no pueden ser siempre seguros, pero, sin embargo, son bastante buenos si se siguen perfectamente ciertas normas generales que aseguran una buena fermentación láctica.

Las madres de cultivo artificiales, como que constituyen cultivos puros de fermentos lácticos (a los cuales puede unírseles o no los bacterios llamados "del aroma"), son las únicas capaces de asegurar un resultado constante y un producto definido. Es de esta clase de madres que la nueva industria lechera espera sus

éxitos y en su larga vida de empleo siempre han respondido de manera satisfactoria. Aquí es el momento de hacer notar que muchos industriales se quejan del uso de "fermentos" en sus productos de elaboración, pero ello es debido generalmente, primero a que no poseemos una "clasificación comercial" de fermentos lácticos que separe los pocos tipos que existen en el comercio (por ejemplo entre los del tipo Streptococo y los proteolíticos que se usarían para la fabricación de quesos), y en segundo lugar, al desconocimiento de las características de la fermentación. Nos ha sido relatado que el gerente de una importante cremería de nuestra plaza, tenía la convicción de que el uso de los "fermentos" (f. lácticos comunes del tipo Streptococo), resultaban nocivos para la manteca, debido a que en la "fermentación" "el desprendimiento de gases ponía muy "fofa" la manteca", presuponiendo seguramente en todas las fermentaciones el desprendimiento gaseoso intenso de la fermentación alcohólica (!).

### I). — Madre de cultivo natural

Una madre de cultivo natural puede ser preparada según las instrucciones de White (Farmers' Bull. N.º 876, Dept. of Ag. U. S.), de la siguiente manera:

1.º Se limpian cuidadosamente y se hacen hervir por 5 minutos, tres recipientes apropiados, con sus respectivas tapas. Después de hervir se tapan para evitar la entrada de microorganismos.

2.º Se toma una muestra de leche de tres vacas, colocándola en seguida cada una en cada uno de los recipientes, se tapa y se enfría a 24º C., guardándose a esa temperatura hasta que sobrevenga la coagulación.

3.º Al cabo de 24 horas habrán coagulado, y entonces se observan los coágulos. El coágulo ideal debe ser firme, de aspecto mármoleo, libre de agujeros o burbujas de gas, y debe tener apenas ó ninguna separación de suero. Su sabor es francamente ácido.

4.º Elijase la muestra mejor y deséchense las otras. Esa madre inicial se propaga de la siguiente manera, hasta que presenta un buen aspecto:

a) Límpiase bien y hiérvase un recipiente con su tapa y una cuchara (o cucharón, según la capacidad del recipiente).

b) Llénese con leche muy fresca, cúbrase apenas, caliéntese gradualmente hasta hervir y hiérvase unos 30 minutos.

c) Enfríese a 24º C. y agréguese una cucharada de la leche coagulada inicial y déjese hasta la coagulación.

d) Propáguese la madre de cultivo en la misma manera todos

los días como se describe en a, b, c, hasta que no presente más las buenas características de coagulación.

La parte c es la que debe usarse para madurar la crema y se agregará a ella en la proporción de 1|10 a 1|5 (10 a 20 o|o).

## II). — Madre de cultivo artificial

Una madre de cultivo artificial tiene por origen un aislamiento directo de fermentos lácticos, de la leche. Puede ser preparada con las debidas precauciones microbiológicas, partiendo de una muestra de leche o de crema, de buenas características o con las cuales se han obtenido muy buenas mantecas, pero en general se usan los vendidos en el comercio en forma líquida o en polvo.

Si se trata de un aislamiento directo de la leche (ver capítulo sobre aislamientos de Fermentos lácticos en la 1.<sup>a</sup> parte), debe notarse que las diluciones en agua esterilizada a partir de la leche coagulada deben ser muy fuertes, teniendo en cuenta la enorme cantidad de microorganismos existentes. Una dilución de 100.000 veces será quizás necesaria. Conociendo el tiempo transcurrido y la temperatura a la cual permanece la leche, puede formarse un juicio aproximado de la dilución conveniente.

Según Conn, si la leche es de 12 horas y ha sido mantenida a una temperatura más o menos fresca, una dilución de 100-1000 es suficiente.

Cuanto mayor es el tiempo transcurrido o cuanto más alta es la temperatura, las diluciones irán aumentando gradualmente. En general, para temperaturas medias y con leches de 12-24 horas, se ensayarán diluciones de 10.000-100.000. Para efectuar una dilución cómodamente pueden utilizarse tubos de agua esterilizada con un contenido de 9 c.c., y sembrando y pasando sucesivamente 1 c.c. Con 1 c.c. del último tubo, se tendrá una dilución de la unidad seguida de tantos ceros como tubos de agua esterilizada se hayan utilizado.

Puede simplificarse el método, aunque con menor aproximación, teniendo en cuenta que 1 c.c. equivale más o menos en una pipeta de punta mediana, a 20 gotas. Dos gotas equivalen a 1|10 de c.c. y entonces si se parte solamente de la muestra con 1 c.c. transportando en lo sucesivo 2 gotas del primer tubo de agua esterilizada (de unos 10 c.c.), se saca con las dos gotas una dilución de 1|100, del segundo 1|10.000, etc.

Es conveniente, como de costumbre, hacer tres cajas de Petri y después de identificarse cada una de las colonias aisladas, se pasan

a tubos de leche esterilizada, donde pueden trasplantarse indefinidamente pero a cortos intervalos.

Partiendo de un tubo de leche coagulada donde se conservan los fermentos, se llega a la obtención de las madres, sembrando el contenido del tubo que se encuentra al estado de un coágulo homogéneo, (después de haberlo más o menos demenzado por medio de una punta de pipeta de vidrio esterilizada), en una cantidad regular de leche desnatada esterilizada. Nosotros hemos usado matraces de vidrio y tarros pequeños perfectamente estañados, con buen cierre de la tapa, y con una abertura en forma de tubo lateral en la parte superior hecha exprofeso y que se tapa con algodón. El contenido era de unos dos litros más o menos, según los casos. Para acelerar el desarrollo y disminuir el tiempo de preparación de la madre, puede colocarse el recipiente sembrado en la estufa a unos 30° C.

Al cabo de un tiempo que varía con la clase de fermentos, con la temperatura y con la cantidad sembrada, sobreviene la coagulación, después de la cual, se agita bien y con cuidado el coágulo y está listo para ser empleado. Con aconseja el empleo de la madre perfectamente acidificada, pero antes de la coagulación, por dos razones: 1.°, porque se distribuye en la crema a sembrar, mucho más uniformemente y con facilidad, y 2.°, porque parece que los fermentos se encuentran en el mejor estado de actividad justamente poco antes de sobrevenir la coagulación. Pero para llegar a esto es necesario estudiar con cantidades determinadas de leche, y a una temperatura dada, el tiempo de coagulación y usar la madre antes de haber transcurrido enteramente. Así y todo suele variar de algo por la no uniformidad en la composición de todas las leches.

Los balones de vidrio, aunque de más difícil manejo, suelen ser mejores por su facilidad de limpieza y por poderse ver su contenido.

Para la conservación indefinida de la madre, puede usarse uno de los tres métodos siguientes:

1.° Preparar todos los días una madre de cultivo partiendo de los tubos de leche.

2.° Sembrar cada vez una pequeña cantidad de la madre que se va a utilizar, en otro recipiente análogo con leche desnatada esterilizada.

3.° Dejar una pequeña cantidad de la madre utilizada y luego llenar el recipiente con nueva leche desnatada pasteurizada o esterilizada.

Es evidente que el segundo método es el más práctico y da buenos resultados.

Para madurar grandes cantidades de crema, se harán mayores cantidades de madre, sembrando por ejemplo, los contenidos de los tarros pequeños a su vez en tarros grandes de leche desnatada esterilizada.

La pureza microbiológica en estos casos sufre algunas fallas por el hecho de las causas de contaminación, pero así y todo los resultados son inmejorables por la cantidad sembrada y la exigua contaminación, siempre que se proceda con cuidado y con utensilios esterilizados. El ideal sería en las grandes mantequerías que utilizaran fermentos lácticos, el de poseer un aparato continuo de preparación de madre, como los utilizados en vinificación y cerveza para la preparación del pie de cuba.

Partiendo de los fermentos del comercio, de los cuales se usan generalmente los que vienen en forma de polvo, es necesario ponerlos antes en actividad, y luego sembrar en la crema la leche coagulada o mejor aún, la de un segundo pasaje.

En todos los frascos vienen instrucciones precisas para la manera de utilizarlos, pero aquí daremos un resumen de las instrucciones anotadas por Guthrie para la propagación de las madres de cultivo.

1.° Generalmente es necesario usar un nuevo frasquito cada tres o cuatro semanas, dependiendo esto mucho del cuidado del operador: en algunos casos, muy buenos mantequeros utilizan sólo uno por año (!).

2.° Empléense recipientes apropiados y perfectamente limpios. Si son de vidrio, es conveniente trabajar con duplicados por los peligros de rotura.

3.° Usese leche desnatada, fresca, limpia y de buen sabor.

4.° Lléñense los recipientes hasta la mitad o los dos tercios, para prevenir las contaminaciones por la tapa.

5.° Protéjense los contenidos con buenos cierres de las tapas.

6.° Pasteurícese calentando de 85 a 95° C. por media hora o más. ( Las autoclaves esterilizadoras a vapor, muy comunes en nuestras cremerías, son muy apropiadas para esta operación, o bien puede llevarse a cabo en baño-maría). Luego enfríese hasta la temperatura de maduración alrededor de 20° C.

7.° Después de la pasteurización la leche está lista para ser inoculada. Inocúlese en un lugar de calma, para evitar contaminaciones por el polvo.

Suele usarse o bien todo el frasco de cultivo comercial, o 1 a 10

por ciento de la madre del día anterior, según se trate de la primera vez o de las subsiguientes.

En seguida agítese cuidadosamente para distribuir bien. La cantidad a sembrar para el día siguiente debe medirse en utensilios esterilizados.

8.° La temperatura de maduración del primer cultivo oscilará alrededor de 25° C., pudiendo llegar hasta 30° C., con el objeto de favorecer el desarrollo y poner en actividad los fermentos. En los siguientes pasajes, la temperatura de maduración oscila alrededor de 20° C., pudiendo llegar como máximo a 24° C. y como mínimo a 16° C. Las temperaturas a conservar varían con la cantidad inoculada. Por medio de experiencias, en la práctica, puede llegarse a determinar la cantidad que debe inocularse y la temperatura requerida para cumplirse la maduración en un tiempo determinado. Generalmente una madre de cultivo madura en 12 horas a unos 18° C. con 1 a 8 o/o de inoculación.

9.° La madre se dice que está madura cuando coagula. El coágulo debe ser blando, nunca duro y firme.

En los coágulos blandos de apariencia de flan, la acidez suele ser aproximadamente de 0,70 o/o, calculada en ácido láctico, mientras que en los firmes y compactos, puede sobrepasar 0,95 o/o. Generalmente no excede de 0,90 o/o y una mayor acidez, trae aparejado el peligro de la sobre-maduración en que la vitalidad de los mismos fermentos queda comprometida, pudiendo obtenerse malos olores por el desarrollo de otros microorganismos.

10.° Cuando la madre está lista, debe usarse en seguida o bien se guarda enfriándola a 10° C. o menos hasta el momento de usarse. Si el contenido es poco, no se agitará antes de ponerlo a enfriar, pero cuando es grande puede hacerse para no permitir que se ponga firme el coágulo.

11.° Un buen coágulo debe presentarse uniforme y de consistencia blanda, sin burbujas de gas en su interior. La presencia de burbujas indica que existen fermentos no deseables, especialmente del tipo del *Bact. aërogenes*.

Un coágulo firme, con separación de suero y con alta acidez, indica una sobre-maduración, lo cual debe evitarse. Después de haberlo observado, se agita para desmenuzarlo y hasta uniformar la masa, dándole un movimiento continuo y alternado de rotación, pero teniendo cuidado de no hacer tocar la tapa o los bordes superiores del recipiente, por el peligro de contaminación. En seguida se juzga por sus caracteres organolépticos, olor y sabor especialmente.

Para esto se saca con cuidado una pequeña porción y se tapa en seguida, porción que es considerada luego por su olor y por su gusto. Debido a las diferencias de apreciación que podrían tener lugar, la gustación se hará siempre con el coágulo a la misma temperatura, de igual desmenuzamiento y en bocados también iguales todos los días.

Una buena madre debe ser libre de malos olores y el sabor aparecerá medianamente ácido y apenas dulce.

12°. Generalmente las madres de cultivo se preparan todos los días sembrándose del día anterior.

En las grandes cremerías, donde se necesitan cantidades considerables de madre, se lleva paralelamente a las primeras unas segundas madres que son las que se inoculan directamente a la crema.

En definitiva, puede llevarse una primera madre (con duplicado o triplicado), en recipientes no muy grandes que pueden ser de vidrio y luego cada día se transplanta una pequeña cantidad en la proporción deseada a otro recipiente análogo que será la madre del día siguiente, y la mayor parte se siembra en un recipiente mayor en las proporciones calculadas, que es la segunda madre y es la que se utiliza directamente en las cremas a madurar.

13°. Se partirá de un nuevo franquito de cultivo comercial (de marca acreditada), toda vez que no se encuentran todos los buenos caracteres apuntados o cuando aparezca algo que es necesario evitar, como burbujas de gas, mal olor, etc.

Por último es útil recomendar que se encargue de este trabajo a personas cuidadosas, inteligentes y que conozcan suficientemente el asunto.

## PASTEURIZACION

La crema puede hacerse madurar ya sea naturalmente o ya por la adición de una madre de cultivo, que, como sabemos, puede ser a su vez natural o artificial.

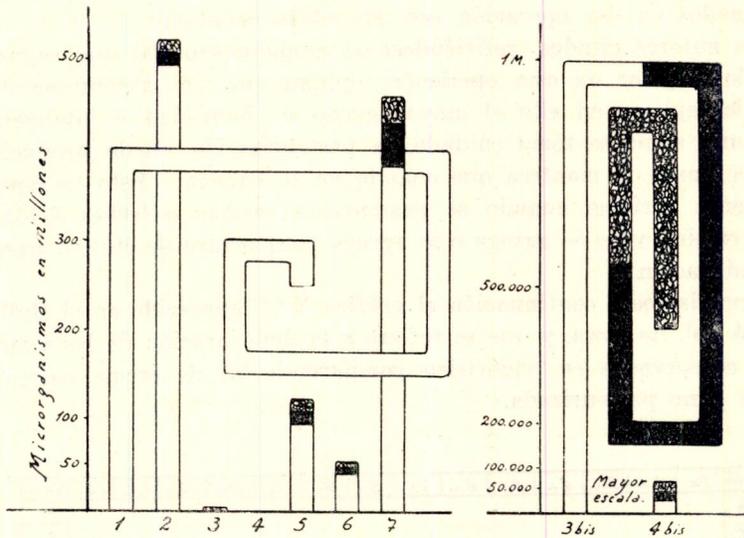
La maduración natural de la crema, lo mismo que la siembra de ella con una madre de cultivo natural, expone el producto a diferencias inesperadas y por lo tanto se contraviene uno de los más importantes principios del fabricante que es el de *ofrecer siempre productos similares y uniformes*.

En la maduración de la crema con utilización de una madre de cultivo artificial, pueden considerarse dos casos:

1.° Que la crema sea natural, y 2.° que ella sufra la previa pasteurización.

Resulta innecesario argumentar a favor de la pasteurización desde el punto de vista sanitario. A este respecto basta solo recordar que es ya corriente en casi todos los países, la pasteurización de la leche para el abastecimiento de las grandes ciudades.

Algunas objeciones que se han hecho al uso de la pasteurización de las cremas referentes a la posible destrucción de los organismos productores del aroma, pueden ser fácilmente destruídas, desde que se conoce que no todos los microorganismos mueren en esa operación (ver gráfico N.º 7, columnas 2, 3 y 4) y, además, debe tenerse en cuenta la posible contaminación posterior, y sobre todo que



N.º 7.—Número de microorganismos en diferentes productos de lechería.  
(Confeccionado con datos de Brown y Piser)

- |                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|
| 1. Madre de cultivo.  | 5. Manteca no lavada. |
| 2. Crema madurada.    | 6. „ lavada.          |
| 3. „ apenas separada. | 7. Suero del batido.  |
| 4. „ pasteurizada.    |                       |

Parte blanca = Fermentos lácticos.  
 „ negra = Gasógenos y peptonizantes.  
 „ rayada = Otros tipos de microorganismos.

ellos pueden incorporarse bajo forma de algunas razas de fermentos lácticos especiales, o con mezclas apropiadas que ya se han venido usando en otros países.

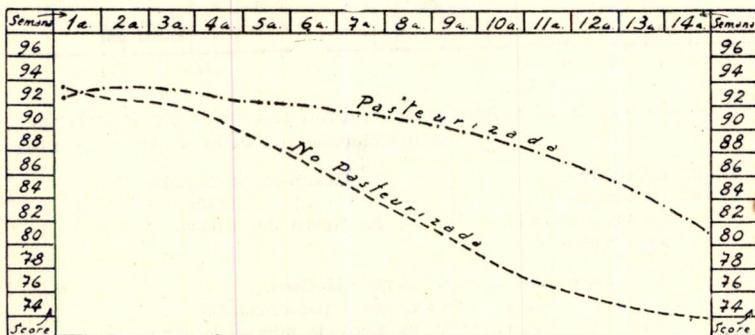
En otro orden de ideas, según Mc.Kay y Larsen, las cremas pas-

teurizadas dan mantecas más conservables que las no pasteurizadas, ya sean naturales o fermentadas, las cuales sólo dan mantecas de una conservabilidad relativa y la explicación de su menor conservabilidad consiste en la presencia de la gran cantidad de microorganismos y productos derivados en las naturales, y de la relativa cantidad de ácido láctico en las fermentadas.

En la fabricación de manteca de crema fermentada ácida, la pasteurización tiene una gran importancia, pues si bien el cultivo de fermentos lácteos puros puede sembrarse directamente a la crema sin previa pasteurización, lo cual simplificaría las manipulaciones, no podría impedirse, al menos al principio, en cierto grado, la existencia de una cantidad de otros microorganismos, que son eliminados en esa operación con probables beneficios.

Los autores citados, refiriéndose al cuidado especial que es necesario emplear en esta operación, opinan que "es absolutamente esencial aplicar en ello el mayor grado de habilidad e inteligencia, pues si no se toma cuidado, la pasteurización puede producir peores clases de manteca que cuando no se emplea. Esto es especialmente verídico cuando se pasteurizan cremas o leches ácidas o anormales, y no se agrega o se agrega poca madre de cultivo para la maduración".

Intercalamos a continuación el gráfico N.º 8 aparecido en el Bull. 71 del Col. de Iowa, y que se refiere a la deterioración de las mantecas conservadas en frigorífico, comparando las de crema pasteurizada y no pasteurizada.



N.º 8.—Efecto de la pasteurización sobre la conservación de las mantecas.  
De Bull 71. Iowa).

En las abscisas, tiempo en semanas.  
„ „ ordenadas, puntos del score.

En cuanto a la temperatura de pasteurización de las cremas, varían como con las leches, según se emplee el método continuo o el intermitente o prolongado.

Rogers, Berg y Davis, en un estudio verificado al efecto ("The temperature of pasteurization for butter making", Bur, of A. In. Circular 189), expresan que la temperatura para la pasteurización continua de la crema en la fabricación de manteca, está determinada por: 1.º la temperatura a la cual la mayor parte de los microorganismos son destruídos, 2.º la temperatura a la cual las diastasas de la leche resultan inactivas y 3.º la relativa propiedad de conservación de la manteca hecha con crema pasteurizada a diferentes temperaturas.

Basándose en que la destrucción uniforme de los gérmenes al estado vegetativo no es segura a temperaturas inferiores a 74° C.; que entre las diastasas, la peroxidasa es destruída a 77° C., la catalasa y la lipasa a 70° C. y la galactasa aunque no destruída aún a 93° C., resulta muy perjudicada ya entre 71° y 77° C.; además, examinadas las mantecas después de su conservación en frigorífico, se observa que las hechas con cremas pasteurizadas a menos de 66° C., se deterioran en mayor o menor grado, no así aquellas que provienen de cremas pasteurizadas a más altas temperaturas (71° C. en adelante hasta 82° C.), en que el sabor de las mantecas es influenciado por el calentamiento; aconsejan como conclusión, las temperaturas comprendidas entre 74 y 80° C. para la pasteurización continua de las cremas dulces para fabricación de manteca.

Con el método intermitente, discontinuo o prolongado, se aconseja en cambio la temperatura de 63° C. mantenida por una 1½ hora en agitación, y parece que en estos últimos tiempos este método va recuperando nuevamente la confianza en las grandes cremerías, debida a las seguridades que presenta.

Algunos aconsejan en fin, la pasteurización por 10 minutos a 70-71° C. como la más conveniente.

Para la fabricación de manteca con crema fermentada, la pasteurización que nos parece más conveniente y a la vez más práctica, es la discontinua o prolongada, que puede perfectamente llevarse a cabo en los "tanques de pasteurización y de maduración" que comienzan ya a estar en uso y algunos de cuyos ejemplares hemos podido observar en la última exposición internacional de lechería verificada en la Sociedad Rural en Palermo, en 1921. Al tratar de la maduración, daremos algunos detalles sobre los mismos.

Es obvio recordar en fin, que para impedir el desarrollo ulterior

de algunos microorganismos sobrevivientes o que provienen de infección, sigue a la pasteurización el inmediato enfriamiento de las cremas que quedan así listas para la inoculación con las madres de cultivo.

### MADURACION DE LA CREMA

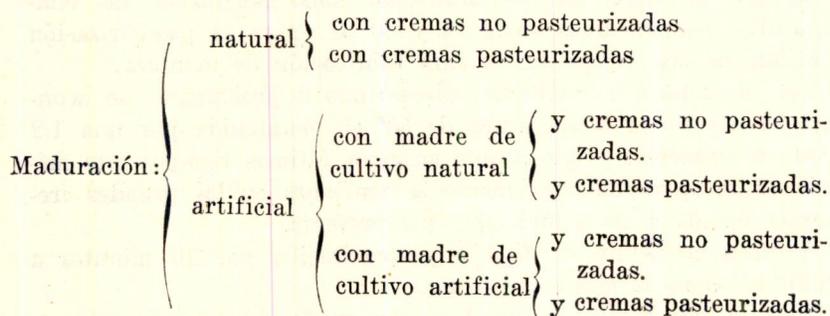
El proceso de transformación que sufre la crema durante la fermentación láctica, toma el nombre de maduración.

Ya hemos dicho que ésta puede ser natural, en el caso de abandonar la crema a sí misma en buenas condiciones de temperatura, aireación, etc., o bien puede provocarse por la adición de una madre de cultivo que a su vez puede ser natural o artificial.

Las cremas en ambos casos pueden ser pasteurizadas o no.

Es evidente por otra parte y no insistiremos más en ello, de que la mejor implantación de una buena fermentación láctica, sólo se consigue por la siembra de un cultivo puro de fermentos lácticos en pleno desarrollo, y previa destrucción además, de la mayor parte de los microorganismos existentes en la crema, por medio de la pasteurización.

A continuación damos un pequeño cuadro sinóptico agrupando los diferentes métodos de maduración de las cremas:



En la aplicación de cada uno de estos métodos, se entiende partir de cremas más o menos dulces, de baja acidez, y a este respecto, lo mismo que desde otros puntos de vista ventajosos en las cremas, resulta utilísima la implantación de una esmerada clasificación de cremas basándose en sus caracteres organolépticos y en la acidez.

Durante el proceso de maduración, se verifican en la crema ciertas transformaciones o cambios de naturaleza física, química y biológica.

Los cambios físicos son debidos en su mayoría a la aparición de productos derivados de la actividad de los fermentos lácticos.

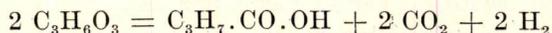
Así, por ejemplo, el ácido láctico producido, coagula la caseína, lo cual modifica esencialmente en esta forma las propiedades físicas de consistencia, viscosidad, etc.

Las transformaciones químicas que el acto de la fermentación aporta a los constituyentes de la crema, se efectúan especialmente sobre la lactosa o azúcar de leche, y las sustancias albuminoides que la crema contiene.

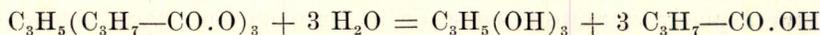
Hemos visto al tratar de los fermentos lácticos, que su característica esencial, es la formación de ácido láctico partiendo de un azúcar (en este caso la lactosa), pero además hay formación en algunos casos, de productos secundarios, y es precisamente basados en la proporción cuantitativa de estos productos, que se han distinguido los fermentos lácticos en verdaderos y facultativos.

La cantidad de ácido láctico en formación varía según se consideren los diferentes períodos de la fermentación. Mc.Kay y Larsen indican, por ejemplo, en una de sus experiencias, que el 0,1 o/o de azúcar, produce 0,051 o/o de ácido en el período inicial de la fermentación, obteniéndose sólo el 0,016 o/o en el último período.

El ácido butírico producido también especialmente en las fermentaciones avanzadas, es considerado por algunos, como Freudenreich, derivante de la descomposición de la caseína y del azúcar de leche, mientras otros interpretan su formación por la cantidad excesiva de ácido láctico, el cual se descompondría según la fórmula adjunta en ácido butírico, anhídrido carbónico e hidrógeno:



También, y más probablemente puede considerarse su formación, por la descomposición de la grasa existente en forma de butirina, la cual se hidrataría en sus elementos constitutivos, glicerina y ácido butírico:



Las sustancias albuminoides son desmembradas según Russell por efecto de la acción de sus fermentos especiales, en albumosas, leucina, tirosina, peptona y amoníaco, pudiendo haber también formación de otros productos como anhídrido carbónico, metano, nitrógeno elemental y ác. butírico.

El ataque de la caseína para obtener productos solubles, no parece ser debido a los fermentos lácticos comunes del tipo Strepto-

coco que sólo la coagulan indirectamente por acción del ácido láctico formado, sino a ciertos grupos especiales de ellos como por ejemplo al de los ácido-proteolíticos estudiados por Gorini y algunos del tipo bulgárico, cuya diastasa secretada, es del tipo de la tripsina, que hace pasar a los albuminoides al término proteosas y peptonas y luego a amino-ácidos.

Los cambios de naturaleza biológica que se verifican en la crema en el período de maduración, dependen especialmente de las condiciones de medio ambiente a que se deja expuesta, y luego de la clase de microorganismos existentes. Las condiciones especiales y la presencia de una u otra clase de gérmenes, favorecen el desarrollo en gran proporción de alguna de las especies existentes. La transformación biológica más notoria, si se colocan los fermentos lácticos del tipo *Streptococo* en buenas condiciones de fermentación, es el predominio casi absoluto que toman en seguida sobre las demás especies, hasta el punto de llegar a formar casi cultivos puros. Esta observación presenta gran interés desde el punto de vista práctico, por el hecho que resulta beneficioso hacer predominar desde un principio los fermentos lácticos del tipo deseado. Sin embargo, es frecuente el caso de una convivencia de varias especies de microorganismos, los cuales se desarrollan en una cierta proporción entre sí, proporción que se origina por muchos factores y de la cual depende el resultado de la fermentación y quizás la intensidad de los cambios biológicos. En la 1.<sup>a</sup> Parte, hemos dado un gráfico de los trabajos de Marshall, en el cual figura el enorme aumento en la actividad vegetativa experimentada por *Streptoc. lácticus* en presencia de *Bac. subtilis*. (Ver 1.<sup>a</sup> Parte, pág. 203).

Es menester hacer resaltar en fin, que la naturaleza de las transformaciones tanto químicas como físicas, están bajo la inmediata dependencia de los cambios biológicos.

Relativo a la cantidad de madre de cultivo que debe agregarse a las cremas para llevarse a cabo en ellas una buena maduración, varía especialmente según las condiciones de temperatura a que debe estar expuesta durante el curso de la fermentación. Para obtener la maduración en un número determinado de horas, a mayor temperatura corresponde una menor cantidad de madre de cultivo a agregarse, y se comprende fácilmente que los tres factores: tiempo, temperatura y cantidad de madre, están íntimamente relacionados entre ellos y dependen uno de otro. Dos de ellos determinan, pues, el tercero, dentro de ciertos límites.

Hay además una cantidad de otros factores que nos indican la conveniencia de usar tal o cual cantidad de inoculación, a saber entre

ellos: el porcentaje de materia grasa en la crema, la capacidad del tanque de maduración o de la batidora, la cantidad de leche o leche descremada de buena calidad que se dispone para la propagación del fermento, etc.

Kayser se expresa a este respecto, de la siguiente manera: "Si la cantidad de fermentos sembrados es mucha para una temperatura dada, la acidez se alcanza muy pronto y si la homogeneidad de la masa no marcha a la par, es conveniente disminuir la cantidad de madre. Si la temperatura es elevada, la homogeneidad será alcanzada, pero la acidez será muy débil, entonces deberá disminuirse la temperatura o aumentar la cantidad de madre".

Teniendo en cuenta todos estos factores, podrá decirse que cada caso debe ser estudiado en particular, y que la cantidad de madre de cultivo a sembrar varía desde el 5 al 20 o/o y aún más.

Webster cita como término medio del 10 al 15 o/o que nos parece como tal el más conveniente para ser usado en la industria. Partiendo de esta base o si se quiere un poco menos si los fermentos son muy activos, puede determinarse la cantidad de madre más conveniente, teniendo siempre en cuenta los otros factores que intervienen para determinarla y en especial el tiempo de maduración y la temperatura.

A pesar de estas cifras, existe un método de maduración a baja temperatura que, como consecuencia, implica el uso de una gran cantidad de madre, el cual consiste en enfriar la crema a unos 10-12° C., sembrándola entonces con el 10-30 o/o de madre y regulando la temperatura de maduración hacia 12° C., de manera de poder batir sin previa refrigeración. Según parece, las mantecas así son más firmes pero la adición de una tal cantidad de madre (como el 30 o/o), no deja de presentar algunos inconvenientes como el aumento del volumen de la crema a tratar, alguna dificultad en la fabricación, etc.

La incorporación de los fermentos activos a la crema, no presenta mayores dificultades. Sólo que no debe echarse de menos el cuidado especial que requieren estos trabajos por la facilidad de contaminación con otras clases de fermentos siempre abundantes en los establecimientos de lechería.

Sin embargo, habiendo establecido la cantidad de madre más conveniente a sembrar y arreglándoselas de manera a conservar, durante la maduración, la temperatura también más propicia, es seguro que se obtendrán buenos resultados. El mayor cuidado conviene tenerlo en lo que se refiere a los tarros o recipientes donde se efectuará la maduración o donde se preparan las madres. Ellos de-

berán ser perfectamente estañados (el ácido láctico ataca las partes oxidadas) y después de haberlos limpiado cuidadosamente con soda, etcétera, se expondrán por varios minutos a la acción esterilizadora de un chorro de vapor.

En las grandes mantequerías, donde se trata de madurar respetables cantidades de crema, el método más conveniente es el uso de varios tanques de pasteurización prolongada que sirven a la vez para la maduración, de modo que una vez pasteurizada, la crema es enfriada, sembrada y agitada sin mayor contacto con el exterior.

Es conveniente, y mejor dicho indispensable, al menos durante el primer tiempo de maduración, mantener la crema en agitación a intervalos medidos, o bien continuamente pero muy despacio, con el objeto de uniformar la masa en fermentación y de mantener en todas partes la misma temperatura.

Si la crema no sufriera agitaciones paulatinas o remoción lenta y constante, la temperatura no podría distribuirse uniformemente: en la periferia o a lo largo de los caños interiores, ella sería siempre más elevada que en otras partes o viceversa. Además, bien pronto la crema se separaría en dos zonas y la acidez no podría marchar uniformemente desde que se sabe que los fermentos lácticos del tipo *Streptococo* gustan de la anaerobiosis. Más peligroso aún sería si en las capas inferiores se establecieran fermentaciones pútridas debidas a contaminaciones, lo cual podría ser evitado en parte por medio de la agitación.

De todas maneras, resalta la importancia de esta operación que no debe ser olvidada.

En el caso de tener que sembrar una madre de cultivo en los mismos lugares de recolección, antes de enviar los tarros a la cremería y con el objeto de implantar desde el principio una buena fermentación láctica en las cremas, y por temor a que sobrevengan otras fermentaciones, teniendo en cuenta que no todos los días llega a reunirse una cantidad suficiente para el transporte, puede usarse el método de sembrar una pequeña cantidad de madre a cada uno de los tarros donde se recolecta la crema, después de la primera recolección. Se deja casi alcanzar la acidez deseada, teniendo cuidado de no pasarse, y luego se guarda en un lugar muy fresco hasta la nueva recolección, en la cual actuará de madre la crema ácida ya existente en los tarros, y, en fin, se envían estos a la cremería un poco antes de que se haya cumplido la maduración.

Para poner en práctica este método que sería ideal en nuestro país, debería disponerse de varios factores importantes: 1.º) lugares (pozos, piletas, etc.) frigoríficos donde poder refrescar la crema,

2.º) vagones frigoríficos para el transporte, 3.º) especial cuidado de parte del personal en los puntos de recolección.

De todas maneras sería menester estudiar bien el asunto antes de ponerlo en práctica, pero se llegaría quizás a encauzar una de las cuestiones más importantes en nuestras cremerías, que es el estado generalmente de malas fermentaciones en que suelen llegar las cremas.

### TEMPERATURA DE MADURACION Y METODOS DE REFRIGERACION

La elección de la temperatura más favorable a la maduración, varía en la práctica entre límites algo extensos.

Muchos prefieren madurar la crema a temperaturas alrededor de 25° C., otros alrededor de 20° C., mientras otros aconsejan muy especialmente la temperatura comprendida entre 15° y 20° C. como la más propicia.

Hasta un cierto límite, cuanto más alta es la temperatura conservada, más rápido se verifica el proceso de maduración, de modo que ateniéndose a esto, las mismas necesidades de la cremería indicarán las normas a seguir.

Si la maduración ha de cumplirse con rapidez, entonces es necesario efectuarla a una temperatura más bien elevada. Pero generalmente no es éste el caso que se presenta en la práctica sino que se dispone para esa operación de regulares espacios de tiempo como de 12 o 18 horas o más, de modo que una menor temperatura puede ser elegida. En general, los resultados más satisfactorios han sido obtenidos con temperaturas comprendidas entre 15° y 20° C. Los daneses, que hacen madurar sus cremas a temperaturas alrededor de 17° C., obtienen muy buenos resultados, en cambio White, de Estados Unidos, recomienda temperaturas alrededor de 21° C.

Hay algunas razones que explican los buenos resultados obtenidos con temperaturas más bien bajas en la maduración de las cremas: se sabe que los fermentos lácticos se desarrollan regularmente bien entre límites de temperaturas bastante extensos (10 a 37° C.), pero al mismo tiempo se ha observado que las temperaturas más bien bajas resultan más favorables a los microorganismos benefactores.

Los fermentos proteolíticos, también se desarrollan bien por otra parte, a bajas temperaturas, y si se admite como en general comienza a sostenerse, que no es solo a los fermentos lácticos a quienes se atribuye la formación del sabor y aroma agradable, sino que depende de la asociación de especies diversas y entre ellas de los

fermentos porteolíticos, se explicarían así los buenos resultados con las temperaturas antedichas.

Además, a menores temperaturas es mucho más fácil evitar el exceso de maduración que resulta muy perjudicial.

En cuanto a los métodos para mantener estable la temperatura durante todo el período de maduración, consideraremos dos casos: el 1.º) cuando se trate de la maduración de pocas cantidades de cremas, y el 2.º) aconsejable para las grandes cremerías.

Tratándose de cantidades reducidas de crema, ésta contenida en tarros o en recipientes apropiados, está expuesta a una temperatura constante por sumersión de ellos en un tanque de agua mantenida a la temperatura deseada. El caso más sencillo se presenta cuando se trata de mantener una temperatura más baja que la del medio ambiente, es decir cuando se trata de enfriar y mantener fresca una cantidad de agua de temperatura más elevada. Esto se consigue fácilmente en nuestras cremerías con el empleo del hielo.

Habiéndonos sido un poco difícil en nuestras experiencias encontrar la cantidad necesaria y suficiente de hielo para enfriar de un número determinado de grados centígrados una cantidad conocida de agua contenida en una pileta o tanque que después nos serviría para el enfriamiento, exponemos el desarrollo de la fórmula confeccionada al efecto y que no es más que un caso del intercambio que se verifica en la cantidad de calor cuando se ponen en contacto dos cuerpos de diferente temperatura.

Siendo:

$C_1$  = Cantidad de calor abandonado por un cuerpo.

$C_2$  = " " " absorbido por el otro cuerpo puesto en contacto.

$c_1$  y  $c_2$  = Calores específicos respectivos, es decir, cantidades de calor de la unidad de masa.

$m_1$  y  $m_2$  = Cantidades de los cuerpos en peso o en volumen.

$t$  = Temperatura a alcanzar.

$t_1$  y  $t_2$  = Temperaturas respectivas de  $m_1$  y  $m_2$ , mayor y menor que  $t$ ,

podremos escribir la fórmula general de la cantidad de calor  $C_1$  o  $C_2$ , contenida en un cuerpo de masa  $m_1$  o  $m_2$  y de temperatura  $t_1$  o  $t_2$ , siendo sus calores específicos  $c_1$  o  $c_2$ :

$$C_1 = m_1 (t_1 - t)c_1$$

$$C_2 = m_2 (t - t_2)c_2$$

Es evidente que una vez puestos en contacto los dos cuerpos o subs-

tancias y cuando han alcanzado la temperatura intermedia  $t$ , la cantidad de calor abandonada por uno de ellos, el más caliente, será exactamente la misma que la absorbida por el otro menos caliente hasta alcanzar la misma temperatura  $t$ . De modo que podemos escribir:

$$m_1 (t_1 - t)c_1 = m_2 (t - t_2)c_2$$

pero como la fusión del hielo para convertirse en agua de hielo a 0° absorbe 80 Cal. por kilo, tenemos:

$$m_1 (t_1 - t)c_1 - 80 m_2 = m_2 (t - t_2)c_2$$

y por tratarse de agua ( $c_1$  y  $c_2 = 1$ ):

$$m_1 (t_1 - t) - 80 m_2 = m_2 (t - t_2)$$

y simplificando por ser  $t_2 = 0$ :

$$m_1 (t_1 - t) - 80 m_2 = m_2 t.$$

luego:  $m_1 (t_1 - t) = 80 m_2 + m_2 t.$

$$m_1 (t_1 - t) = m_2 (80 + t), \text{ y por fin:}$$

$$m_2 = m_1 \frac{t_1 - t}{80 + t}$$

$m_2$  = cantidad de hielo.

$m_1$  = cantidad de agua o de crema y agua a enfriar.

$t_1$  = temperatura del agua.

$t$  = temperatura deseada.

En el empleo de la fórmula es necesario advertir que conviene aumentar de muy poco la cantidad de hielo calculada, por la substracción del medio ambiente, e ir agregando de tiempo en tiempo un poco más a medida que se va derritiendo y regulándose por el termómetro.

Mucho más práctico si es posible, resulta regular la temperatura de la masa de agua y por consiguiente la temperatura de la crema, por medio de caños de "frío" y de vapor situados en el tanque mismo.

De esta manera se llega con bastante aproximación y teniendo cuidado, a mantener una temperatura deseada casi constante para poder llevar a cabo la maduración con uniformidad en todo su período.

En el 2.º caso, cuando se trata de la maduración de más grandes

cantidades de crema y entrando ya a los métodos industriales, la operación del enfriamiento y el mantenimiento de una temperatura constante puede ser llevada a cabo utilizando tanques especiales de maduración.

Los aconsejables son tanques cubiertos, de regulares dimensiones que se conocen como "pasteurizadores" del método prolongado o discontinuo y que a la vez sirven perfectamente como recipientes de maduración y como tal son recomendados.

Su forma es como la de bebedero o bien rectangular, están forrados de madera y algunos poseen capa aisladora.

Su característica principal es estar provistos de un gran serpentín que lo recorre de largo a largo, el cual posee un movimiento rotatorio que sirve para la agitación.

Con este aparato, se cumple en primer lugar, una excelente pasteurización por una media hora a temperatura de unos 63°, agitando continuamente la masa por el movimiento del serpentín que está recorrido esta vez por vapor a alta temperatura y presión regulable por la llave de entrada. Después de la pasteurización, se enfría a la temperatura de maduración con sólo cerrar la llave de vapor y hacer comunicar el serpentín con agua fría o con los caños de la máquina frigorífica.

El peligro de contaminación es escaso desde que todo está cerrado, y después de la siembra de la madre de cultivo, la temperatura es mantenida estable y uniforme con lenta agitación del serpentín, cumpliéndose así una perfecta maduración.

### **ACIDEZ A ALCANZAR** **Factores de que depende**

El índice de la marcha de la fermentación láctica es la verificación de la acidez. De modo que tomando periódicamente la acidez de la crema en maduración, podrá juzgarse con acierto el momento propicio en que deberá considerarse "madura" la crema, y de consiguiente proceder a su batido.

El grado de acidez que deberá alcanzar la crema, depende en primer término de su riqueza en materia grasa y luego de la estación del año y de las exigencias del mercado.

Cuanto mayor es el porcentaje de materia grasa de una crema, menor debe ser la acidez requerida para considerarse madura.

Para explicarnos lo que acabamos de apuntar, debemos considerar que la acidez depende de la cantidad de suero existente en las cre-

mas, el cual contiene la lactosa o el ácido láctico en solución; es decir prácticamente que si una crema de 30 o/o de materia grasa tiene una acidez de 0,6 o/o calculada en ácido láctico, y otra de 40 o/o de materia grasa, tiene tambien 0,6 o/o, en realidad relativamente no tienen la misma acidez puesto que en la primera de ellas esa cantidad de ácido se encuentra en el 70 o/o de suero y en la otra sólo el 60 o/o, de manera que esta última sería considerada más ácida a los fines de la maduración.

La acidez se expresa en general en grados Dornic.

Se entiende por grado Dornic, la acidez en miligramos expresada en ácido láctico y referida a 10 c.c. de líquido. Sabemos que volúmenes iguales de soluciones normales o deci-normales, etc., son equivalentes, es decir que, por ejemplo, grs. 0,009 de ácido láctico, y grs. 0,004 de hidrato de sodio (contenidos en 1 c.c., respectivamente de una solución deci-normal), se neutralizan exactamente.

Examinando los números anteriores, es claro que resultaría cómodo usar una solución tal de una base (hidrato de sodio, por ejemplo), de manera que cada c.c. equivaliera no ya a 9 miligramos, sino a 10 miligramos de ácido láctico, por las facilidades de cálculo. Estableciendo para el sodio la relación:

$$0,009 : 0,009 :: X : 0,010$$

$$X = \frac{0,004 \times 0,010}{0,009} = 0,00444\dots 5$$

vemos que es suficiente para ese fin disponer de una solución que contenga grs. 4,44 de NaOH por litro.

Para el hidrato de potasio tendríamos:

$$0,005610 : 0,009 :: X : 0,010$$

$$X = \frac{0,005610 \times 0,010}{0,009} = 0,00623$$

es decir se necesita una solución que tenga disuelto grs. 6,23 de KOH por litro de agua.

Cada centímetro cúbico de cualquiera de esas dos soluciones representaría en el procedimiento ecidimétrico, 10 miligramos de ácido láctico o sea 10 grados Dornic. De modo que cada décimo de esas soluciones (llamadas soluciones Dornic), corresponden a 1 grado Dornic.

Cuando se dice que una muestra de crema (o de leche) tienen una acidez de 60 grados Dornic, significa que 10 c.c. de esa crema (que es la cantidad que se toma a prueba), contienen 60 milógramos (0,060 grs.) expresados en ácido láctico, o sea 0,6 o/o o 6 o/oo.

Otro de los puntos del cual depende la acidez que deberá alcanzar la crema, es, como habíamos dicho, la estación del año. Y esto se comprende fácilmente, considerando que en verano por ejemplo, siendo mayor la temperatura y por consiguiente más rápido el desarrollo de microorganismos, será menester dar por terminada la operación un poco antes de haber alcanzado la acidez requerida, con el objeto de impedir un exceso por la fermentación que continuará desarrollándose durante el proceso de elaboración propiamente dicho de la manteca y aún después.

Es necesario tener en cuenta en fin, también, para determinar el grado de acidez a alcanzar, las exigencias del mercado en ese sentido.

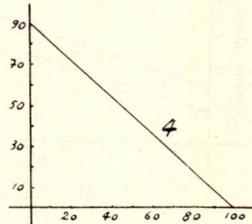
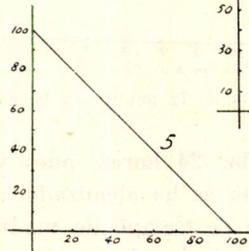
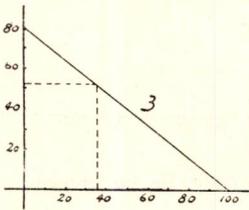
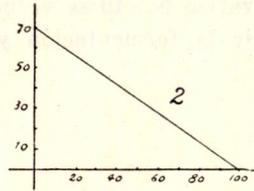
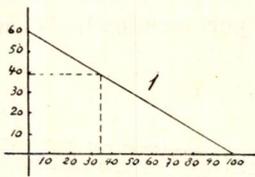
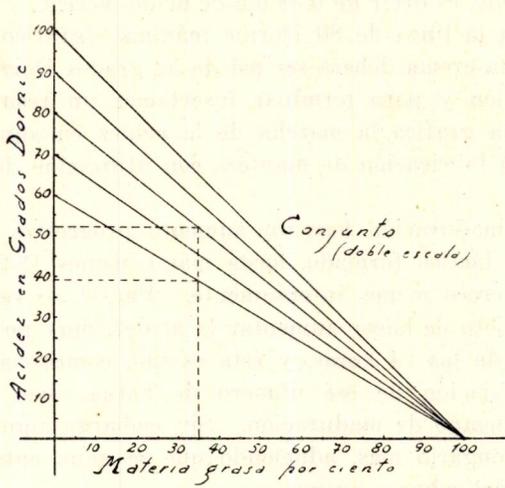
Podrá establecerse, por ejemplo, que para un mercado o una época determinada, la acidez máxima (que sería la correspondiente al 100 o/o de suero o a una crema hipotética sin materia grasa), no deberá exceder del 0,6 o/o. En otra época u otro mercado podrá adoptarse, por ejemplo, el 0,7 o/o como máximo, y así en adelante el 0,8 y 0,9 y en fin el 1 o/o.

Las acideces más bien bajas son preconizadas mucho últimamente por los norteamericanos, los cuales recomiendan siempre evitar la sobre-maduración que es de efectos contraproducentes para la conservación de las mantecas.

Con datos de diferente origen hemos podido construir el gráfico N.º 9 que llamaremos "Triángulo de la acidez", y que consta como podrá verse, de la línea seguida por la variación de dos factores: por ciento de materia grasa en las abscisas, y ácido láctico en grados Dornic en las ordenadas. Conociendo uno de ellos, (el por ciento de materia grasa de las cremas), podrá determinarse en seguida la acidez necesaria a la cual debe ella considerarse madura. La elección de uno u otro de los triángulos o gráficos depende como decíamos, del mercado, o bien de consideraciones personales sobre el fermento utilizado, etc.

Nosotros para colocarnos en un término medio, hemos utilizado en general el gráfico 3 de 0,8 o/o de acidez máxima.

Veamos un ejemplo de su manejo: Supongamos una crema de 35 por ciento de materia grasa, utilizando el gráfico 1, la acidez requerida estará en la intersección de la perpendicular le-



N.º 9.—Triángulo de la acidez  
(S. S. Soriano).

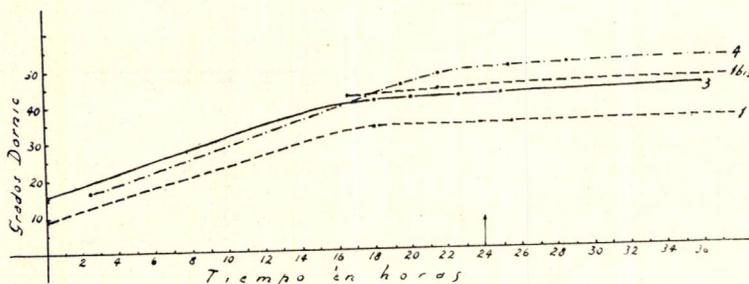
vantada en la línea horizontal (o/o de materia, grasa, en el número 35, con la oblicua de 60 grados Dornic, y será por consiguiente de 39 grados Dornic, es decir de 0.39 o/o de ácido láctico.

Si se emplea la línea de 80 Dornic máxima, (gráfico 3), la acidez de la misma crema deberá ser así de 52 grados Dornic.

A continuación y para terminar insertamos un resumen expresando en forma gráfica la marcha de la acidez en algunas de las experiencias de fabricación de manteca con utilización de fermentos lácticos.

Durante la maduración hay un aumento progresivo en la cantidad de ácido láctico formado, hasta más o menos 18-20 horas en que la acidez crece menos intensamente. Por él se verá también que para el objeto de hacer aumentar la acidez, muy poco se conseguirá después de las 24 horas, y ésta es una comprobación más a favor de la fijación de ese número de horas como límite máximo para el tiempo de maduración. Sin embargo algunos autores aconsejan prolongarlo más, aduciendo que se gana entonces en el mejoramiento del sabor y aroma.

En el gráfico N.º 10 se ve netamente la conveniencia práctica de interrumpir la fermentación y dar por terminada la maduración



N.º 10.—Marcha de la acidez en la maduración de las cremas.

antes de cumplirse las 24 horas, pues ya antes de ese tiempo en los casos considerados, se ha alcanzado la acidez deseada.

Fijando un límite de tiempo de maduración que más convenga, puede llegarse con ejemplos de experiencias como éstas, a determinar, inversamente, la cantidad de madre a sembrar para alcanzar en ese espacio de tiempo la acidez indicada como más conveniente por el porcentaje de materia grasa de las cremas,

**ENSEYOS EFECTUADOS EN EL ESTABLECIMIENTO**  
**“LA MARTONA”**  
**(Vicente Casares F.C.S.)**

1.º **Aislamiento de fermentos lácticos del tipo Streptococo.**

Muestra de leche coagulada B.

Febrero 21|1920.—Siembra en gelosa tornasolada en Caja de Petri.

Febrero 24.—Se trasplantan cinco colonias características a caldo peptonado, lactosado y carbonatado.

COLONIA N.º 1

*Caracteres de la Colonia en gelosa en Caja de Petri:* Rodeada de una aureola rojiza, interna en la gelosa, pequeña, circular, de bordes lisos, transparente, de color blanco-amarillento al microscopio.

*Caldo peptonado, lactosado y carbonatado:* Enturbiamiento uniforme. Después de unos días comienza a asentarse pero muy lentamente. Hay efervescencia manifiesta aunque lenta.

*Cultivo en leche:* Coagula con reacción ácida. El coágulo es uniforme, sin burbujas de gas, y sin separación de suero. De apariencia compacta. Consistencia blanda. Coagulación a 30.º, en unas 7 horas.

*Gelosa en Estría:* No hay casi desarrollo visible. A lo largo de la siembra se nota después de unos días unas pequeñísimas granulaciones mirando oblicuamente.

*Cultivo en papa:* Nulo.

*Movilidad:* Inmóviles.

*Preparación microscópica:* Coloración con Fuchsína fenicada: Pequeños Streptococos.

COLONIA N.º 2

Mismos caracteres que la N.º 1, con las siguientes diferencias:

1.º Bordes de las colonias finísimamente aserrados.

2.º Coagulación a 30º en unas 8 horas.

COLONIA N.º 3

Miscos caracteres que la N.º 2. Coagulación a 30º en unas 9 horas.

COLONIA N.º 4

Idem, como N.º 2. Coagulación 9 horas.

COLONIA N.º 5

Como N.º1. Coag. 11 horas.

## 2.° MADURACION DE LAS CREMAS Y FABRICACION DE MANTECA

Temperatura de maduración: unos 18° C.

### 1.ª Exp. Fermento N.° 1.

Crema a sembrar: Pasteurizada.

Materia grasa: 60 o|o.

Acidez a alcanzar: 32° Dornic. (Ver Triángulo de la Acidez).

Madre de cultivo: 5 o|o.

Acidez: Marzo 3—14 1|2 h. Inicial = 9° Dornic.

„ 4—Después de 18 horas. = 33° Dornic.

Se dá por terminada la maduración y se bate la crema después de enfriarla, obteniendo manteca de 89 o|o de materia grasa y de un gusto muy agradable. Hermoso color amarillo de oro.

### 1.ª Exp. (bis) Fermento N.° 1.

Crema de 45 o|o materia grasa.

Acidez a alcanzar: 44° Dornic.

Acidez: Marzo 10—16 h. siembra.

„ „ 11—Después de 17 h. = 41° Dornic.

„ „ 11—Después de 21 1|2 h. = 43° Dornic.

Poco después se bate, con adición de 0,25 o|o de sal, obteniendo una manteca de aspecto y sabor muy recomendable.

### 2.ª Exp. Fermento N.° 2.

Crema a sembrar, pasteurizada. Materia grasa = 60 o|o.

Acidez a alcanzar = 32° Dornic.

Madre empleada = 5 o|o.

Acidez: Marzo 3—14 1|2 h. Inicial = 9° Dornic.

„ „ 4—Después de 18 horas. = 32° Dornic.

Se bate, obteniendo manteca de 90 o|o de materia grasa, de muy buen aspecto.

### 3.ª Exp. Fermento N.° 3.

Crema a sembrar = 45,5 o|o de materia grasa. No pasteurizada.

Acidez a alcanzar = 42° D.

Madre empleada = 8 o|o (de 2 días coagulada y conservada en frigorífico).

Acidez: Marzo 5.—16 h. Inicial 15,5° D.  
 „ „ 6.—Después de 18 h. = 41° D.  
 „ „ 6.— „ „ 20 h. = 41,5° D.  
 „ „ 6.— „ „ 22 1/2 h. = 42° D.

Se bate, dando manteca de 88 o/o mat. grasa; color menos amarillo que las anteriores.

4.<sup>a</sup> *Exp. Fermento N.º 4.*

Crema a sembrar, pasteurizada, de 35 o/o de mat. grasa.

Acidez a alcanzar = 52° D.

Madre empleada = 10 o/o.

Acidez: Marzo 9.—14 h. Siembra.

„ „ 9|—Después de 2 1/2 h. = 16,5° D.  
 „ „ 9.— „ „ 7 h. = 23° D.  
 „ „ 10.— „ „ 19 1/2 h. = 44,5° D.  
 „ „ 10.— „ „ 21 1/2 h. = 47,5° D.  
 „ „ 10.— „ „ 25 1/2 h. = 50° D.  
 „ „ 10.— „ „ 28 h. = 51° D.

Fué batida, obteniendo manteca de buen aspecto. Materia grasa 89 o/o.

5.<sup>a</sup> *Exp. Fermento N.º 5.*

Crema a sembrar: Pasteurizada.

Materia grasa = 60 o/o.

Acidez a alcanzar = 32 grados Dornic.

Madre de cultivo empleada = 5 o/o.

Marcha de la acidez:

Marzo 3.—1/4 1/2 h. Inicial = 9° D.

„ 4.—Después de 18 h. = 14° D.

„ 4.— „ „ 24 1/2 h. = 16° D.

„ 5.— „ „ 42 1/2 h. = 26° D.

Vista la lentitud, se batió la crema dando una manteca de 90 o/o de materia grasa.

El fermento N.º 1, después de ensayarlo otra vez, se desecha por su baja acidez alcanzada.

## CONCLUSIONES

## a la II parte

—Es necesario interpretar bien el nombre genérico “fermentos lácticos” o más generalmente el de “fermentos” dado en el comercio. Téngase en cuenta que hay muchos tipos de fermentos lácticos; que los recomendables en la fabricación de manteca son los de la especie colectiva *Streptococcus lacticus*.

—La maduración de las cremas, por el acto de la fermentación láctica, confiere a las mantecas resultantes, un sabor y aroma característicos que las diferencia netamente de las mantecas de crema dulce.

—Las mantecas de crema fermentada ácida poseen características especiales, que podrían señalarles un puesto como entidad propia dentro de los diferentes productos de lechería.

—La llegada a las cremerías, de cremas en acidificación en general con fermentaciones mixtas y no deseables, es uno de los hechos que se opone a la fabricación de mantecas de crema de buena fermentación láctica, para lo cual se necesita partir de cremas más o menos dulces. Debe tenerse en cuenta que la implantación de una activa fermentación láctica desde el principio en las cremas separadas, es la primera medida para obtener un resultado satisfactorio. Sin embargo, por medio de la pasteurización y fermentación láctica de las cremas llegadas ya algo ácidas, procediendo con cuidado, podría llegarse quizás a un mejoramiento del producto.

—La conservabilidad de las mantecas de crema fermentada ácida, ateniéndose a experiencias realizadas en Norte América, no parece ser superior a la de las mantecas de crema natural, siendo más bien inferior a la conservabilidad de las mantecas de crema dulce pasteurizada.

—El ácido láctico de fermentación, existente en las mantecas de crema ácida, independientemente de la acción que podría tener sobre la flora microbiana, parece desempeñar un rol químico perjudicial a la conservación de las mismas.

—La pasteurización de las cremas, además de su utilidad sanitaria, constituye también una operación muy provechosa en la fa-

bricación de manteca de crema fermentada. Se aconseja el método de pasteurización discontinua o sea de duración prolongada, pues a sus efectos más seguros y controlables, une la ventaja de poder efectuar pasteurización, enfriamiento y maduración, en los mismos tanques.

—Para la clasificación de mantecas, se hace casi indispensable la adopción de una escala de puntos, con asignaciones parciales por orden de importancia a cada uno de sus caracteres.

—En la maduración de las cremas, se recomienda muy especialmente evitar la sobre-maduración, es decir la excesiva acidez, de efectos contraproducentes en la conservación. En general no debe excederse un término medio máximo de 0,60-0,65 o/o de acidez, calculada en ácido láctico.

---

## BIBLIOGRAFIA

- Aragó Buenaventura*.—Fabricación de quesos y mantecas de todas clases (Hijos de Cuesta, Madrid, 1909).
- Barbier J.*—Industria lechera. Volúmen IV. (Buenos Aires, 1921).
- Bessón A.*—Technique Microbiologique et sérothérapique. (Bailliére. París 1904).
- Bochicchio N.*—Manuale per l'industria del latte e dei latticini (F. Battiato. Catania 1911).
- Bordas F. et Touplain F.* Laiterie.—(Manuels pract. d'analy chimiques). (Ch. Beranger. París et Liege 1913)).
- Brown Chas. W., Smith Lulu M. y Ruehle G. L. A.*—A bacteriological and biochemical study of experimental butters. (Jour. of Dairy Science Vol. III número 5, Septiembre 1920).
- Conn H. W.*—Practical Dairy Bacteriology. (Orange Judd Comp. N. Y. 1908).
- Demolin M.*—Tratado de lechería y cremería (Monteverde y Cía. Montevideo 1913).
- De' Rossi Gino.*—Microbiología agraria e tecnica. (Unione Tip. Edit. Torinese. En publicación).
- Devoto J. A.*—Contribución al estudio de la flora microbiana de la leche. (Tesis Ing. Agr. Facultad Agr. y Vet. Buenos Aires 1910).
- Duclaux E.*—Le lait; Etudes chimiques et microbiologiques. (Bailliére et f. París 1894).
- Duclaux.*—Principes de laiterie.—(A. Colín, París. Encycl. Agr. et Hort. Lechallas).
- Dyer D. C.*—Progressive oxidation of cold-storage butter. (Jour. of Agr. Research. Vol. VI N.º 24. Dept. of Agr. Wash. 1916).
- Embajada Argentina en Washington.*—La industria lechera en los Estados Unidos. (Ex. Intern. de lechería. Bs. Aires 1921).
- Farines A.*—Guide practiq et élément. pour l'examen et l'analy, des laites. (Dubreuil. París 1905).
- Farrington E. H. y Woll F. W.*—Testing milk and its products. (Mendota book Co. 1918).
- Fleischmann W.*—L'industrie laitière au point de vue scéintifique et practiq. (Trad. Brélaz. Oettli. Dunod. París 1884).
- Freudenreich Ed. de.*—Les microbes et leur role dans la laiterie. (Carré Georges. París 1894).
- Gerber Dr. N.*—Traité pratique du controle du lait et de ses produits. (Trael. Pelichet. Wyss. Berne 1903).
- Gianformaggio F.*—Sul Chimismo della fermentazione alcoolica. (Bibl d'Ag. e Ind. aff. Vol. LXXVI F. Battiato. 1921).
- Goupil P.*—Tableaux synoptiques pour l'analy du lait, du beurre et de fromage. (Bailliére. París, 1910).

- Gary C. E.*—Investigation in the manufacture and Storage of butter. 1.º The keeping qualites of butter made under different conditions and stored at diff. temperatures. (Bur. of An. In. Bull. 84 EE. UU.)
- Guareski.*—Fermenti e fermentazione. Manuali Hoeppli.
- Heinemann.*—Milk.—(W. B. Sanders Co. 1919).
- Henseval M.*—Les microbes du lait et de ses derives. (Joseph In. e. Co Lierre 1903).
- Heredia S.*—Contribución al estudio de la flora microbiana del suero de quesos. (Tesis Ing. Agr. B. A. 1922).
- Houdet V.*—Laiterie, beurrerie, fromagerie (Ency. Agr. prat. Hachette. París 1907).
- Jensen Orla.*—Dairy Bacteriology. (Orange Judd Co. N. Y. 1919).
- Kayser Ed.*—Microbiología Agrícola. (Enc. agric. Wery. París 1914).
- Kayser Ed.*—La fermentation Láctique. (Le lait año 1.º núms. 4 y 5, 1921).
- Le Blaye R. et Guggenheim H.*—Manuel practiq. de Diagnostiq. bacteriologiq, et de tech. appliq. (Vigot fr. París 1914).
- Lehmann K. B. et Neumann R. O.*—Manuel de Bacteriologie (Bailliere. París 1913).
- Lezé R.*—Les industries du lait. (Firmin. Didot Cie. París).
- Lindet L.*—Le lait, la crème, le barre, les fromages. Princ. de l'ind. laitiere (Gauthier-Villars. París 1907).
- Mc. Kay y Larsen.*—Principles and practice of butter-making (J. Wiley e Sons).
- Marshall Max S.*—An assótiative study of stropt. lacticus and. b. subtilis in milk. (Jour. of Dairy Science, Vol. LII, N.º 5, Sep. 1920).
- Martín C.*—Lechería. (Encicl. Agríc. Wery. Trad. Cast. Salvat, Barcelona 1920).
- Monvoisin A.*—Le lait. Physiologie, analyse, utilisation. (Asselin et Houzeau, París 1920).
- Morelli L.*—La industria lechera. (G. Gili, Barcelona 1919).
- Oliver J.*—Milk, Cheese, and Butter. (Crosby Lockwood and S. London 1894).
- Pouriau A. F.*—La laiterie (Lebroc. París).
- Razous P.*—La conservation du lait, du beurre et du fromage. (Soc. d'editions technig. París 1907).
- Rivas J. G.*—Fabricación de manteca en la R. Argentino. (Tesis Ing. Agr. Bs. As. 1921).
- Rogers L. A.*—Fishy flavor in butter. (Bur. of An. Ind. Circ. 146, 1909).
- Rogers L. A., Berg W. N. y Davis B. J.*—The temperature of pasteurization for butter-making. (Bur. of An. Ind. Circ. 189, 1912).
- Rogers L. A., Berg W. N., Potteiger C. R. y Davis B. J.*—Factors influencing the change of flavor in storage butter. (Bur. of An. Ind. Bull. 162, 1913).
- Rogers L. A. y Davis B. J.*—Methods of clasifying the lactic-acid bacteria (Bur. of An. Ind. Bull. 154, 1912).
- Rogers L. A. y Gray C. E.*—The influence of acidity of cream on the flavor of butter. (Bur. of An. Ind. Bull. 14, 1909).
- Rogers, Thompson y Keithley.*—The manufacture of butter for Storage. (Bur. of An. Ind. Bull. 148, 1912).
- Rolet Antonin.*—Les industries annexes de la laiterie. (Bailliére, París 1920).

*Rotschild Dr. H. de.*—Pasteurization et stérilization du lait. (Oct. Doin Ch. Beranger. París 1901).

*Rovesti G.*—Lavorazioni moderni del latte (Bibl. Agr. Ottavi. Vol. 54, Casone, Casale, 1905).

*Steenberge P. van.*—En “Annales de l’Institut Pasteur”, año 34 N.º 11, Nov. 1920).

*Stocking W. A.*—Manual of milk products. (Bailey. Mac Millan Co., 1920).

*Webster Edwin.*—Butter making on the farm. (B. of A. I. Farmers, Bull 241).

*White W.*—Making butter on the farm. (B. of An. Ind. Farms’ Bull 876).

*Wing H. H.*—Milk and its products. (Bailey. Mac Millan Co. 1921).

---

Annales de l’Institut Pasteur y Bulletin de l’Inst. Pasteur.

Journal of Dairy Science. (Official organ of the American Dairy Science Association).

La Industria Lechera. Organo del Centro Nac. de la Ind. Lechera. Bs. Aires.

Le Lait. Revue générale de questions laitieres.

Revue générale du lait. Publié sous la direction de Henseval, Weismann, Marcas et Gedoelst. (Lierre. J. Van In. e Cie.).

---