

81  
L. G. M.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



## “ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES DETERMINANTES EN LA ACEPTABILIDAD DE PRODUCTOS LACTEOS”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
M A R C E L A E U G E N I A  
P E R E Z G A V I L A N A V I L A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

I.- INTRODUCCION .....	1
II.- GENERALIDADES .....	6
1.- Aspectos de Industrialización de la_ Leche .....	7
1.a. Industrialización de la Leche_ en México .....	8
2.- Papel de los Microorganismos Inicia- dores en la Aceptabilidad de Produc- tos Lácteos .....	12
3.- Papel de la Proteólisis en la Acepta- bilidad de Productos Lácteos .....	14
4.- Papel de la Lipólisis en la Aceptabi- lidad de Productos Lácteos .....	18
5.- Importancia de la Degradación de la_ Lactosa en la Aceptabilidad .....	20
6.- Experiencias anteriores .....	25
III.- METODOS Y MATERIALES .....	31

1.-	Fabricación de quesos .....	32
1.a.	Leche .....	32
1.b.	Cuenta de Microorganismos Totales .....	32
1.c.	Preparación de Inóculos .....	33
1.c.1	Determinación de Actividad .....	34
1.c.2.	Desarrollo masivo de microorganismos iniciadores .....	34
1.c.3.	Cuenta individual de cultivos lácticos ....	34
1.d.	Preparación de material empleado en la elaboración de quesos en medio estéril .....	35
1.e.	Elaboración de quesos en medio estéril .....	37
2.-	Controles durante la Maduración .....	39
2.a	Determinación de Humedad .....	39
2.b	Determinación de Acidez .....	39
2.c	Cuenta diferencial de microorganismos iniciadores en cada uno de los quesos experimentales .	39

3.-	Determinación del grado de Proteólisis sufrida en los Quesos .....	40
3.a.	Proteína Total .....	40
3.b.	Determinación de Proteína Soluble .....	40
3.c.	Filtración en gel .....	41
4.-	Determinación del Grado de Lipólisis	41
4.a.	Extracción de la grasa de los Quesos .....	41
4.b.	Determinación por cromatografía de gases de los ácidos grasos libres contenidos en la fracción grasa de los quesos experimentales .....	42
4.b.1.	Butilación de las grasas	42
4.b.2.	Determinación por cromatografía de gases de los ácidos grasos libres de las muestras y estándares butilados .....	43
4.c.	Determinación por Cromatografía de gases de los ácidos grasos volátiles (AGV's) en la fracción soluble en agua de los quesos .	44

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION .....	46
1.- Leche .....	47
2.- Quesos .....	47
2.a. Determinación de humedad en - los diferentes quesos .....	47
2.b. Determinación del grado de a- cidez en los quesos y en las_ primeras etapas del proceso - de elaboración .....	49
2.c. Variación del número de micro- organismos en los quesos, en - los diferentes periodos de ma- duración .....	57
2.d. Determinación del grado de pro- teólisis .....	65
2.d.1. Resultados de las deter- minaciones de proteí <u>na</u> soluble a p.H 4.6 y de_ proteí <u>na</u> total .....	65
2.d.2. Resultados de la croma- tografía en columna pa- ra determinar las frac- ciones de nitrógeno so- luble a p.H 4.6 de los quesos, en los diferen- tes periodos de madura- ción.....	67

2.e. Determinación del grado de Lipólisis .....	82
2.e.1. Determinación de la grasa contenida en los quesos experimentales ...	82
2.e.2. Resultados de la cromatografía de gases de la fase lipídica de los quesos experimentales .	82
2.e.3. Resultados de la cromatografía de gases de la fracción soluble en agua de los quesos .....	88
V.- CONCLUSIONES .....	96
BIBLIOGRAFIA .....	105

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N



## I N T R O D U C C I O N

Uno de los principales factores que llevó al desarrollo - del presente trabajo, fue el deseo de realizar en México, estudios que aporten material valioso a la investigación lactológica, a fin de disminuir la dependencia tecnológica del extranjero y de reducir al mínimo posible la importación de materias primas, lo cual, además de hacernos dependientes de otros países, eleva su precio, dificulta - su manejo o uso directo, entre otros puntos.

Pero, sobre todo, cabe el considerar esta autosuficiencia para crear productos estudiados y pensados para - complacer paladares mexicanos, punto estratégico incluso para una prácticamente asegurada aceptación del producto.

En el presente trabajo se hace una revisión teórica y se efectúan algunos aspectos prácticos de los factores que influyen en la aceptabilidad de productos lácteos, -- orientando los experimentos realizados más hacia quesos, - específicamente a un tipo de queso semimadurado, desarrollado en el Departamento de Biotecnología del Instituto - de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., (Reynoso, 1981).

Así mismo, se propone la posibilidad de producir los cultivos lácticos en nuestro país, para ser inoculados directamente a la leche, crema, mantequilla u otros derivados, sin verse en la necesidad de recurrir a la contratación de personal especializado en el manejo de cepas importadas, las cuales deben reactivarse, así como en el -

control adecuado de la rotación de cultivos para evitar pérdidas cuantiosas por la presencia de fagos, entre -- otros factores que deben tomarse en consideración cuando se manejan cepas de inóculos importados, pues todos los puntos anteriores abarcan al error humano, fácil de remediar cuando se habla a pequeña escala, pero con poca cabida en los productos obtenidos a nivel industrial, los cuales, en ocasiones, sufren graves accidentes de elaboración, teniéndose, por tanto, serias repercusiones económicas.

Se procedió, pues, a elaborar quesos a nivel laboratorio, en condiciones estériles, para tener como flora a las bacterias iniciadoras inoculadas y una mínima, prácticamente nula cantidad de los microorganismos que sobreviven aun después de la pasteurización, por lo que será necesario llevar un control sin inóculo en todos los estudios, además de los cuatro quesos inoculados con las siguientes combinaciones de bacterias lácticas:

Queso 1 = *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*

Queso 2 = *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus diacetylactis*.

Queso 3 = *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Propionibacterium shermanii*.

Queso 4 = *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* y *Leuconostoc cremoris*.

Se realizarán estudios sobre la acidez desarrollada durante la maduración y del número de microorganismos presentes de cada especie; se analizarán las fracciones proteicas liberadas por cualquiera de los agentes proteolíticos mediante la filtración en gel y la determinación espectrofotométrica de dichas fracciones.

Se empleará la cromatografía de gases para efectuar estudios de determinación de ácidos grasos liberados por el fenómeno de lipólisis o presentes por haber sido metabolizados por los microorganismos heterofermentativos. Lo anterior, debido a la importancia que tienen los ácidos grasos, al igual que la caseína disuelta y la acidez producida, en el olor, sabor, color y textura de los quesos y otros derivados lácteos.

Los estudios así efectuados aportarán conocimientos más concretos sobre las variables bioquímicas y microbiológicas que traen consigo la presencia de compuestos que confieren determinada o determinadas características específicas.

De igual manera que ésto se estudió en un queso semi madurado y los resultados traerán consigo mayor conocimiento de las posibles variaciones de dicho producto, sería interesante poder extrapolar dichos resultados hacia otros derivados lácteos ya conocidos en el mercado o, incluso, desarrollar nuevos productos y, en ambos casos, aprovechar determinada característica bioquímica, física o microbiológica, estudiarla, analizarla y aplicarla posteriormente a nivel industrial, contando además con la ventaja de una muy posible disponibilidad de los microorganismos inicia-

dores en nuestro país.

Además, el presente estudio puede servir como fundamento teórico y práctico de trabajos que posteriormente se realicen.

## CAPITULO II

### GENERALIDADES

---

## GENERALIDADES

### II.1) ASPECTOS DE INDUSTRIALIZACIÓN DE LA LECHE.

La utilización de la leche en la alimentación humana se remonta a las primeras edades de la civilización. Desde entonces, ha sido un alimento natural con capacidades nutricionales sorprendentes, por lo que, durante muchos años se han buscado nuevas formas de conservarla y de utilizarla para la elaboración de derivados. En un principio, los derivados lácteos se hacían más que con la finalidad de transformarlos, por la excelente forma de conservación que representaban; el yoghurt y otras leches acidificadas son un ejemplo de esto, así como la obtención del queso ( Rusoff, 1956).

Conforme el tiempo pasó y se comenzaron a establecer los tratos de comercio, el hombre vió que la elaboración de productos derivados de la leche traía consigo mayores réditos -- que los obtenidos de la venta de leche fluida. Así pues, el hombre empezó a interesarse en la elaboración de derivados a mayor escala. Sin embargo, no fue sino hasta hace aproximadamente cien años que se fabricó el queso comercialmente. Antes de éso el trabajo seguía siendo meramente artesanal ( Sears, 1954).

Habiéndose dado cuenta el hombre del aumento en el valor agregado de los productos lácteos, se empieza a cimentar lo que será la industria láctea de nuestros días.

Al contarse ya con leches acidificadas y una gran variedad de quesos, así como con la elaboración de cremas y mantequillas, se empiezan a elaborar otros productos como helados y

dulces de leche. Posteriormente vienen nuevas tecnologías - que permitieron pasteurizar, concentrar, condensar y deshidrar la leche, todo ésto con la consecuente facilidad de manejo y aumento muy considerable del tiempo de conservación, lo cual facilitó aún más su comercio.

### 11.1.a) INDUSTRIALIZACION DE LA LECHE EN MEXICO.

La producción de leche en nuestro país, además de ser insuficiente, está, en gran parte, en manos de pequeños productores que se ven obligados a venderla a las grandes empresas\_ pasteurizadoras que monopolizan la venta. Otro tipo de industrias procesadoras transnacionales prefieren incluso importar la leche a utilizar la de ínfima calidad que les ofrecen los productores nacionales.

Aun así, la demanda de leche en nuestro país no queda - cubierta con los productores existentes y, año con año, el - déficit es mayor.

A pesar de los esfuerzos del gobierno y de algunas compa<sup>ñ</sup>as privadas, el aumento de la demanda crece más aceleradamente que el de la producción.

Haciendo una breve revisión de algunos datos estadísticos, vemos el Cuadro # 1, en el cual se muestra el destino de la leche producida en México en 1980, así como las cantidades producidas. De este cuadro se observa que a la industrialización de la leche en nuestro país le corresponde aproximadamente el 25 % de la producción nacional, representando ésto cerca de 2,000 millones de litros anuales. De ésta - cantidad de leche industrializada se obtiene principalmente -- queso, crema y mantequilla.

C U A D R O # 1

USO DE LA PRODUCCION NACIONAL DE LECHE (Millones de litros)

PRODUCCION ESTIMADA DE LECHE EN MEXICO PARA 1980	7,021.2	Consumo como	Pasteurizada	1,507.1
		leche fluida (75.1%)	Cruda	3,486.2
		5,273.0		
		Aprovechamiento industrial	Leche:	
		(24.9%)	Evaporada	15.8
		1,748.2	Condensada	118.3
			En polvo entera	172.3
			Dietética	101.5
			En polvo - descremada	5.5
			DERIVADOS -	1,614.1
			LACTEOS	

Fuente: Elaborado con datos de la Publicación Bimestral de la Asociación Nacional de Productores de Leche Pura, A.C., 1980 y del Banco de México.



Algunos de los productos antes mencionados, requieren, para su fabricación, de ciertas bacterias lácticas llamadas bacterias iniciadoras, responsables de impartir a los productos sus cualidades sensoriales específicas.

Hasta el momento, México no cuenta con la producción de iniciadores, a pesar de que las ventas de los productos que requieren de dichas bacterias en su fabricación son de magnitud considerable, representando alrededor de 200,000 millones de pesos anuales.

La importación de estas bacterias no representa para el país una importante fuga de divisas, ya que el costo de transformación de leche en queso implica un porcentaje muy pequeño de los costos de materia prima. Sin embargo, estos iniciadores lácticos son, la gran mayoría de las veces, los que determinan el tipo de proceso a utilizar para la obtención de un producto determinado; es decir, las bacterias iniciadoras determinan también la tecnología a utilizar.

Por otro lado, la importación de las bacterias representa una penetración en cierta manera cultural, ya que han sido seleccionadas para impartir sabor, olor y textura a los productos que, bajo el mercado y los gustos del país de origen, no están apegados a los gustos y preferencias gastronómicas del nuestro.

Otra desventaja en la importación de estas bacterias iniciadoras, es que las recibimos ya formuladas para determinado producto, siendo, la mayor parte de las veces, desconocidos los tipos y cantidades de bacterias presentes, lo que limita los criterios técnico-científicos en su utilización y que ocasiona que las personas que las utilizan se dediquen en forma empírica a seguir recetas que los fabricantes indiquen.

Todo ésto trae como consecuencia una industria láctea nacional con muchas limitaciones para progresar en forma independiente y autónoma ya que, por un lado, no se conocen las implicaciones de la utilización de las bacterias iniciadoras y, por ende, dependemos de los desarrollos que se hagan en el extranjero, cuya aplicación en nuestro país no podemos asegurar, ya que fueron desarrolladas para otras idiosincrasias que no forzosamente pueden ser aplicables a las nuestras y, por el otro, su producción industrial depende de un producto de aparente insignificancia económica, pero que si les fuese cortado el suministro del mismo, los industriales nacionales serían incapaces de sustituirlo con sus propios recursos.

De acuerdo con datos obtenidos por la Subsecretaría de Ganadería, en 1979, dentro de los establecimientos procesadores de leche, el porcentaje de establecimientos productores de queso, crema y mantequilla fue del 60 % y, aunque de éstos no podemos afirmar que todos requieren de bacterias iniciadoras para obtener sus productos, una buena parte de este porcentaje podría ver desequilibrada su posición y vendría, por consecuencia, una contribución más al deterioro de la economía del país. Tanto la mano de obra empleada como las industrias mismas, por pequeñas que sean, hablan a favor de considerar más seriamente lo antes expuesto a fin de evitar la desaparición de industrias y el desempleo, en un país que pretende salir a flote de la crisis económica por la que pasa actualmente.

## 11.2) PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS INICIADORES EN LA ACEPTABILIDAD DE PRODUCTOS LÁCTEOS.

Los iniciadores lácticos son aquellos microorganismos empleados durante la elaboración de productos lácteos, pudiendo emplearse solos o en mezclas, con el fin de conferir características específicas, así como para estandarizar los productos, resultando, en conjunto, en una mayor aceptabilidad de éstos.

El estudio de estos cultivos iniciadores abarca desde la acción empírica hasta el conocimiento de las características de cada uno de los microorganismos empleados, buscando una acción determinada y premeditada en los productos en que se utilizan.

La presente revisión enfoca, de manera específica, a los estreptococos lácticos gram (+), fundamentalmente homofermentativos, catalasa (-), en pares o en cadenas, representados por dos especies reconocidas: *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*.

De las especies heterofermentativas se incluye a *Streptococcus diacetylactis*, *Propionibacterium shermanii* y *Leuconostoc cremoris*, todas gram (+), no esporulados; *Propionibacterium shermanii* se presenta en forma de barras, es anaerobio facultativo y catalasa (+). *Leuconostoc cremoris* y *Streptococcus diacetylactis* se presentan en pares o en cadenas y ambos son catalasa (-).

Los fermentos lácticos no deben considerarse sólo como un medio de aporte de ácido láctico, sino que constituyen también una fuente de bacterias activas capaces de multiplicarse...

en el seno de la leche, de la cuajada o de la crema, y de producir, en el momento favorable, la acidez, aroma y textura deseados.

La maduración de los derivados lácteos, como es el caso específico de los quesos, plantea uno de los problemas -- más complejos de la bioquímica de los alimentos y es el resultado global de una serie de variados fenómenos: proteólisis; desaminación y descarboxilación; lipólisis y degradación de los ácidos grasos; degradación de la lactosa; reacciones ácido-base o efecto tampón. A ésto se añaden las acciones sinérgicas de las substancias sápidas, etc.

Contemplando específicamente el caso de los quesos, se observa que tras el desuerado, la cuajada concentra el número de microorganismos, pudiendo llegar a miles de millones -- por gramo, dominando las bacterias iniciadoras lácticas.

Al principio de la maduración son numerosos los estreptococos lácticos que desaparecen progresivamente; su papel -- en la maduración parece ser escaso; sin embargo, los productos de la fermentación láctica de los estreptococos intervienen en la formación del aroma de algunos tipos de queso.

Después de los estreptococos predominan los lactobacilos, productores de enzimas proteolíticas y lipolíticas endocelulares, que pasan al medio tras la muerte de las bacterias; su papel es importante en la maduración de los quesos que no poseen una flora superficial activa.

La contribución al sabor y aroma de los quesos por presencia de ácidos grasos libres, como es el caso del acético o del propiónico, resultantes del metabolismo de algunas bacterias lácticas es preponderante para la buena aceptación del producto final (Collins, 1972).

### 11.3) PAPEL DE LA PROTEOLISIS EN LA ACEPTABILIDAD.

La solubilización de la caseína es el fenómeno más importante en la maduración de los quesos, ya que tiene repercusión en el sabor y en la textura del producto final. En el queso desuerado existen de 4 a 8 % de sustancias nitrogenadas solubles en agua; al final de la maduración esta proporción se eleva entre 20 y 50 %, según el tipo de queso del que se trate.

La solubilización de la caseína consiste en una digestión progresiva, causando los siguientes efectos:

- a) la masa del queso se torna más blanda y untuosa
- b) se encuentran sustancias que poseen aroma y sabor, especialmente los aminoácidos y sus productos de -descomposición; ácidos, aminos y amoníaco.

En el caso específico de los quesos, las fuentes productoras de proteólisis pueden ser:

- 1) Cuajo (renina u otros agentes). El cuajo tiene una actividad proteolítica no específica. Sin embargo, la pepsina de los cuajos comerciales sólo tiene una débil actividad al pH imperante en los quesos ( entre pH 5 y 6 ).
- 2) Los péptidos liberados por el cuajo facilitan la utilización de estos fragmentos por parte de las enzimas microbianas, como es el caso de las proteasas de los microorganismos iniciadores, o, incluso, de la flora presente no iniciadora.

La velocidad con que la proteólisis se presenta está regida por varios factores como son:

- temperatura de maduración.
- velocidad de solubilización (mayor al inicio de la maduración que al final).
- Humedad. A mayor humedad, mayor grado de proteólisis.
- pH. El pH menor de 5.5 retrasa la proteólisis.
- La presencia de grasa retrasa la digestión de la caseína. Los ácidos grasos insaturados tienen acción inhibitoria sobre las bacterias proteolíticas.
- A mayor dosis de cuajo, más pronunciada es la solubilización de las caseínas.
- La sal retrasa la proteólisis.

(Morris, 1978).

Los productos finales de la proteólisis son sápidos. Las peptonas son amargas, por lo que no deben ser demasiado abundantes (Edwards, 1983).

Los aminoácidos libres tienen un gran papel a causa de sus diversos sabores. Algunos tienen sabor azucarado: glicocola, alanina, serina; otros amargo: leucina, lisina, triptofano. El amoniaco ejerce un cierto efecto sobre el sabor, sobre todo en los quesos de corteza lavada. El  $H_2S$  y el metanetiol, siempre presentes como indicios, se consideran componentes del aroma (Alais, 1970; Manning, 1979).

Así pues, la proteólisis juega un papel importante en la conversión de la cuajada de para-caseinato de calcio en un queso maduro.

Tal vez la principal consecuencia de la actividad proteolítica es el cambio de la textura suave, al mismo tiempo que da cuerpo al queso ya maduro.

Pero la hidrólisis de las caseínas también influye, -

como ya se mencionó, en el sabor y aroma, ya que los aminoácidos libres tienen características de olor y sabor bien definidas.

Sin embargo, los efectos de la proteólisis también traen consigo sabores y olores no deseables, especialmente al conferir sabores amargos (Stadhouders, 1983).

En estudios realizados en queso Cheddar se ha visto que las caseínas  $\alpha_s_1$  (analizadas aprovechando la solubilidad de aproximadamente 30 % de la proteína en queso Cheddar maduro a pH 4.6, empleando técnicas de filtración en gel) están completamente degradadas en quesos ya maduros, hasta su estructura primaria de  $\alpha_s_1$ -1 (Fox & Guiney, 1973; Creamer & Richardson, 1974). La caseína  $\beta$  permanece casi inalterada durante todo el período de maduración debido, muy probablemente, a la baja actividad de agua de estos quesos (Ledford, O'Sullivan, 1966).

La para- $\kappa$ -caseína no se hidroliza durante la maduración.

Los péptidos menores resultantes de la hidrólisis de las caseínas se analizaron por fraccionamiento en columna (Sephadex G-50) y se encontraron variaciones en las proporciones de estas fracciones a diferentes tiempos de maduración (Reiter, 1969; Ledford, 1966; O'Keefe, 1976).

Estos estudios resultan útiles como base técnica, pero no pueden ser aplicados a otros tipos de quesos o derivados lácteos, a menos que se efectúe la repetición de la metodología para cada problema en estudio y así obtener resultados confiables.

Particularmente, en el queso Cheddar mencionado, se encontró que la renina era el agente proteolítico por excelencia (O'Keefe, 1976). La presencia de péptidos pequeños y -

de aminoácidos libres se atribuye a la actividad de peptidasas de los iniciadores.

Existen también estudios (Yamamoto & Yoshitake, 1962) para saber en qué proporción son responsables de la proteólisis los agentes anteriormente mencionados: coagulantes, flora iniciadora y sus enzimas; las bacterias u otros microorganismos no iniciadores y sus enzimas, así como las proteasas nativas de la leche que pueden también intervenir.



#### 11.4) PAPEL DE LA LIPOLISIS EN LA ACEPTABILIDAD.

Los efectos de la lipólisis en la leche y sus derivados se deben a la presencia de ácidos grasos libres resultantes de la hidrólisis de la grasa. Sin embargo, no todos los ácidos grasos que se encuentran en la leche, quesos y otros, son resultado de lipólisis. La presencia de ácidos grasos de cadena corta (bajo peso molecular) puede deberse a síntesis microbiana o a que son producto de la degradación de la lactosa por parte de la flora presente. Los ácidos grasos de cadena media provendrán de lípidos hidrolizados principalmente, y los de cadena ramificada derivarán de la degradación de aminoácidos.

La lipasa natural de la leche no es activa cuando hablamos de queso pues sólo trabaja a pH's mayores de 6.5 (Alais, 1970).

Los productos de degradación de la materia grasa tienen tanta influencia en el aroma que son suficientes pequeñas cantidades de los ácidos butírico, caprónico, caprílico y cáprico para dar al queso un sabor pronunciado. El sabor picante del queso Roquefort se debe, por una parte, a los ácidos grasos volátiles ( $C_4$  a  $C_{10}$ ) y, por otra, a la presencia de metilcetonas (Manning, 1979).

Al igual que la proteólisis, el grado de avance de esta hidrólisis puede ser benéfico o perjudicial para las características sensoriales conferidas a los derivados lácteos o a la leche misma (Pillay, 1980).

La fuente de lipasas que liberan los ácidos grasos nunca ha quedado completamente en claro pues, los estudios han

ta ahora realizados son a pHs diferentes a los de los productos lácteos en los que se encuentran las enzimas o bien, si se logra igualar el pH, se presentan variaciones en la actividad de agua y en los olores y sabores obtenidos y que, desde luego, difieren de los del producto original (Paulsen, 1980).

Ahora bien, la distribución de los ácidos grasos provenientes de cualquiera de las posibles fuentes antes mencionadas entre la fase lipídica y la acuosa, se ha encontrado que también contribuye al aroma y sabor de los quesos - (Biede & Hammond, 1979).

Algunos compuestos solubles en lípidos confieren sabor y aroma, además de los ácidos grasos libres, entre los que se encuentran las pirazinas, carbonilos, fenoles y lactonas. Estos compuestos parecen no provenir de acción bacteriana, pero resultan ser importantes por el efecto sinérgico que tienen con los productos de lipólisis en su contribución - al aroma y sabor (Pillay, 1980; Manning, 1979).

El estudio de los ácidos grasos libres ha podido ampliarse gracias a la cromatografía de gases, día con día más sofisticada.

A pesar de los métodos analíticos tan sorprendentes - que se han venido desarrollando, parecen no ser suficientes para evaluar las propiedades sensoriales.

La lipólisis y la proteólisis conjuntamente diluyen, suavizan y mezclan íntimamente los diversos sabores y olores, haciendo muy complejo el estudio de su desarrollo y, principalmente, de sus efectos.

## 11.5) IMPORTANCIA DE LA DEGRADACION DE LA LACTOSA EN LA ACEPTABILIDAD.

Los productos de degradación de la lactosa como son los ácidos grasos volátiles: acético, propiónico y butírico; cetonas como el diacetilo, ésteres, entre otros, contribuyen al sabor y al olor de los productos lácteos (Forss, 1979).

Se ha encontrado que el ácido láctico confiere un sabor refrescante a los quesos frescos tan populares en nuestro país.

En quesos, la presencia de ácidos producidos por iniciadores también es muy importante en lo referente a la acción de la renina sobre las caseínas para dar lugar a la cuajada. La acidez produce mayor cantidad de calcio iónico. Este calcio soluble es necesario para la coagulación de los caseinatos en la leche por acción de la renina, lo cual acorta la duración de la coagulación.

Sin embargo, al acercarse al punto isoeléctrico la leche no coagula normalmente debido a la degradación del fosfato tricálcico ligado a la caseína en el estado coloidal, degradación que también afectará a la consistencia del coágulo y a la formación del gel característico.

La leche en medio ácido se protona, neutralizando la carga de las proteínas y logrando una desestabilización en las micelas que se precipitan en pequeños cúmulos.

El agua ligada a la micela también se ve afectada - pues la protonación deshidrata parcialmente la corona de hidratación de la micela, lo que desestabiliza la suspensión, con la consecuente floculación de pequeños coágulos (Webb, 1978).

La acidez facilita también la expulsión de agua (desuerado) en las partículas de cuajada durante el cocimiento y en la cuajada ya desuerada (Marcos, 1981).

Pero esta regulación del desuerado por la acidez resulta también inversa a causa del suero que permanece en el queso mismo, y que es rico en lactosa, susceptible de ser degradada y producir acidez. Entre mayor sea la cantidad de suero en la cuajada, mayor es la acidez potencial.

La humedad a su vez regula la velocidad de crecimiento bacteriano y la acidez retarda o inhibe el crecimiento de la flora indeseable, como son las bacterias de putrefacción y las productoras de gas.

En el Cuadro # 3 se enumeran las principales bacterias iniciadoras empleadas industrialmente para producir acidez en primer término, aunque se puede observar que algunas también contribuyen al sabor.

La degradación de la lactosa trae consigo un papel muy importante en la aportación de ácidos grasos de bajo peso molecular, primordiales en el sabor y aroma de los derivados lácteos, y además, la síntesis de ácido láctico es esencial para obtener, sumado a aroma y sabor, una maduración controlada y la conservación del nivel de calidad de la mayoría de los quesos.

En la Figura # 1 se presenta la ruta metabólica mediante la cual la lactosa se convierte en ácido láctico.

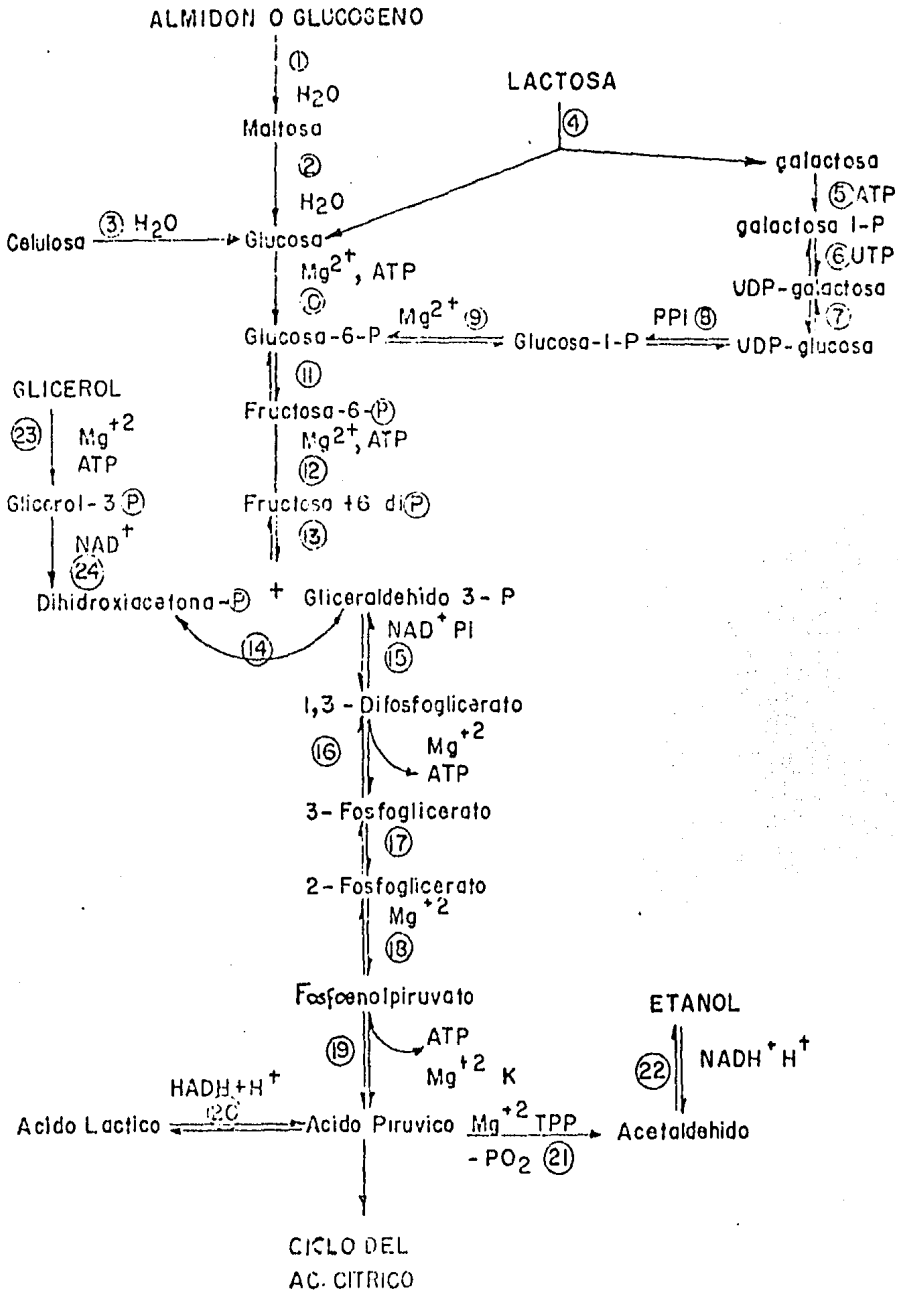
La lactosa, el principal carbohidrato de la leche y de la cuajada de los quesos, se convierte en ácido láctico en, aproximadamente, 24 horas. La glicólisis de la lactosa a ácido láctico requiere de numerosas etapas reguladas enzimáticamente, como puede verse claramente en la Fig. 1 (Kilara, 1978).

## C U A D R O # 3

## PRINCIPALES BACTERIAS LACTICAS PRODUCTORAS DE ACIDEZ

C U L T I V O	F U N C I O N
Lactobacillus bulgaricus	Acidez y sabor
Lactobacillus lactis	Acidez y sabor
Lactobacillus helveticus	Acidez y sabor
Lactobacillus acidophilus	Acidez
Streptococcus thermophilus	Acidez
Streptococcus diacetylactis	Acidez y sabor
Streptococcus lactis	Acidez
Streptococcus cremoris	Acidez
Streptococcus durans	Acidez y sabor
Streptococcus faecalis	Acidez y sabor

Fuente: C. Alais, 1970.



4) b-galactosidasa . 5) Galactocinasa 6) UDP galactosapiriofosforilasa. 8) UDP g lucosa fosforilasa. 9) Fosfoglucomutasa. 10) Hesoquinasa. 11) fosfoglucoisomerasa. 12) Fosfofructocinasa. - 13) aldolasa. 14) triosafofosfatoisomerasa. 15) Glicer aldehido - 3-P deshidrogenasa. 16) Fosfoglicerolquinasa. 17) fosfogliceril mutasa. 18) Enolasa. 19) Piruvatoquinasa. 20) lactato deshidrogenasa.

Así pues, la presencia del ácido láctico, en combinación con los otros compuestos antes analizados, formando una mezcla muy compleja, confieren las características tan propias de los derivados lácteos.

## 11.6) EXPERIENCIAS ANTERIORES.

Los puntos analizados en el presente trabajo son continuación de otros previos, elaborados en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M., específicamente el de tesis de Licenciatura de J.J.Reynoso, 1981, en el cual se analizó y se llevaron a efecto los siguientes puntos:

- . Elaboración de quesos semimadurados con diversos cultivos lácticos y empleando diferentes combinaciones, mismas que se emplean en el presente trabajo.
- . Análisis físico-químico de la leche y de los quesos en diferentes períodos de maduración, hasta cumplir 30 días de elaborado.
- . Análisis sensorial de los quesos a diferentes tiempos de maduración.

De los resultados específicamente del último punto, se encontró que el queso elaborado con la combinación *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris* presentaba los máximos atributos de textura y sabor, comparada con las otras tres combinaciones y el queso control (sin inóculo), por lo que se sometió posteriormente a análisis de preferencia con quesos comerciales. (Ver gráficas 1 a 8).

En lo referente a olor y color, no resultó ser el que marcaba el más alto rango de preferencia, por lo que en dicho trabajo se propone la continuación del estudio para optimizar estos atributos, a fin de elevar la preferencia y hacerlos más aceptables a nivel comercial.

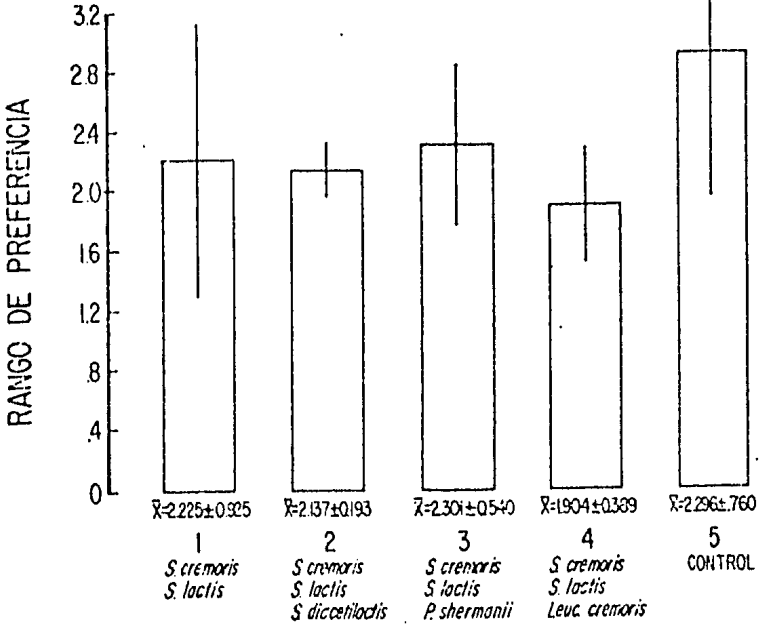


Se propone además, la realización de trabajos posteriores para analizar más minuciosamente los cambios bioquímicos, microbiológicos y físicos, así como el aprovechamiento posterior de dichos resultados en la industria láctea, - como lo es el uso de cultivos lácticos en el proceso de elaboración de quesos semimadurados, como el desarrollado, el cual cuenta con características satisfactorias para competir exitosamente en el mercado industrial y de consumo a nivel nacional, con cualquier proceso y queso comercial de tipo semimadurado.

El análisis más minucioso de los aspectos microbiológicos y bioquímicos que rigen a este tipo de queso semimadurado, elaborado empleando las combinaciones de microorganismos que más adelante se detallan es, concretamente, lo que se analizará en el presente estudio.

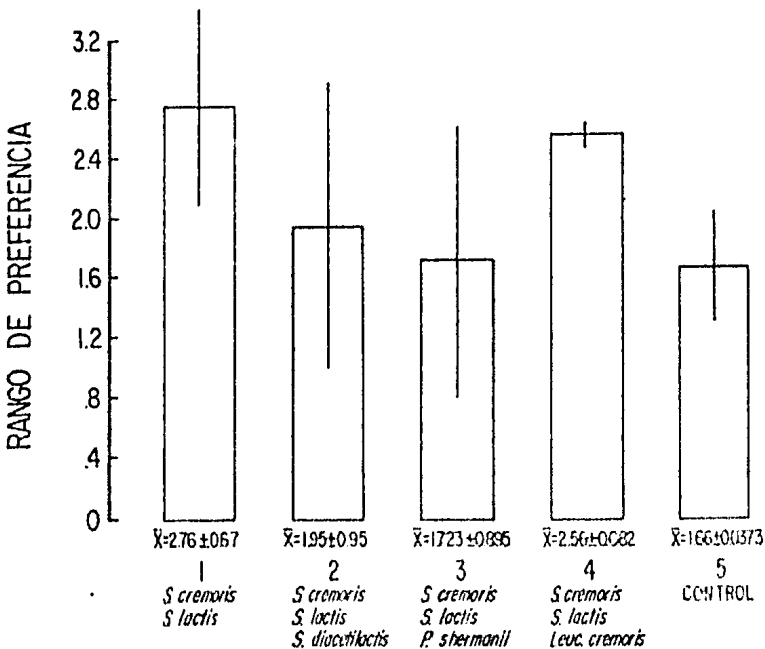
Gráfica 1

### INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS INICIADORAS EN LA PREFERENCIA DEL COLOR DEL QUESO SEMIMADURADO



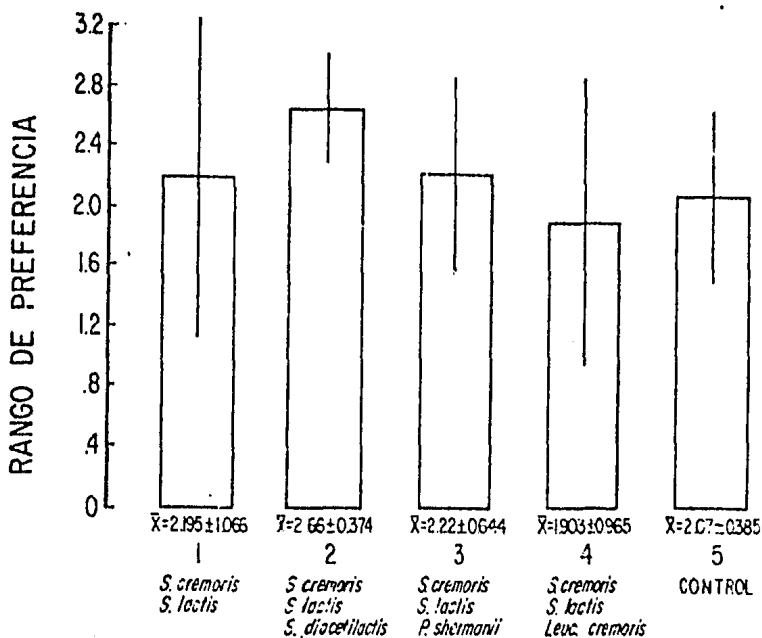
Gráfica 2

### INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS INICIADORAS EN LA PREFERENCIA DE LA TEXTURA DEL QUESO SEMIMADURADO



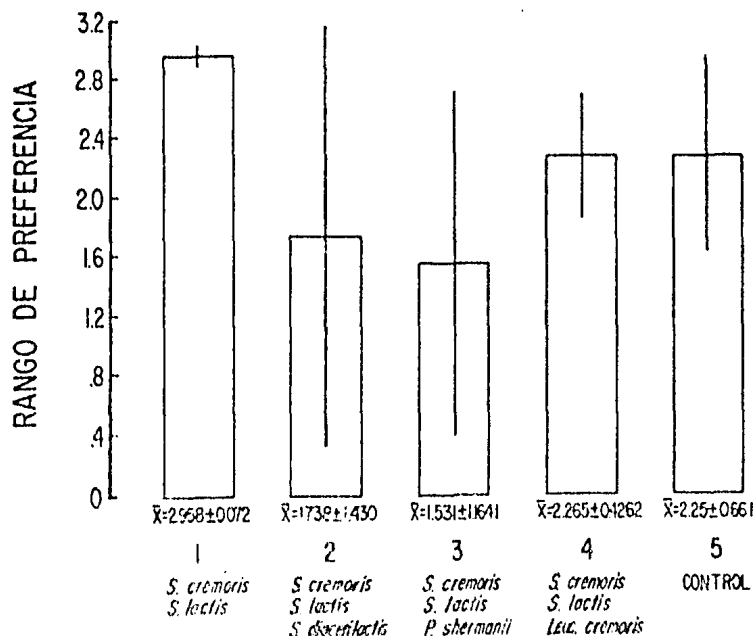
Gráfica 3.

### INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS INICIADORAS EN LA PREFERENCIA DEL OLOR DEL QUESO SEMIMADURADO



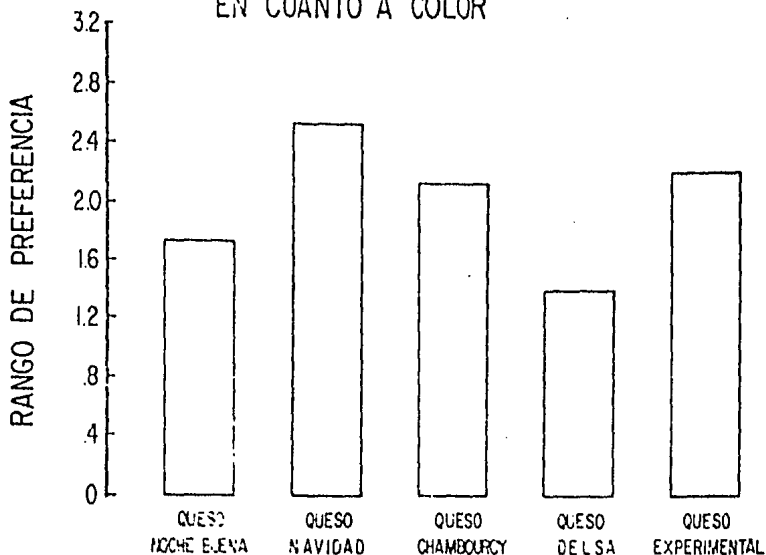
Gráfica 4

### INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS INICIADORAS EN LA PREFERENCIA DEL SABOR DEL QUESO SEMIMADURADO



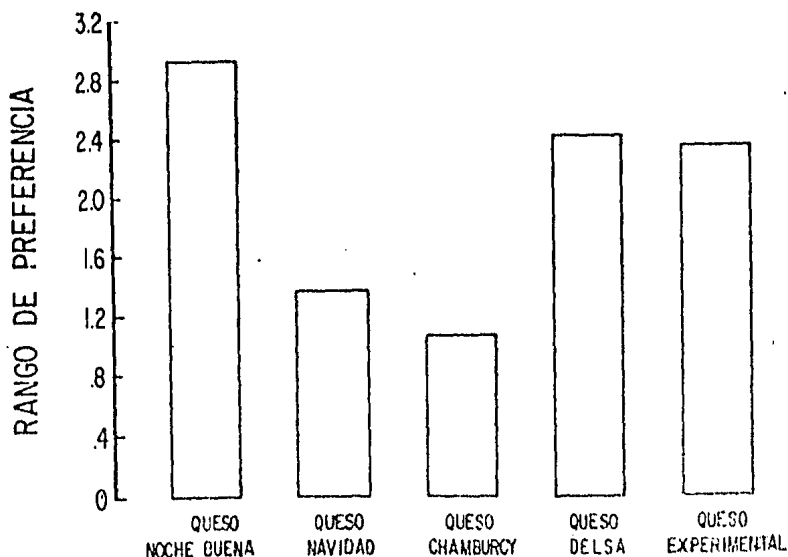
Gráfica 5

COMPARACION DE PREFERENCIA ENTRE EL QUESO SEMIMADURADO EXPERIMENTAL Y QUESOS COMERCIALES EN CUANTO A COLOR

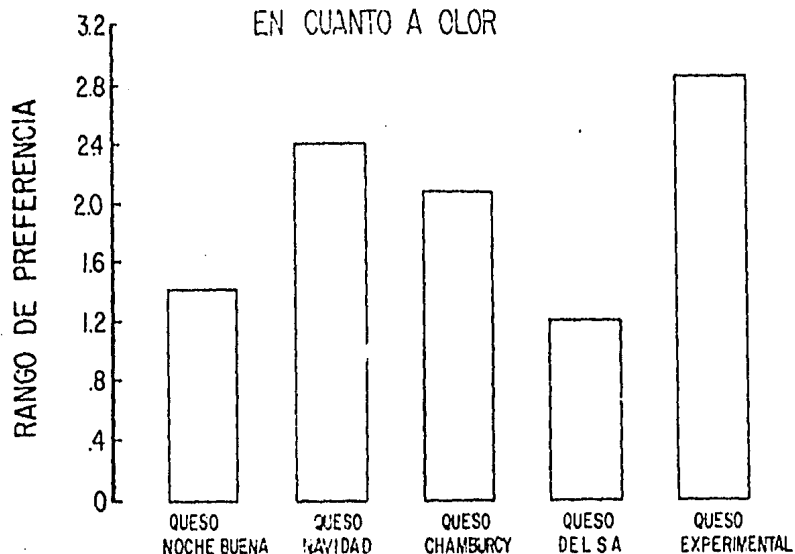


Gráfica 6

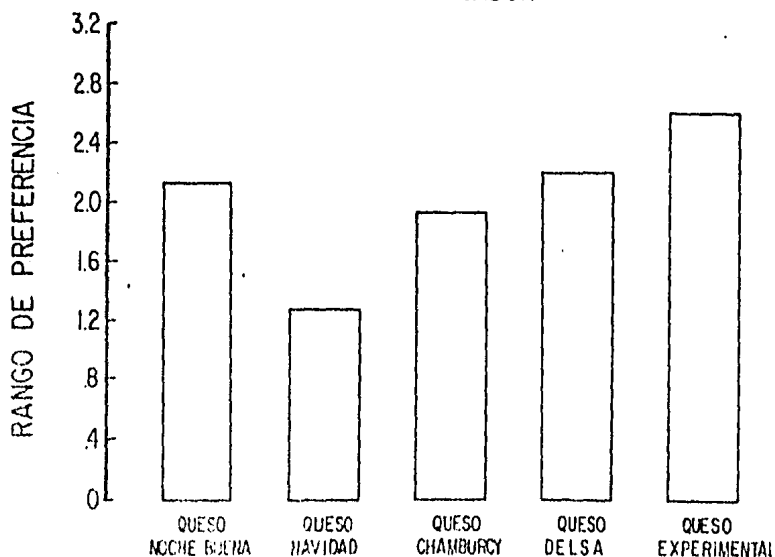
COMPARACION DE PREFERENCIA ENTRE EL QUESO SEMIMADURADO EXPERIMENTAL Y QUESOS COMERCIALES EN CUANTO A SU TEXTURA



Gráfica 7. COMPARACION DE PREFERENCIA ENTRE EL QUESO SEMIMADURADO EXPERIMENTAL Y QUESOS COMERCIALES EN CUANTO A CLOR



Gráfica 8. COMPARACION DE PREFERENCIA ENTRE EL QUESO SEMIMADURADO EXPERIMENTAL Y QUESOS COMERCIALES EN CUANTO A SABOR



## C A P I T U L O   I I I

M E T O D O S            Y            M A T E R I A L E S

## III

MÉTODOS Y MATERIALESIII.1) FABRICACION DE QUESOS.

## III.1.a) LECHE.

La leche empleada en la elaboración de los quesos se obtuvo del rancho "Ganadería Pastejé", observándose las siguientes precauciones para tratar de obtenerla con el menor grado de contaminación posible: se procedió a efectuar la ordeña manual con guantes estériles e higienizando la ubre con solución de benzal; el matraz receptor se esterilizó previamente y, una vez realizada la ordeña, se procedió a la inmediata pasteurización (pasteurización lenta: 63°C, - 30 minutos.

Al recibir en el laboratorio la leche ya pasteurizada, se guardó en refrigeración a 4°C, una vez tomada la muestra para cuenta de microorganismos totales.

## III.1.b) CUENTA DE MICROORGANISMOS TOTALES.

La cuenta de microorganismos totales se realizó siguiendo el método tradicional empleado en microbiología, con agar bacteriológico estándar.

### III.1.c) PREPARACION DE INOCULOS.

Las cepas de bacterias iniciadoras empleadas durante los experimentos se obtuvieron en forma liofilizada, con las siguientes clasificaciones:

<i>Streptococcus lactis</i>	NRRL-B- 633
<i>Streptococcus cremoris</i>	NRRL-B- 634
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	NRRL-B-2356
<i>Propionibacterium shermanii</i>	NRRL-B-4327
<i>Leuconostoc cremoris</i>	NRRL-B-3252

La nomenclatura empleada en lo sucesivo será, en el orden anterior:

- S. *lactis*
- S. *cremoris*
- S. *diacetylactis*
- P. *shermanii*
- L. *cremoris*

Cada una de las bacterias se inoculó por separado en Caldo APT, incubándose 48 horas a 29°C.



Posteriormente, las bacterias se someten a reactivación, empleándose para ésto leche descremada estéril al 11%, (La leche se esteriliza a 12°C, 10 minutos, enfriándose rápidamente a fin de evitar su caramelización.). Se inocula 1% de las bacterias y se incuban 48 horas a 29°C para su uso posterior, o 18 horas a 21°C para proceder a:

#### III.1.c.1) Determinación de Actividad. (Yang, 1979).

Uno por ciento del inóculo anterior se resiembraba en leche al 11%, pasteurizada a 63°C por 30 minutos. Se incubaba 6 horas a 30°C y, una vez transcurrido el tiempo, se saca y se enfría rápidamente en hielo picado.

Se neutraliza con NaOH 0.1 N. La actividad debe dar, para considerarse buena, entre 0.4 y 0.5 % de ácido láctico.

#### III.1.c.2) Desarrollo masivo de microorganismos iniciadores.

Una vez comprobada la buena actividad de las bacterias lácticas, se procede a sembrar 1% de los inóculos empleados en el párrafo III.1.c) en caldo APT, incubándose a 29°C durante 48 horas.

#### III.1.c.3) Cuenta individual de cultivos lácticos.

Los matraces conteniendo los microorganismos ya

desarrollados se utilizan para su cuenta en Agar APT, o -- bien en Agar Reddy, cuya formulación se reproduce en el Cuadro # 4; este último medio resulta también ser útil por la diferenciación que se obtiene en el desarrollo de tres de las bacterias empleadas, lo cual se expondrá más adelante.

Las cajas Petri sembradas, conteniendo las diferentes diluciones, se incuban 48 horas a 29°C.

#### III.1.d) PREPARACION DE MATERIAL EMPLEADO EN LA ELABORACION DE QUESOS EN MEDIO ESTERIL.

III.1.d.1) Agente coagulante: se emplea cuajo comercial (en este caso se usó "Cuamex") con una fuerza de 1/10,000. De éste se prepara una solución al 10% v/v, con agua estéril.

III.1.d.2) Colorante: se utiliza colorante Hansen's para quesos, U.S.100, y se hace una solución al 1%, la cual se esteriliza a 121°C, 10 minutos.

III.1.d.3) Solución de  $\text{CaCl}_2$  al 2%, esterilizada a 12°C, durante 10 minutos.

## CUADRO # 4

AGAR REDDY	
Preparación del medio para plaqueo:	1 litro
Triptona	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Casaminoácidos	2.5 g
L- arginina	5.0 g
$K_2HPO_4$	1.25g
Agar	15.0 g

Ajustar a p.H 6.9 con HCl 6.0 N. Antes del plaqueo se le adicionan al medio, 10 ml de leche descremada estéril (11% de sólidos) y 2.0 ml de -púrpura de bromocresol al 0.1%, también estéril, -ésto, por cada 100 ml del medio de cultivo. Se mezcla a homogeneidad.

III.1.d.4) Solución de NaCl al 1% estéril.

III.1.d.5) Solución saturada de NaCl estéril.

III.1.e) ELABORACION DE QUESOS EN MEDIO ESTERIL.

En botellas de centrífuga de 250 ml estériles se efectúan las siguientes operaciones:

- 1) En 200 ml de la leche pasteurizada, calentada a 32°C, se inoculan, directamente del medio - APT, los iniciadores lácticos en cantidad total de  $2,50 \times 10^7$  UFC\*/ml.
- 2) Se mantiene la leche a 32°C durante 90 minutos con agitación.
- 3) Adición de:
  - Colorante, solución al 1%, 0.2 ml.
  - Solución de  $\text{CaCl}_2$ , solución al 2% diluída a 15 ml en 50, 0.2 ml.
  - Renina, solución al 10%, 0.2 ml.
- 4) Mantener la temperatura a 32°C durante 30-40 minutos, hasta el cuajado de la leche.
- 5) Cortar en cubos de aproximadamente 1 cm. Agitar 15 minutos.
- 6) Desuerar 1/3 del volumen.
- 7) Cocer la cuajada, elevando la temperatura de 32 a 47°C, en 30 minutos, con agitación continua.

\* UFC = Unidades formadoras de colonias.

- 8) Al llegar a 47°C, adicionar agua con NaCl (solución al 1%). Agitar durante 5 minutos y desuerar totalmente.
- 9) Moldear por centrifugación:
  - 10 minutos a 1,000 RPM.
  - 20 minutos a 2,000 RPM y, finalmente,
  - 30 minutos a 3,000 RPM.
- 10) Secado. Se coloca el queso a 10°C durante 15 horas, con 85% de humedad relativa.
- 11) Salado: Se introduce el queso en salmuera (solución saturada de NaCl) por 45 horas a 10°C y 85% de H.R. Se decanta la salmuera y se procede a:
- 12) Lavado con agua estéril por 48 horas a 10°C y 85% de Humedad Relativa.
- 13) Maduración: 30 días a 10°C y 85% de Humedad Relativa.
- 14) Toma de muestras al 1°, 15° y 30° días de maduración.

Así pues, con la técnica anterior, se elaboraron los diferentes quesos, variando solamente en la combinación de inóculo adicionado.

Las combinaciones fueron las siguientes:

- Queso 0) Queso control, sin inóculo.
- Queso 1) Inoculado con: *S. lactis* y *S. cremoris*
- Queso 2) Inoculado con: *S. lactis*, *S. cremoris* y *S. diacetylactis*.
- Queso 3) Inoculado con: *S. lactis*, *S. cremoris* y *P. shermanii*.
- Queso 4) Inoculado con: *S. lactis*, *S. cremoris* y *L. cremoris*.

### III.2) CONTROLES DURANTE LA MADURACION.

#### III.2.a) DETERMINACION DE HUMEDAD.

Se siguió el método de secado propuesto por la A.O.A.C., pero con la siguiente modificación, a fin de evitar la pérdida de los ácidos grasos libres de bajo punto de ebullición, cuya determinación es necesaria más adelante: Se empleó estufa de vacío a 60°C, secando las muestras durante 24 horas o más, hasta peso constante.

#### III.2.b) DETERMINACION DE ACIDEZ EN QUESOS

Se utilizó el método de la A.O.A.C. para medición de acidez en quesos, teniendo precaución de conservar el queso en su medio estéril inicial al tomar las muestras, en ésta y en todas las otras determinaciones.

#### III.2.c) CUENTA DIFERENCIAL DE MICROORGANISMOS INICIADORES EN CADA UNO DE LOS QUESOS EXPERIMENTALES.

Aprovechando la diferenciación presentada en agar Reddy para el desarrollo de colonias de *S. cremoris*, *S. lactis* y *S. diacetylactis*, se empleó este medio para poder contar individualmente los microorganismos antes citados, contenidos en los quesos correspondientes.

En este agar, *S. lactis* presenta crecimiento en colonias que reducen el medio, cambiando el color del indicador, pero no degrada la Arginina, lo que se manifestaría en la formación

de un halo circundando las colonias.

Las colonias de *S. cremoris* no reducen el medio, pero sí forman halo y, por último, *S. diacetylactis* presenta crecimiento con reducción del medio y con formación de halo.

Para la cuenta de *P. shermanii* y de *L. cremoris*, fue necesario realizar otras pruebas de diferenciación, lográndose los mejores resultados con tetraciclina incorporada al APT - agar, siendo la concentración de la tetraciclina de  $0.2 \mu\text{g/ml}$ .

La tetraciclina inhibió el desarrollo de los estreptococos, a las 24 horas de incubación para los quesos con *P. shermanii*, y a las 48 horas para los que contenían *L. cremoris*, - ambas pruebas a  $29^{\circ}\text{C}$ .

### III.3) DETERMINACION DEL GRADO DE PROTEOLISIS SUFRIDA EN LOS QUESOS.

III.3.a) PROTEINA TOTAL. Se empleó el método del Indofenol, reportado por el A.O.A.C.

III.3.b) DETERMINACION DE PROTEINA SOLUBLE A p.H 4.6 .  
(O'Keefe, 1976).

Veinte gramos de queso se homogenizan en 40 ml de agua destilada. La mezcla se calienta a  $42^{\circ}\text{C}$  por una hora. Se centrifuga a 3,000 RPM, durante 15 minutos.

Se filtra a través de fibra de vidrio para extraer la grasa. El filtrado se ajusta a p.H 9 con NaOH 2 N y se deja una hora a  $30^{\circ}\text{C}$  para inactivar la renina.

Se ajusta el p.H a 4.6 con HCl y se elimina el precipitado por centrifugación a 11,000 RPM por 90 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se vuelve a filtrar a través de fibra de vidrio

y posteriormente con papel filtro del N° 1. Las porciones con teniendo nitrógeno de los filtrados se guardan liofilizadas.

### III.3.c) FILTRACION EN GEL. (O'Keeffe, 1976).

240 mg del residuo liofilizado (proteína soluble p.H 4.6) se disuelven en 10 ml de solución 0.1 M de piri- dina, ajustado a p.H 5.1 con solución 0.1 M de ac. acético.

Se fracciona en una columna de Sephadex G. 50 de 70x2.5 cm, con un flújo de aproximadamente 50 ml/h.

La proteína contenida en las fracciones se estima por absorbancia a 280 nm.

### III.4) DETERMINACION DEL GRADO DE LIPOLISIS.

#### III.4.a) EXTRACCION DE LA GRASA DE LOS QUESOS.

Los quesos empleados para la determinación de humedad, ya secos, son los que se someten a extracción de grasa cruda por el método de Soxhlet (A.O.A.C.).

Una vez determinada la grasa total de los quesos se deja solidificar y se guarda a bajas temperaturas para posteriormente usarse en la determinación cromatográfica de ácidos grasos libres.

El residuo no graso también se usa para la determinación cromatográfica de los ácidos grasos volátiles solubles en agua, guardándose en desecador c/u de las muestras.



III.4.b) DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA DE GASES DE LOS  
ACIDOS GRASOS LIBRES CONTENIDOS EN LA FRACCION GRASA  
DE LOS QUESOS EXPERIMENTALES. (Salinitro, 1976).

III.4.b.1) Butilación de las grasas.

Se preparan soluciones estándares de los diferentes ácidos grasos, conteniendo 40  $\mu$ mol/ml. Se ajusta el p.H a 9-10 con NaOH 10N.

Se coloca 1 ml de las muestras individuales y de una mezcla de ácidos, en tubos de cultivo ( 13 x 100 mm) y se seca a 60°C, hasta total evaporación del agua.

A las sales secas de los ácidos se les adiciona 0.8 ml de cloroformo, 0.2 ml de butanol y 0.05 ml de ácido sulfúrico. Se mezclan bien los tubos bien sellados y la mezcla se calienta a 50°C por 2 horas. Los tubos se enfrían a temperatura ambiente y se les adiciona 0.2 ml de TCA al 10%. - Se mezcla y se deja reaccionar por 1 hora.

Posteriormente se lavan las muestras 2 veces con alcuotas de 1 ml de agua destilada para extraer el exceso de TCA. La capa acuosa se extrae; la capa clorofórmica, ajustada a 1 ml ( conteniendo los ésteres butíricos) se coloca en tubos - viales de 1 ml con sellos de teflón. Se inyectan 2,4,6, 8, 10  $\mu$ l de muestra.

Grasas de los quesos :

Se pesa aproximadamente 0.5 g de grasa. Se disuelve en 12 ml de hexano y se extrae 2 veces con una solución de carbonato de sodio al 2 %. El extracto acuoso conteniendo las sales de los ácidos grasos libres se seca a 60°C. Posteriormente se trabaja igual que los estándares.

III.4.b.2) Determinación por cromatografía de gases de las muestras y estándares butilados.

Aparato: Varian 3700 con graficador 9176

Columna: columna de vidrio empacada con Cromosob W 80/100 de malla DMCS, AW, cubierta con 10% de Dexsil 300 GC.

Condiciones del aparato:

Columna: La columna se acondiciona durante 24 horas antes de su uso, llevándola a una temperatura de 250°C, bajo flujo de nitrógeno.

Detector: 270° C.

Flujo de H<sub>2</sub> : 54 ml/min

Flujo de aire: 260 ml/min

Flujo de N<sub>2</sub>: 30 ml/min

Velocidad del papel en el graficador: 0.25 cm/min

Temperatura inicial de la columna: 50°C durante 3 minutos

Sensibilidad: 10<sup>-9</sup> amp/volt.

Tiempo total de separación e integración de cada muestra: 24 min

Aumento de temperatura: 10°C/min.

Temperatura final: 250°C, sin detenerse al alcanzarla.

Temperatura del inyector: 230°C.

Se inyectó 1  $\mu$ l de los estándares y de la mezcla de ácidos butilados, para posteriormente proceder a la inyección de las muestras problema, también ya como ésteres butilados.

Calibración: se utiliza ácido heptanóico como estándar interno, adicionando cantidades conocidas a los estándares y a las muestras de quesos, antes de secar y de butilar.

III.4.c) DETERMINACION POR CROMATOGRAFIA DE GASES DE  
 ACIDOS GRASOS VOLATILES ( acético, propiónico  
 y butírico) EN LA FRACCION SOLUBLE EN AGUA DE  
 LOS QUESOS EXPERIMENTALES (AGV's). (A.O.A.C.)

Se pesan aproximadamente 0.5 g de la muestra de queso seco y desgrasado y se suspenden en 5 ml de agua para cromatografía (grado HPLC: High Performance Liquid Chromatography), en un tubo de centrífuga de 15 ml. A cada muestra se le adiciona 1 ml de solución 3:1 de ácido meta u orto fosfórico al 25% y de solución de ácido fórmico al 25%.

Se centrifuga esta mezcla por 30 minutos a 2,000 RPM para obtener un líquido libre de sólidos, el cual se inyecta directamente al cromatógrafo. ( 1 a 5  $\mu$ l ).

Mezcla estándar: se prepara una mezcla apropiada de -- los tres ácidos grasos volátiles más importantes, en la siguiente proporción:

ácido acético: 0.2670 g  
 ácido propiónico: 0.1300 g  
 ácido butírico: 0.0757 g

Se disuelven los tres en agua para cromatografía y se afora a 50 ml. De esta solución se inyectan 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu$ l para obtener una curva estándar de c/u de ellos.

Condiciones del aparato:

Aparato: Varian 3700 con graficador 9176  
 Columna: Acero inoxidable de 6' x 1/8", llenada con Cromosob W DMCS.60/80 de malla, 20% de Tween 80 - y 2% de ácido fosfórico.

Detector: 200°C.

Columna: 100°C.

Flujo de N<sub>2</sub>: 30 ml/min.

Flujo de aire: 200 ml/min.

Flujo de H<sub>2</sub>: 20 ml/min.

Velocidad del papel en el graficador: 0.5 cm/min.

Sensibilidad 10<sup>-10</sup> amp/volt.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

---

## IV

RESULTADOS Y DISCUSIONIV.a) LECHE

Los diferentes lotes de leche empleados en la elaboración de los quesos a ser analizados para los consiguientes estudios, resultaron tener la calidad bacteriológica esperada, al haber realizado la ordeña lo más higiénicamente posible y procediendo a la inmediata pasteurización de la leche. Una vez efectuado lo anterior, la leche se mantuvo durante 3 a 4 semanas en refrigeración presentando, durante todo este período, poblaciones de 100 a 1,000 microorganismos por mililitro.

No se efectuaron otras pruebas de calidad sobre la leche más que la medición del grado de acidez inicial, el cual se expone más adelante, conjuntamente con la acidez de los quesos.

IV.b) QUESOS.

## IV.b.1) DETERMINACION DE HUMEDAD EN LOS DIFERENTES QUESOS.

El Cuadro # 5 muestra los resultados del contenido de humedad de los diferentes quesos y en los diferentes períodos de maduración.

CUADRO # 5

CONTENIDO DE HUMEDAD (%) DE LOS QUESOS EXPERIMENTALES  
EN LOS TRES PERIODOS DE MADURACION

TIEMPO	Queso 0 Control	Queso 1 S.c,S.1	Queso 2 S.c,S.1,S.d	Queso 3 S.c,S.1,P.sh	Queso 4 S.c,S.1,L.c
1 <sup>er</sup> día	1- 49.5	1- 48.22	1-50.25	1- 48.5	1- 47.3
	2- 48.17	2- 52.83	2-52.98	2- 48.93	2- 49.25
15° día	1- 43.87	1- 41.5	1-43.69	1- 41.42	1- 39.6
	2- 42.69	2- 42.26	2-46.3	2- 42.49	2- 42.93
30° día	1- 43.49	1- 40.69	1-41.14	1- 41.27	1- 38.7
	2- 41.8	2- 45.17	2-43.7	2- 41.3	2- 42.11
Humedad promedio a los 30 días de maduración	42.64	42.93	42.42	41.28	40.4

Como puede observarse, hay tendencia al desuerado o pérdida de humedad conforme transcurre el tiempo de maduración; las mayores pérdidas de humedad se presentaron durante los primeros 15 días de maduración, siendo mínimas los 15 días restantes.

Las cantidades que aparecen en el cuadro corresponden a los promedios de la doble determinación en cada queso, habiéndose elaborado dos quesos de cada determinación.

En el Cuadro # 6 aparecen los contenidos de humedad de algunos quesos comerciales. Observando los datos de esta tabla y comparando el porcentaje de humedad promedio de -- los quesos experimentales (Cuadro # 5), al finalizar el -- periodo de maduración, vemos que todos entran dentro de los contenidos de humedad característicos de quesos semimadurados como es el caso del manchego, siendo sólo el queso 4, elaborado con la combinación S.cremoris, S.lactis y L.cremoris, el que presenta una humedad ligeramente menor, más similar al queso Chihuahua que a los manchegos.

#### IV.b.2) DETERMINACION DEL GRADO DE ACIDEZ EN LOS QUESOS Y EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL PROCESO DE ELABORACION.

Las gráficas 9,10,11 y 12, muestran el desarrollo de la acidez en los quesos experimentales, habiéndose corrido un control (queso sin inóculo) para cada determinación.

Como resultados generales encontramos:

- a) Todos los quesos conteniendo inóculo de bacterias lácticas presentan una acidez mayor que la desarrollada en el queso control.



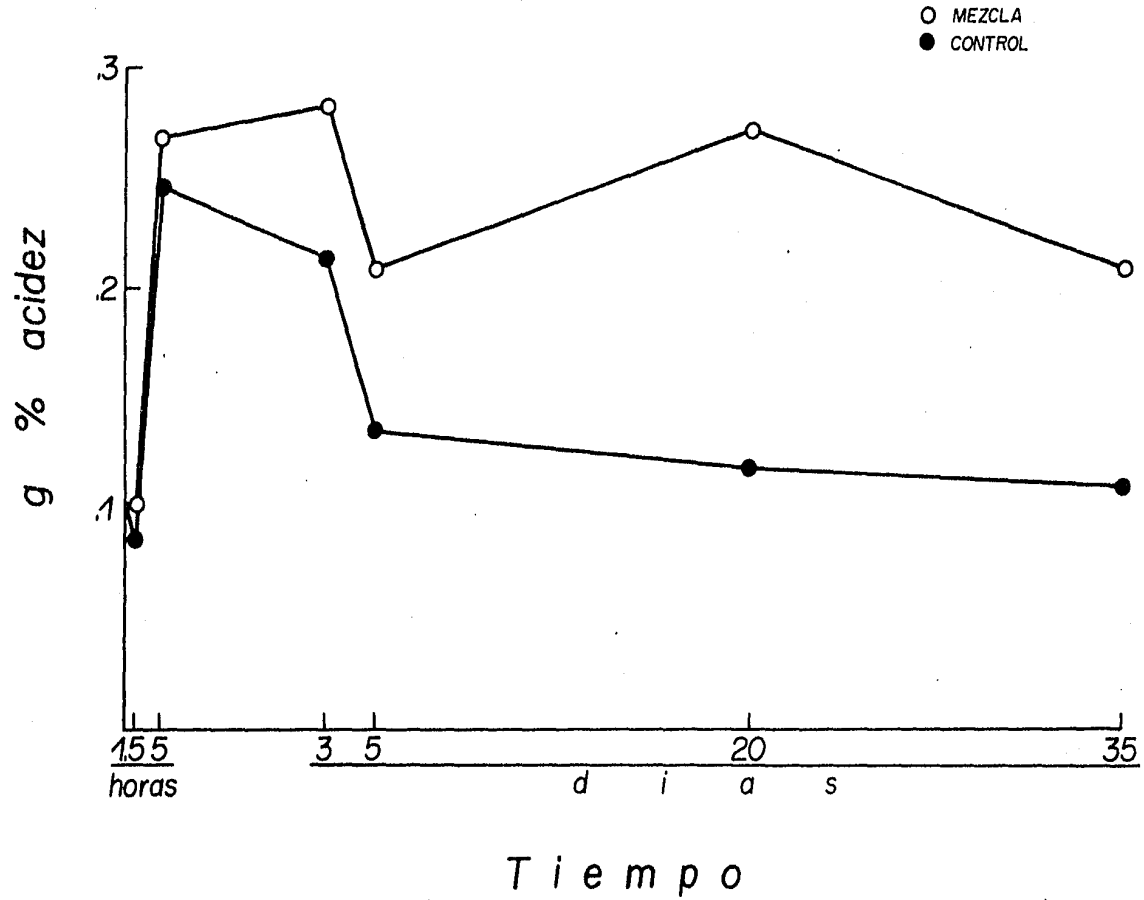
C U A D R O # 6

CONTENIDO DE HUMEDAD DE QUESOS COMERCIALES DE  
TIPO SEMIMADURADO

QUESO (marca comercial)	TIPO	% HUMEDAD
Holstein	Manchego	43
Chambourcy	Manchego	41
Sauz	Manchego	43
Noche Buena	Manchego	43
Delsa	Manchego	43
Los Volcanes	Manchego	42
Alpura	Manchego	43
Chambourcy	Chihuahua	40.7
La Risueña	Chihuahua	42.0
Delsa	EJam	45.0

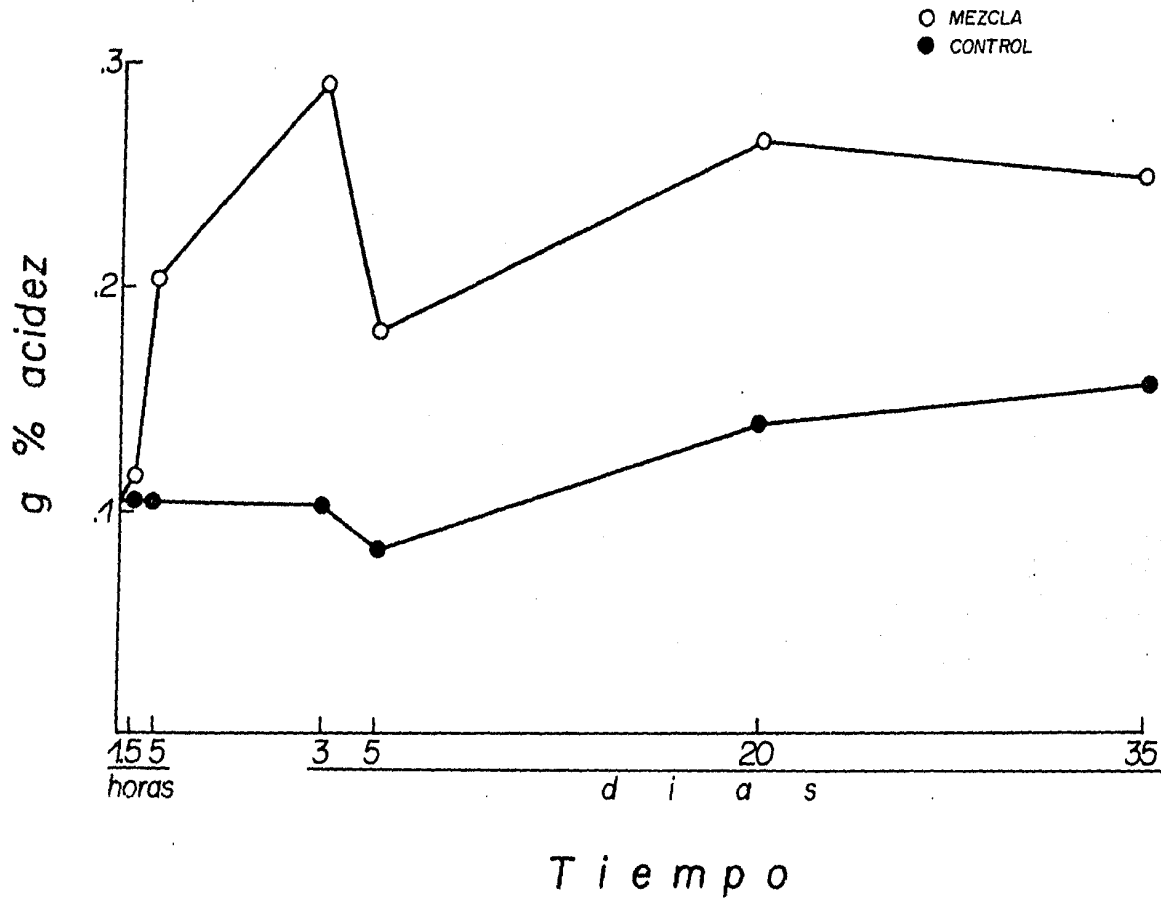
Fuente: estudio directo de mercado, 1985.

GRAMOS PORCIENTO DE ACIDO LÁCTICO EN LA MEZCLA S.CREMORIS Y S.LACTIS.

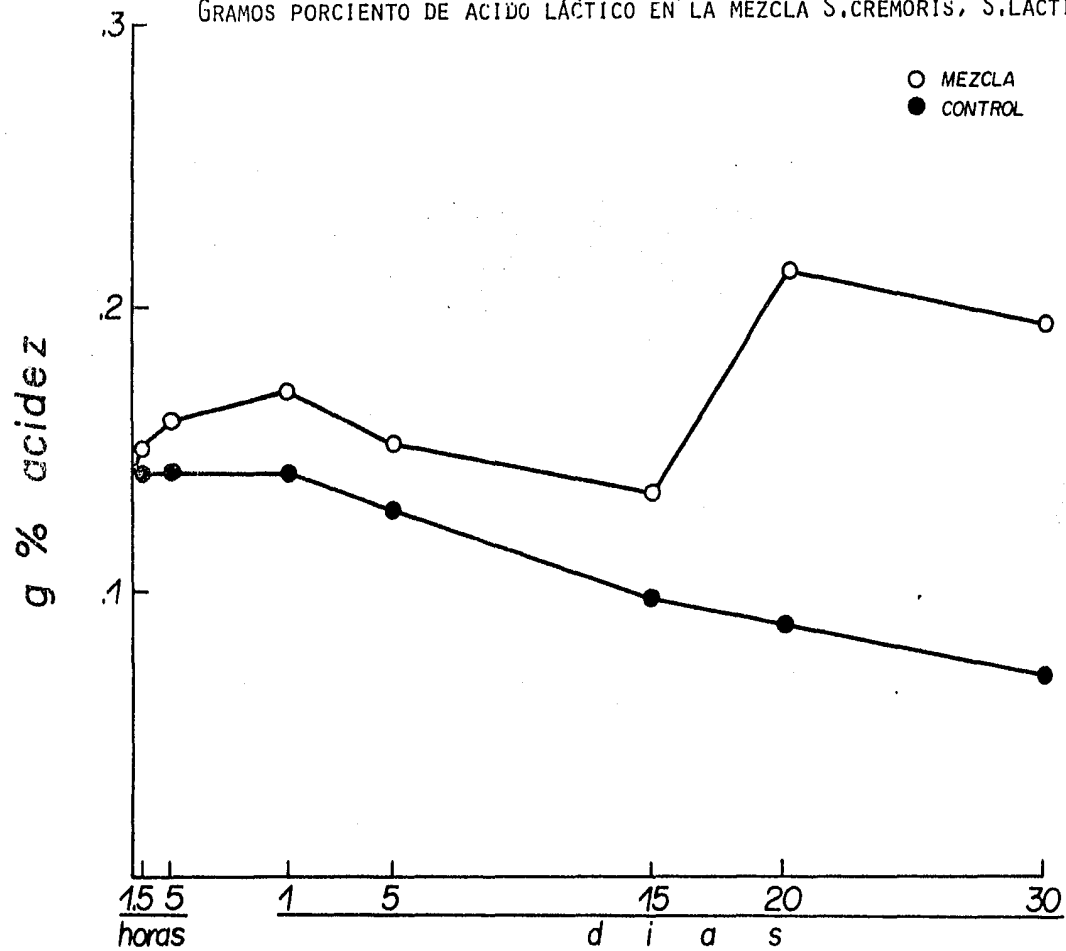


GRAFICA # 10

GRAMOS POR CIENTO DE ACIDO LÁCTICO EN LA MEZCLA S.CREMORIS, S.LACTIS Y S.DIACETILACTIS.

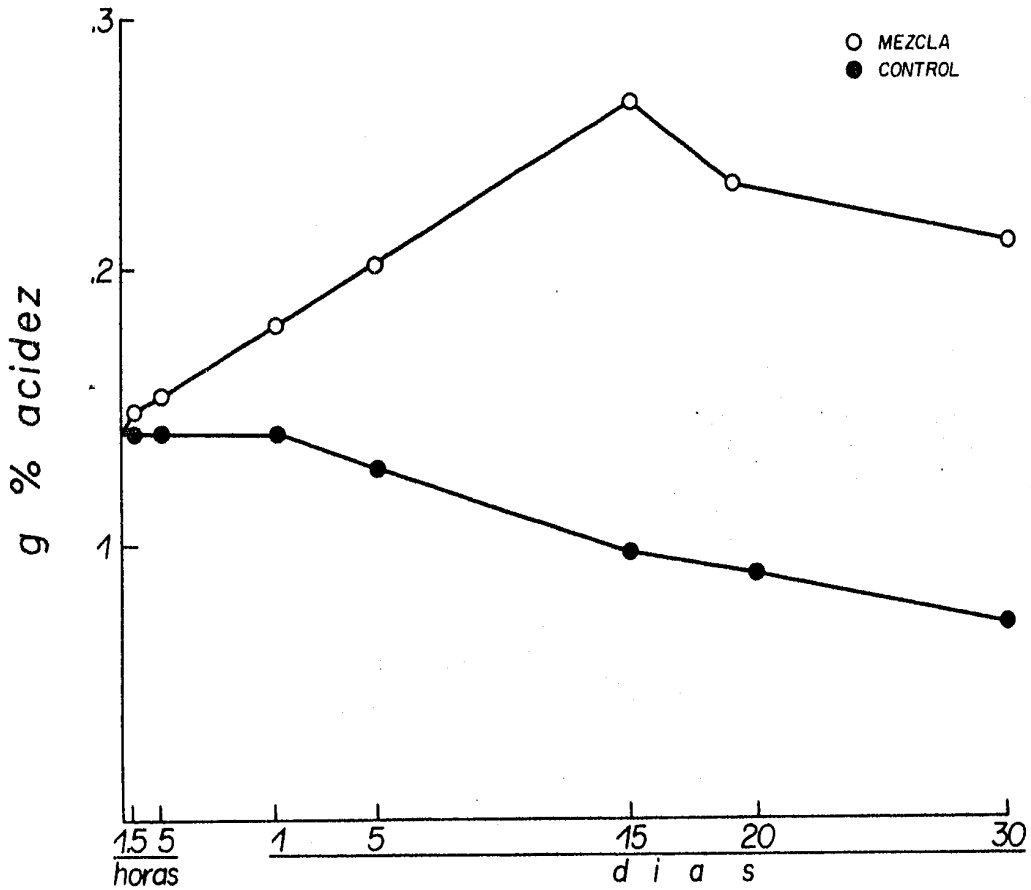


GRAMOS POR CIENTO DE ACIDO LÁCTICO EN LA MEZCLA S.CREMORIS; S.LACTIS Y P.SHERMANII.



T i e m p o

GRAMOS PORCIENTO DE ACIDO LÁCTICO EN LA MEZCLA S.CREMORIS;S.LACTIS Y L.CREMORIS.



T i e m p o

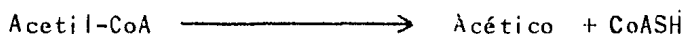
- b) La acidez inicial de la leche empleada para elaborar los quesos entra dentro de los límites esperados para una leche de buena calidad (menos de 0.18% de acidez).
- c) La mayor acidez desarrollada corresponde al queso 2 -- (S.c,S.l,S.d) con 0.29% de ácido láctico a los tres -- días de maduración. Le sigue el queso 1 (S.c,S.l) con 0.28% a los tres días de maduración, quedando después \_ el queso 4 con 0.26% a los 15 días (S.c,S.l,L.c) y, final\_ mente, el queso 3 (S.c,S.l,P.sh) con 0.21% a los 20 días de maduración.

Este último punto difiere de lo encontrado por J. Reynoso (J. Reynoso, 1981), ya que en dicho trabajo se encontró que la mezcla S.c,S.l,P.shermanii producía menos acidez que S.c,S.l,S.d, pero más que las otras dos mezclas. Lo anterior puede deberse a una pérdida en la actividad del microorganismo propiónico pues para su desarrollo no se empleó un medio de cultivo adicionado de lactato, extracto de levadura y/o hidrolizados de proteína, lo anterior citado en las referencias siguientes: Hagaraw, 1957; J. Harper, 1957 y J. Slatter, 1957 y 1954, relativas al aumento en la actividad de las bacterias propiónicas por adij ción de dichos compuestos en su medio de cultivo, lo cual sí se efectuó en el trabajo de Reynoso.

Lo que también cabe considerar para explicar la variación , es que la leche empleada en el estudio de J. Reynoso no era de la misma calidad microbiológica de la del presente trabajo.

La hiperproducción de ácido en la mezcla S.c, S.l,S.d, se debe, en su mayor parte, a las dos primeras bacterias, las cuales producen ácido láctico por el mecanismo antes

señalado ( Figura # 1 ). En lo referente a *S. diacetylactis*, el piruvato entra al ciclo de Krebs, donde se transforma en Acetil-CoA, la cual surge la siguiente reacción:



Según estudios (Collins, 1970), el *Streptococcus diacetylactis* es capaz de producir acetato a partir del 73% de piruvato disponible; por tanto, el *S. diacetylactis* del queso 2 bien pudo producir ácido acético como también láctico, como bacteria láctica que es, empleando para esto la vía glicolítica. Otros estudios realizados en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biotecnología (P.P. Gavián, no publicado) de la U.N.A.M., señalan que *S. diacetylactis* hiperproduce por sí solo ácido láctico, en comparación con *S. cremoris* y *S. lactis*. Desde luego que en el presente caso, la diferencia no resulta ser tan drástica como para referirnos a una hiperproducción, pero no deja de observarse una mayor actividad por parte de la mezcla conteniendo *S. diacetylactis*, para producir acidez.

Estudios de sinergismo en la mezcla *S. cremoris*, *S. lactis* y *S. diacetylactis* (Babel, 1977) sugieren que este fenómeno puede existir, aumentando la actividad comparada con las cepas estudiadas individualmente.

- d) Es muy probable que los aumentos y las caídas en los valores de acidez estén altamente afectados por la capacidad de sinéresis o de retención de suero de los diferentes quesos, ya que la lactosa se encuentra principalmente en el suero y al ser retenido en el queso se favorece su fermentación, aumentando la acidez y, por el con-

trario, el desuerado disminuye los valores de acidez.

En el Cuadro # 7 se exponen los diferentes grados de acidez contenidos en algunos quesos comerciales semimadurados y la de un queso tipo suizo, considerado como madurado. Observando el cuadro vemos que la acidez de un queso madurado como es el caso del suizo, es considerablemente mayor que la de los quesos semimadurados. La del queso Cheddar también es mayor que la de los quesos experimentales, por lo que la acidez más comparable resulta ser la de los quesos tipo manchego. De lo anterior se desprende una similitud más del queso experimental con el manchego: similar contenido de humedad y similar grado de acidez.

#### IV.b.3) VARIACION DEL NUMERO DE MICROORGANISMOS EN LOS QUESOS EXPERIMENTALES EN LOS DIFERENTES PERIODOS DE MADURACION.

En las gráficas 13, 14, 15 y 16 pueden observarse las siguientes características comunes, resultantes de la variación del número de microorganismos en los cuatro quesos experimentales conteniendo el inóculo de iniciadores.

- a) Transcurridas 5 horas de iniciada la elaboración de los quesos se presenta un aumento del número de microorganismos contenidos en todos los quesos, debido a la concentración de bacterias que se tienen al desuerar la cuajada.



CUADRO # 7

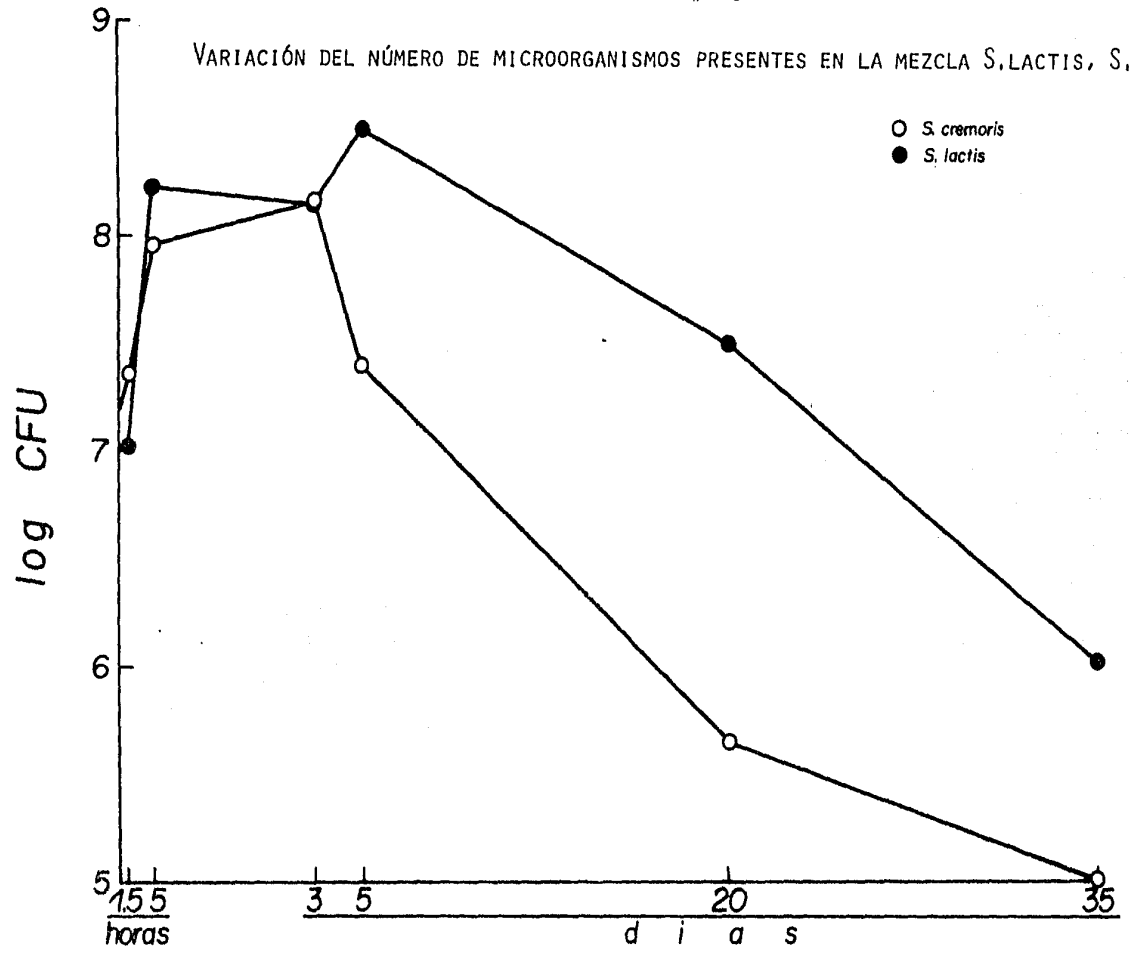
## GRADO DE ACIDEZ DE ALGUNOS QUESOS COMERCIALES

Queso	Acidez *
Cheddar	0.52 <sup>1</sup>
Suizo	7.44 <sup>2</sup>
Manchego Chambourcy	0.326
Manchego Noche buena	0.344
Manchego La Risueña	0.3

\* ( % de ácido láctico)

Fuentes: <sup>1</sup> Wong, 1977; <sup>2</sup> Marcos, 1981; Estudio experimental directo.

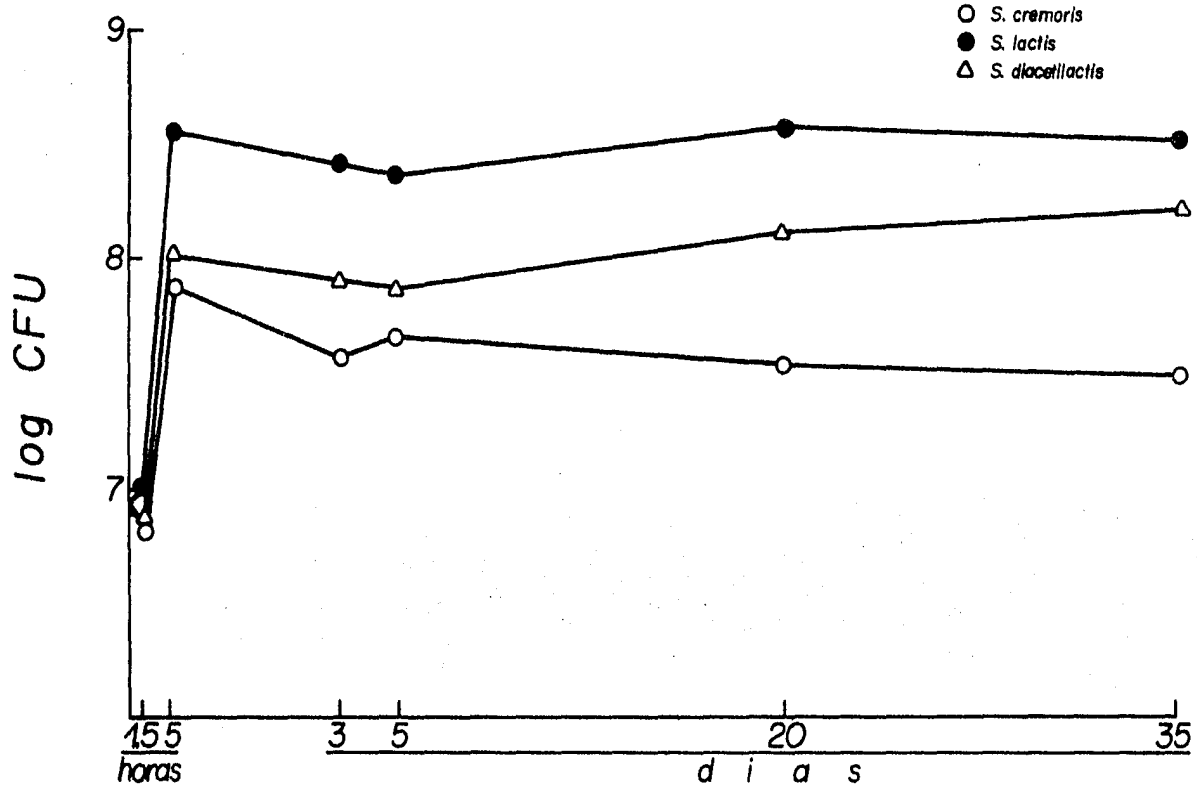
VARIACIÓN DEL NÚMERO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA MEZCLA S.LACTIS, S.CREMORIS.



T i e m p o

GRAFICA # 14

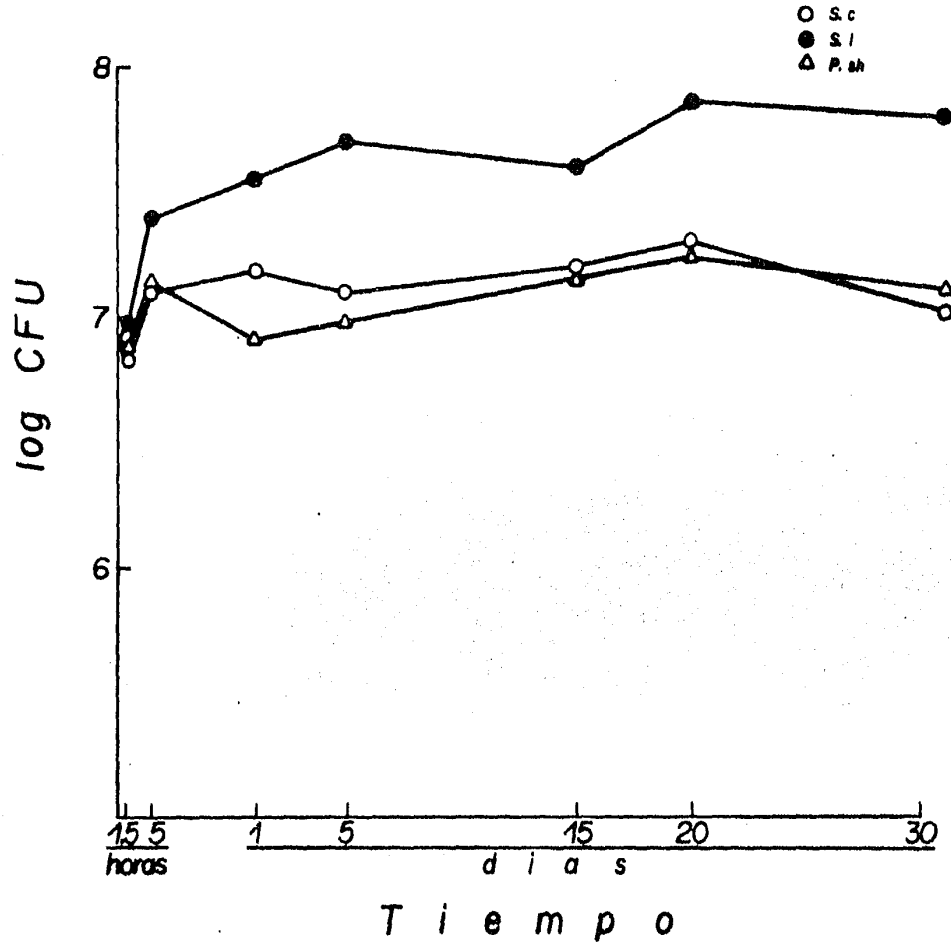
VARIACIÓN DEL NÚMERO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA MEZCLA *S. CREMORIS*,  
*S. LACTIS* Y *S. DIACETILACTIS*.



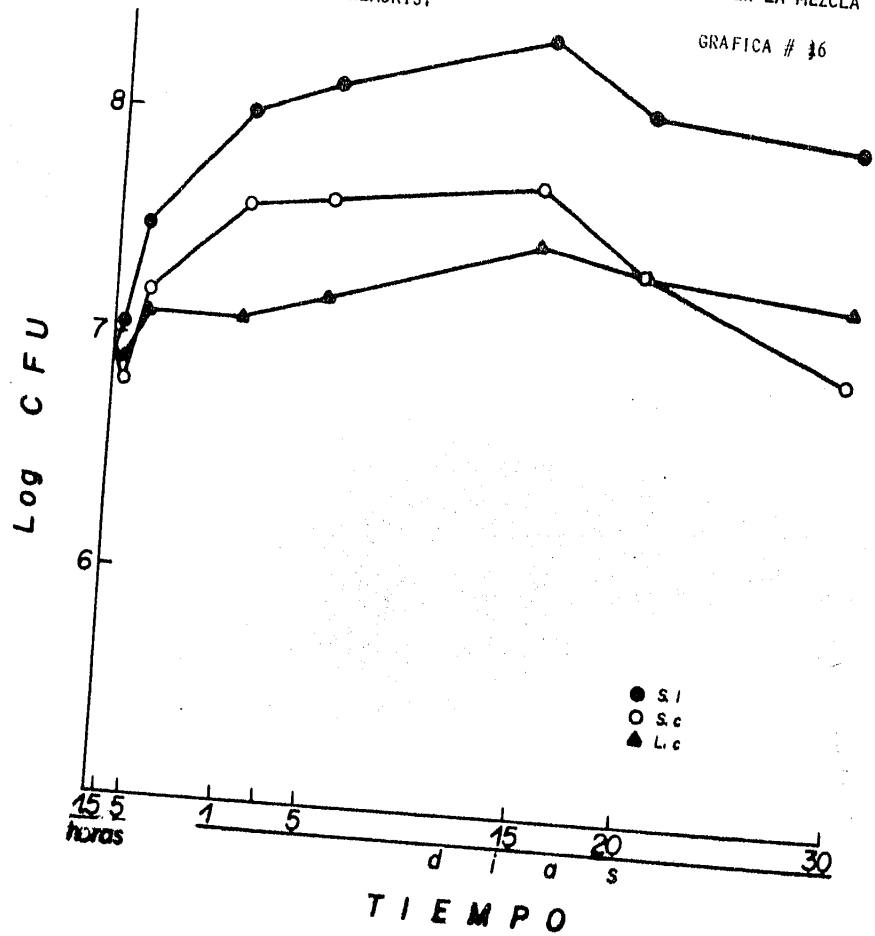
T i e m p o

GRAFICA # 15

VARIACIÓN DEL NÚMERO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA MEZCLA S.CREMORIS,  
S.LACTIS Y P.SHERMANII.



VARIACIÓN DEL NÚMERO DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA MEZCLA *S. CREMORIS*,  
*S. LACTIS* Y *L. CREMORIS*,



Además de la concentración de microorganismos debe -- considerarse parte del aumento debido al desarrollo que presentan los microorganismos lácticos al estar en un medio de cultivo muy favorable y a una temperatura de crecimiento óptima.

- b) Los quesos conteniendo 3 microorganismos en la mezcla inoculada presentan un cierto grado de estabilidad poblacional, a diferencia de la mezcla S.c, S.l, cuya respuesta al 5º día de maduración es una disminución de la población, la cual continúa hasta los 30 días analizados.
- c) De las mismas gráficas puede observarse que el microorganismo más sensible al paso del tiempo y a sus consecuentes efectos es *S. cremoris*, mientras que el más resistente resulta ser *S. lactis*.
- d) Las variaciones del número de microorganismos estudiadas resultan ser poco comparables con las de otros quesos reportados, como es el caso de Yanai (Yanai, 1977), donde se elaboró un queso inoculado con *S. lactis*, en una proporción de  $1.6 \times 10^5$  y con poblaciones finales de  $1.58 \times 10^7$  después de 30 días de maduración. El aumento de población, como en el caso anterior, también se presenta en los quesos experimentales, a excepción del queso 1 (*S.c, S.l*), donde la población final es menor que la inicial. Tanto en el queso desarrollado por Yanai como en muchos otros reportados, no se hace referencia a mezclas o, más explícitamente, a la interacción de diferentes poblaciones de bacterias, lo que definitivamente repercute en una variación de cualesquiera de los resultados analizados.

Los estudios sobre quesos de un tipo específico no

hacen referencia alguna a la clase de inóculos que se usan, lo que también hace imposible la comparación con los quesos en estudio. Y, finalmente, los estudios de los microorganismos y su desarrollo en específico, bajo determinado parámetro, se han efectuado en otros medios de cultivo diferentes al queso, lo que invalida también toda comparación.

#### IV.b.4) DETERMINACION DEL GRADO DE PROTEOLISIS.

##### IV.b.4.1) Resultados de las determinaciones de proteína soluble a p.H 4.6 y de proteína total.

En el Cuadro # 8 aparecen los resultados de las determinaciones de nitrógeno total y de nitrógeno soluble, practicadas en los cinco quesos experimentales, así como el coeficiente Ns/Nt (Nitrógeno soluble/Nitrógeno total).

De este cuadro podemos deducir lo siguiente:

- 1.- A mayor coeficiente Ns/Nt, mayor será la proteólisis presentada por los quesos; el grado de solubilización de la proteína está determinado por la cantidad que aparece de nitrógeno soluble.

El mayor coeficiente Ns/Nt encontrado corresponde al Queso 3, con la mezcla inoculada de *S.cremoris*, *S.lactis* y *P.shermanii*, transcurridos los treinta días de maduración.

Contrariamente al comportamiento lento en cuanto al desarrollo de acidez, el Queso 3 presenta una actividad proteolítica considerable, lo cual puede deberse a la mezcla de microorganismos o solamente a la bacteria propiónica, altamente proteolítica.



C U A D R O # 8

RESULTADOS\*DEL CONTENIDO DE NITROGENO SOLUBLE Y NITROGENO TOTAL DE LOS  
5 QUESOS EXPERIMENTALES, EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACION.

QUESO	1 <sup>er</sup> dfa			15 dfa			30 dfa		
	Nt	Ns	Ns/Nt	Nt	Ns	Ns/Nt	Nt	Ns	Ns/Nt
0.- Control	38.5	0.335	0.872	35.3	1.48	4.2	33.7	0.72	2.132
1.- S.c, S.l	37.08	0.40	1.0799	34.2	2.20	6.72	27.0	3.30	12.24
2.- S.c,S.l, S.d.	27.3	0.28	1.0343	25.4	1.32	5.189	18.1	1.34	7.37
3.- S.c,S.l, P.sh	24.2	2.96	12.24	16.4	3.41	20.8	12.5	3.48	27.9
4.- S.c,S.l, L.c.	38.0	0.69	1.82	28.0	1.22	4.35	25.1	1.96	7.8

\* Los resultados son todos en porciento (base seca).

- 2.- Se presentó una variación en los valores detectados de nitrógeno soluble y de nitrógeno total, conforme transcurrió el tiempo de maduración, en todos los quesos, y de acuerdo con la proteólisis que fueron experimentando.
- 3.- El coeficiente menor ( $N_s/N_t$ ) corresponde, en los tres períodos de maduración, al queso control.
- 4.- La explicación de la diferencia significativa de proteína total en los quesos se centra en las -- pérdidas de proteína soluble que se presentan en el transcurso de la maduración.

Los siguientes análisis de los patrones cromatográficos de Nitrógeno soluble a p.H 4.6 en los diferentes períodos de maduración y en los diferentes quesos, nos darán una idea más clara de los puntos anteriores:

IV.b.4.2) Resultados de la cromatografía en columna para determinar las fracciones de nitrógeno soluble a p.H 4.6, de los quesos experimentales y en los diferentes períodos de maduración.

Antes de proceder al análisis de los resultados, se analizarán las fracciones protéicas que pueden encontrarse

en la determinación de nitrógeno soluble:

De acuerdo con la técnica empleada para la extracción de proteína soluble a p.H 4.6 (O'Keeffe, 1976), partiendo de quesos, tendremos la probabilidad de encontrar las siguientes proteínas en el sobrenadante analizado o bien, fracciones menores de éstas:

- a) Los fragmentos de  $\kappa$ -caseína que conforman la para- $\kappa$ caseína y fragmentos menores derivados de ésta última.
- b) Los fragmentos de  $\kappa$ -caseína que conforman un macropéptido presente aún en el suero residual y fragmentos menores que hayan sufrido proteólisis.
- c) Los fragmentos derivados de alfa y beta - caseínas, si llegan a ser solubles.
- d) Parte de las proteínas solubles (proteosomas peptonas, -albúminas y/o globulinas) que aún se encontraban en el suero del queso, las cuales continuarán siendo solubles al acidificar a p.H 4.6.
- e) Fracciones no protéicas presentes en el suero residual.

Por tanto, las únicas que desaparecerán serán las caseínas íntegras, las cuales precipitarán a p.H 4.6 y que son eliminadas por centrifugación antes de proceder a la filtración en gel.

Si consideramos que el porcentaje en leche de proteína soluble es de 17 % y disminuye en los quesos, mientras que el de caseínas es de 78% en leche y aún más alto al -

concentrar las caseínas en los quesos, es de esperarse en contrar tan solo trazas de proteínas solubles, pues éstas están presentes sólo en el suero residual del queso, con lo que el porcentaje de 17% de proteínas solubles en leche se reducirá considerablemente.

Por otro lado, considerando el tamaño de partícula que el Sephadex G.50 permite pasar, encontramos que dicho gel permitirá el paso de moléculas o compuestos con pesos moleculares que van de 30,000 a 1,500 gramos/mol.

La  $\kappa$ -caseína al ser hidrolizada por la renina en su enlace 105-106 de Fenil-alanina—Metionina, produce dos fracciones, una soluble y otra insoluble. La insoluble, denominada para- $\kappa$ caseína y que es de hecho la que principalmente conforma la estructura de gel de los quesos, tiene un peso molecular de 12,270 y se compone de 105 residuos de aminoácidos.

El macropéptido o parte soluble de la  $\kappa$ -caseína, se elimina en el desuerado, pero como parte del suero queda en el queso, es posible encontrar este fragmento con un peso molecular de 6,800 con 64 residuos, sin contar la parte de carbohidratos que incluye esta fracción.

Las fracciones derivadas de las alfa y beta caseínas hidrolizadas presentarán pesos moleculares menores a 23,613 y 23,980, respectivamente.

Los aminoácidos libres y la urea, así como otros compuestos de peso molecular menor a los 1,500 g/mol, no serán detectables en Sephadex G.50.

Del mismo modo, las proteínas solubles con pesos moleculares mayores a 30,000, como es el caso de la seroalbúmina, con 66,300 de P.M. y de la proteosa peptona<sub>3</sub>, con --- 40,800 g/mol, tampoco serán detectadas en G.50.

Por tanto, restan las siguientes probabilidades:

- 1.- Para-κcaseína y sus fracciones
- 2.- Macropéptido y sus fracciones
- 3.- Fracciones menores de alfa y beta caseínas
- 4.- Proteínas solubles: alfa lactalbúmina (P.M.= 14,174) y la proteosa peptona<sub>5</sub>, con peso molecular de 14,300. (Estas dos últimas prácticamente no detectables).

Las gráficas 17,18,19, 20 y 21, muestran los patrones cromatográficos de nitrógeno soluble de los quesos experimentales en función del tiempo de maduración.

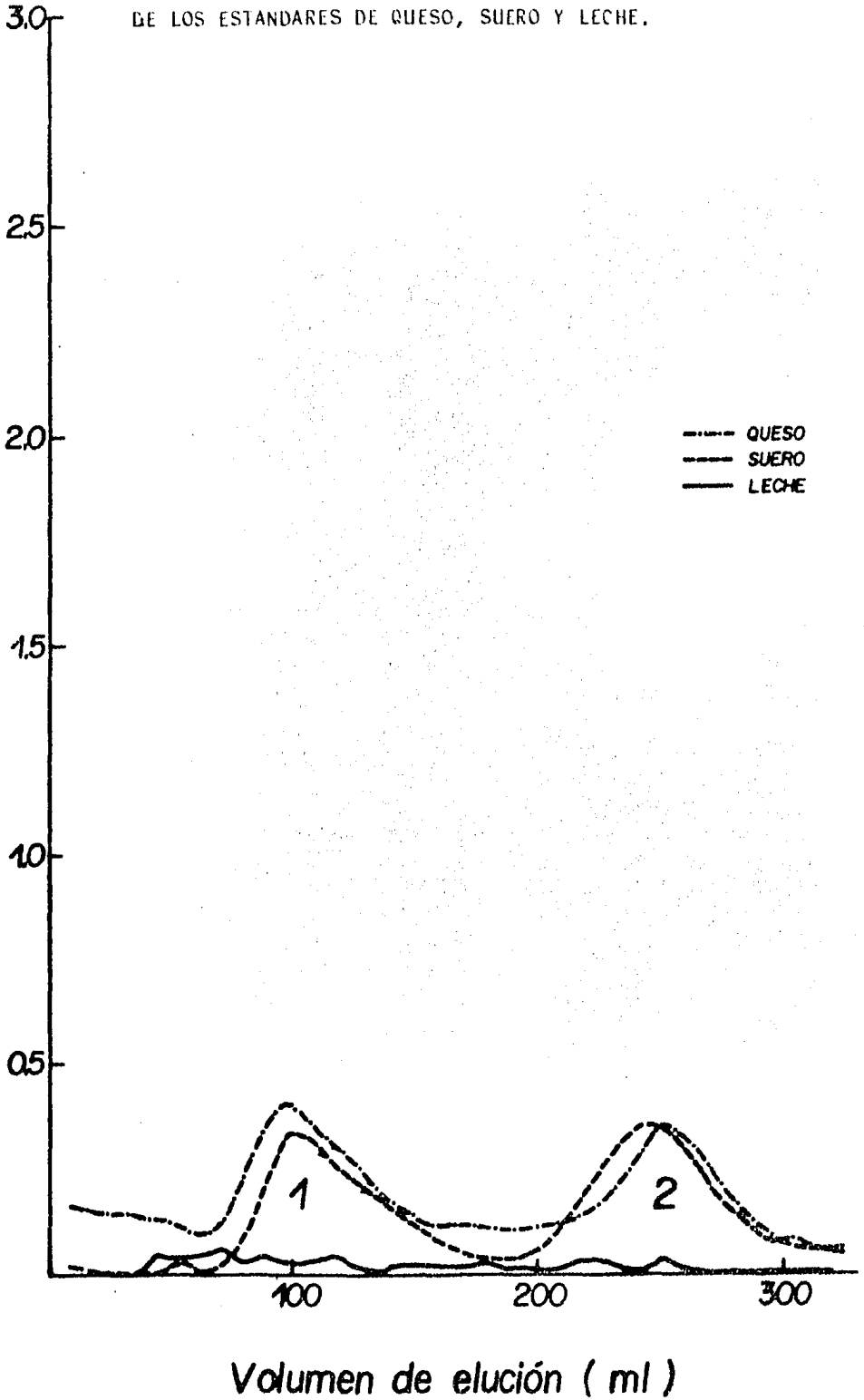
Con el fin de analizar más acertadamente los resultados de las gráficas antes citadas, se corrió también un patrón cromatográfico para estándares de queso, suero y leche, empleando para su análisis la metodología antes señalada - (determinación de proteína soluble a p.H 4.6).

La leche empleada para estas pruebas también fue de excelente calidad microbiológica (100 microorganismos/ml), a fin de evitar al máximo la degradación de proteínas por parte de los microorganismos en la leche, lo que influiría en los fragmentos detectados.

La Gráfica A nos muestra el patrón cromatográfico de los estándares de suero, queso y leche.

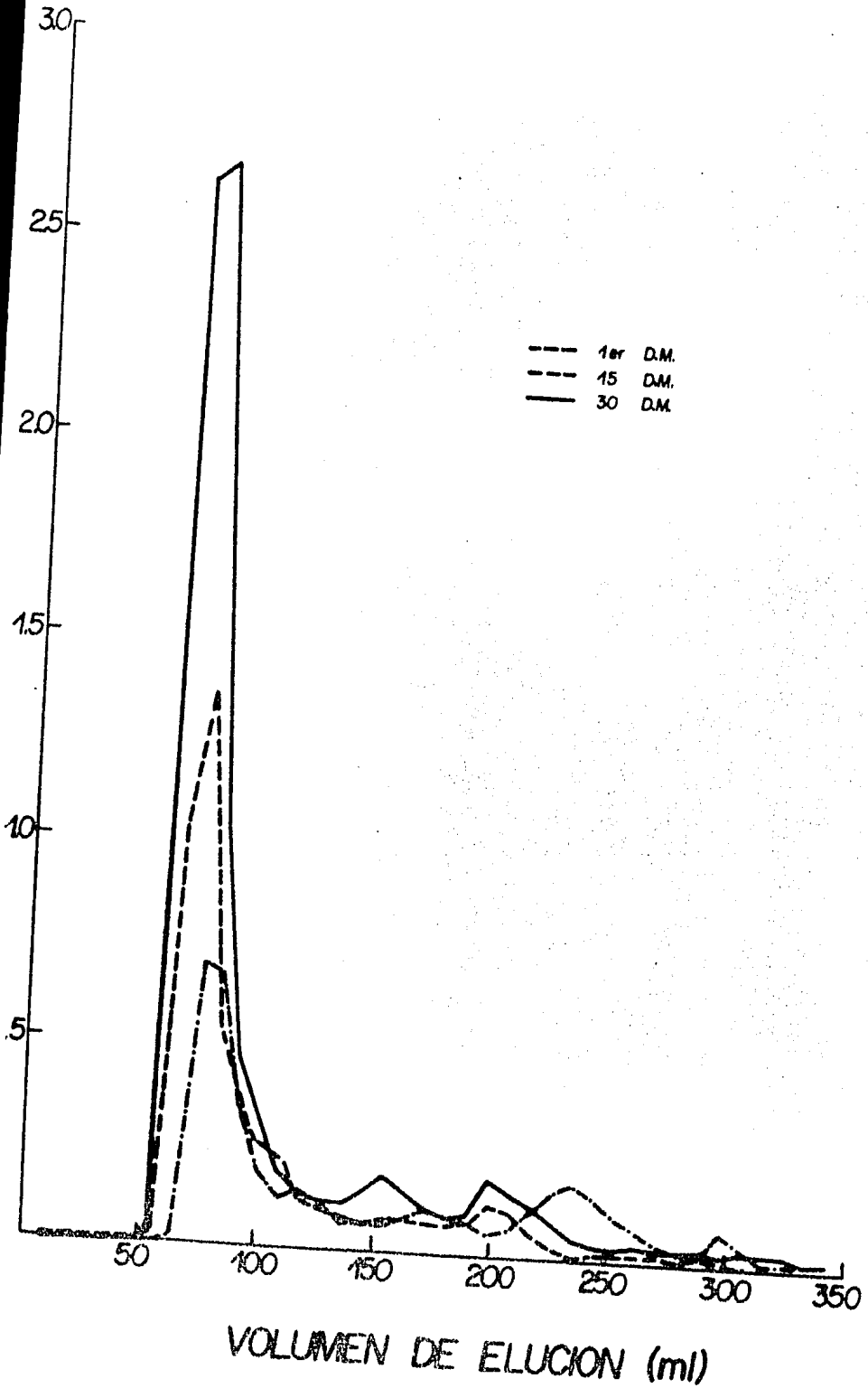
GRAFICA "A"

PATRON CROMATOGRAFICO DE NITROGENO SOLUBLE A p.H 4.6,  
DE LOS ESTANDARES DE QUESO, SUERO Y LECHE.



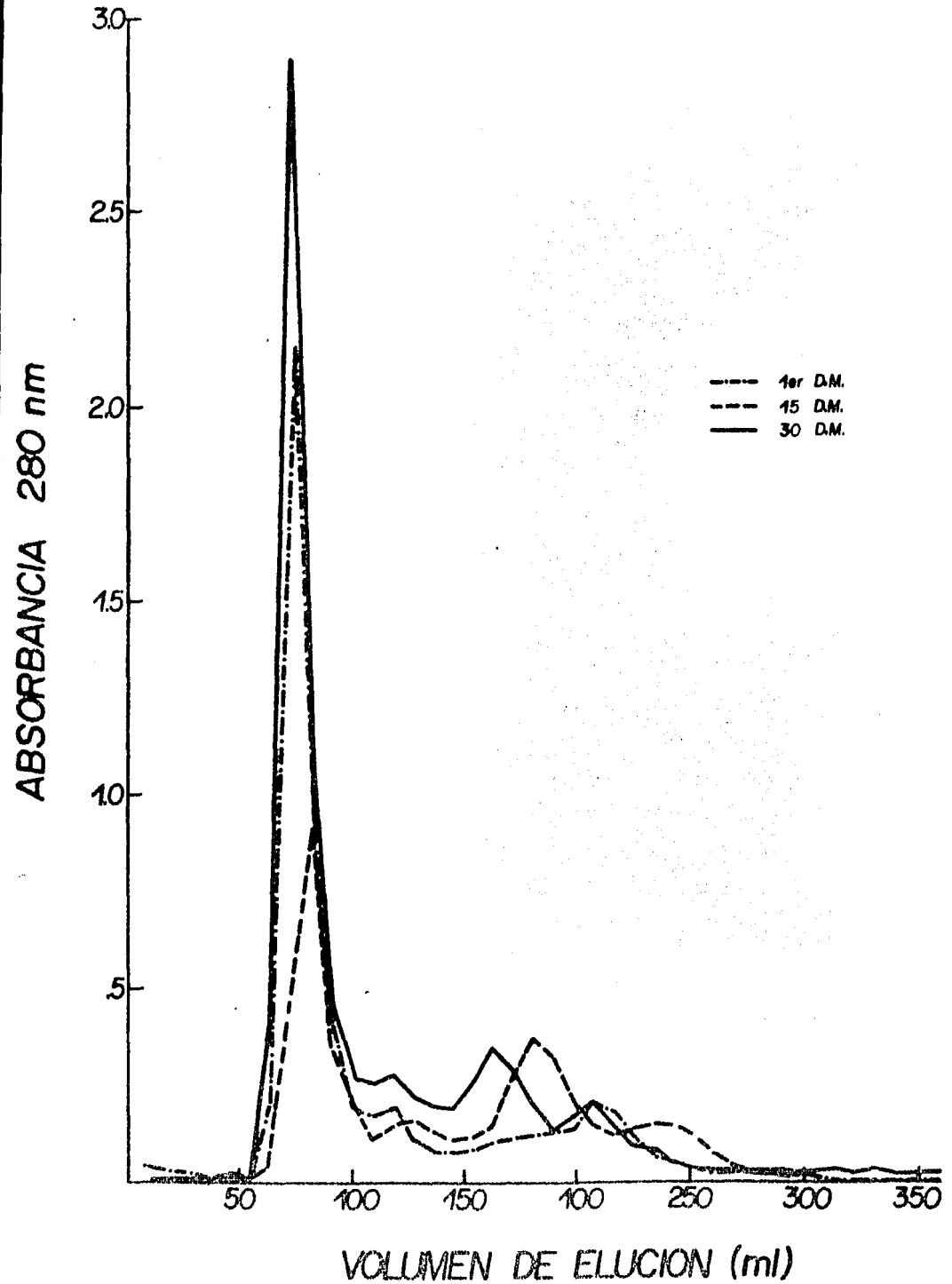
GRAFICA # 17

PATRÓN CROMATOGRÁFICO DE NITRÓGENO SOLUBLE A PH 4,6 EN DIFERENTES TIEMPOS DE DURACIÓN, EN EL QUESO CONTROL.



GRAFICA # 18

PATRÓN CROMATOGRÁFICO DE NITRÓGENO SOLUBLE A PH 4,6 EN DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN, EN LA MEZCLA S. CREMORIS Y S. LACTIS. QUESO 1.

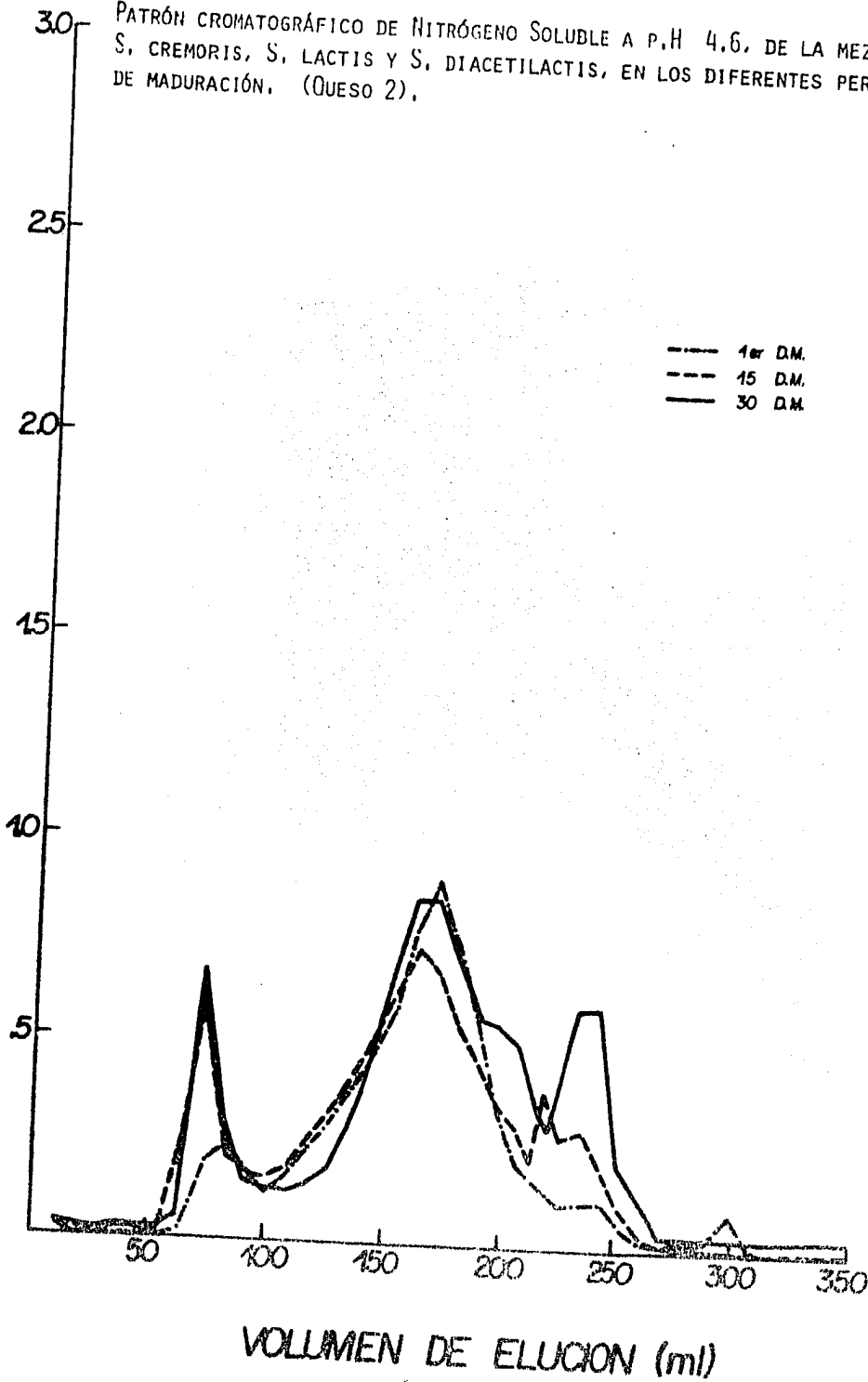




GRAFICA # 19

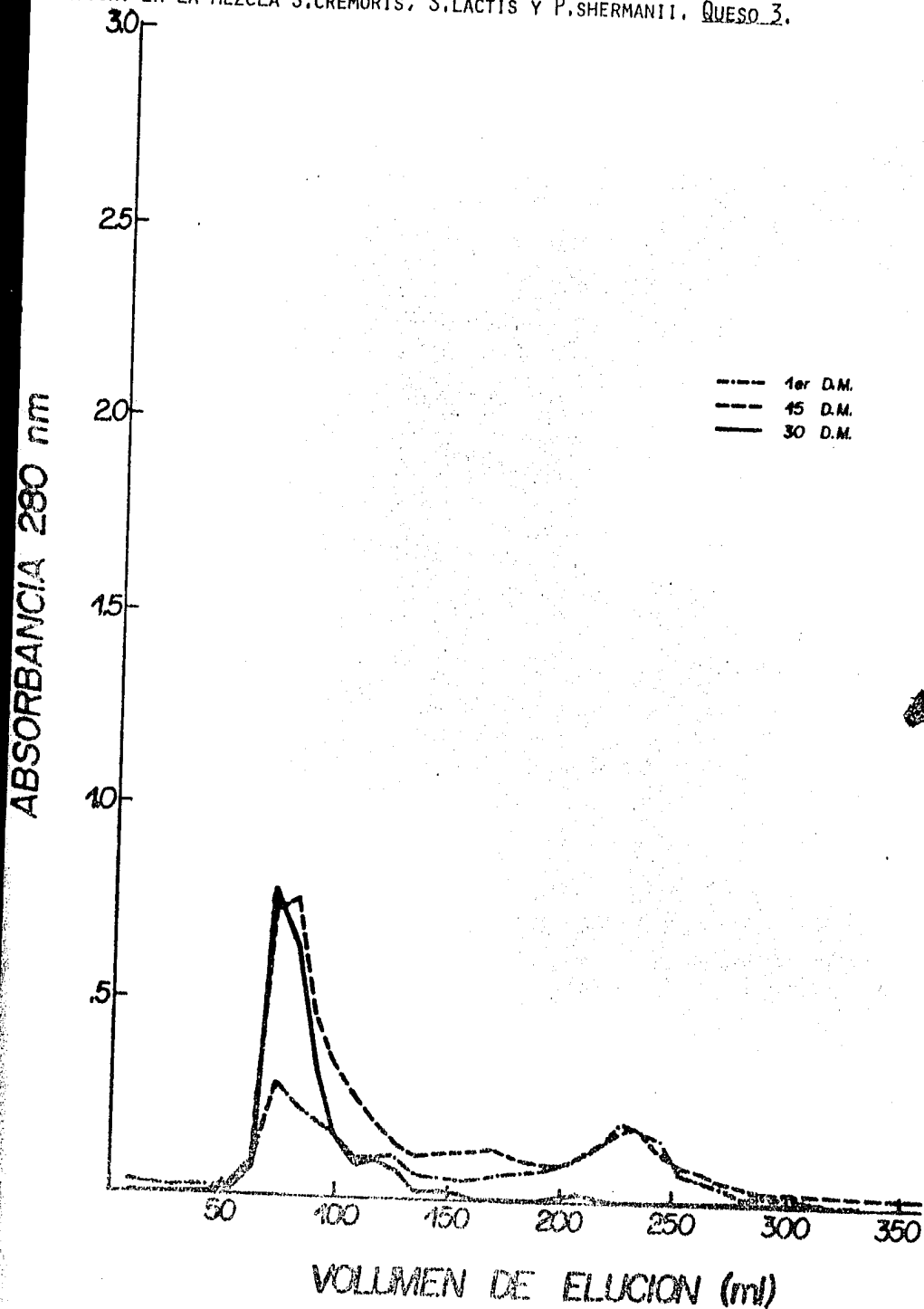
PATRÓN CROMATOGRÁFICO DE NITRÓGENO SOLUBLE A P.H 4.6, DE LA MEZCLA S. CREMORIS, S. LACTIS Y S. DIACETILACTIS, EN LOS DIFERENTES PERÍODOS DE MADURACIÓN. (QUESO 2).

ABSORBIANCIA 200 mμ

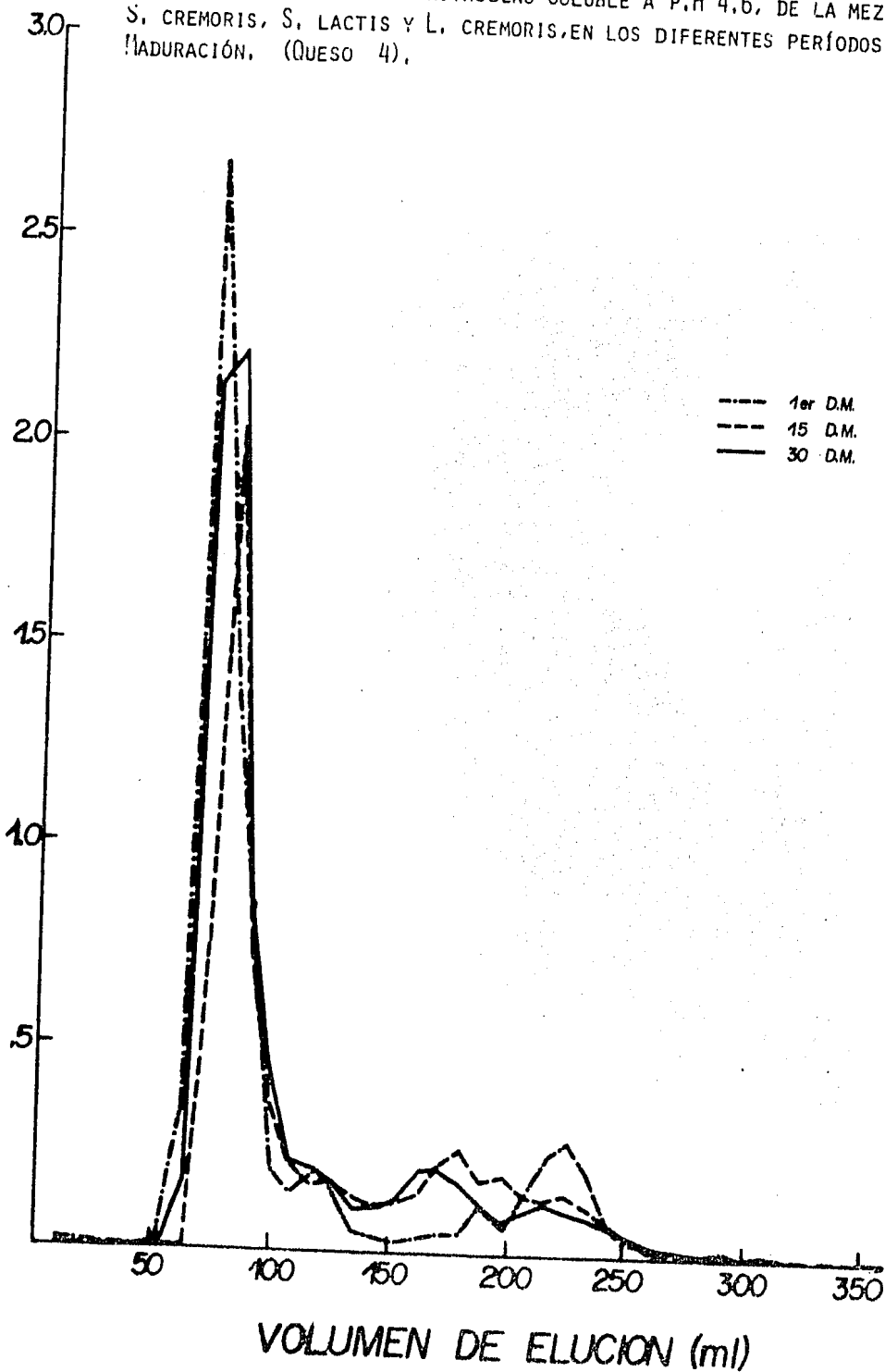


GRAFICA # 20

PATRÓN CROMATOGRÁFICO DE NITRÓGENO SOLUBLE A PH 4,6 EN DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN, EN LA MEZCLA S.CREMORIS, S.LACTIS Y P.SHERMANII. QUESO 3.



GRAFICA # 21  
PATRÓN CROMATOGRÁFICO DE NITRÓGENO SOLUBLE A P.H 4,6, DE LA MEZCLA  
S. CREMORIS, S. LACTIS Y L. CREMORIS, EN LOS DIFERENTES PERÍODOS DE  
MADURACIÓN, (Queso 4).



En esta gráfica A, podemos observar lo siguiente:

Las curvas 1 y 2 de suero y de queso corresponden al mismo fragmento es decir, lo único soluble a p.H 4.6 del queso es aquello contenido en el suero residual, de tal forma que coincide perfectamente con el patrón corrido para suero.

El patrón correspondiente a la leche, sin adición de renina, se presenta prácticamente recto, lo que nos indica que no se obtuvo ninguna fracción soluble, como era de esperarse, pues lo único que debería contener el sobrenadante de la muestra, una vez eliminadas las caseínas por la acidificación, son las proteínas solubles, difícilmente detectables en Sephadex G.50, como ya se anotó.

De acuerdo con estudios antes efectuados (Kato, 1950 y Guthy, 1977) aproximadamente un 5% del nitrógeno no proteico (NNP) de la  $\kappa$ -caseína se libera en el transcurso de los 5 primeros minutos, antes de que se presente la fase secundaria, caracterizada por la agregación y precipitación de la para- $\kappa$ caseína.

Por otra parte, es ya aceptado (Kato, 1980) que la alfa<sub>s</sub> y beta caseínas sufren proteólisis gradual durante períodos mayores, dentro de lo que se conoce como fase terciaria.

Las caseínas alfa<sub>s1</sub> y beta sufren la acción proteolítica en menor o mayor grado, dependiendo de la actividad de agua presente en el queso, durante las diferentes etapas de maduración (O'Keefe, 1976).

Por otro lado, se tiene referencia de cuantiosas investigaciones

para las proteínas en lo referente a la relación que guarda su peso molecular, con los volúmenes eluidos en determinaciones protéicas por filtración en gel; con estas investigaciones se ha demostrado que los volúmenes de proteínas están muy relacionados con su peso molecular. Dentro de un amplio rango, el volumen eluido es función casi lineal del logaritmo del peso molecular. - Esto también es válido para la filtración en gel de péptidos. (Manual de Sephadex, 1974).

Habiendo realizado lo anterior para comprobar la linealidad guardada por los fragmentos detectados y la suposición de sus pesos moleculares basada en los análisis de los pesos moleculares de los fragmentos factibles de detectar y en los límites de peso molecular, superior e inferior, fijados por el Sephadex G.50, se observó un cumplimiento de dicha relación, con lo que es posible ya deducir qué péptido o fragmento de caseína representan las dos curvas de los patrones cromatográficos de suero y de queso (Gráfica A):

La para- $\kappa$ caseína, ligeramente hidrolizada en las primeras fases, con peso molecular menor de 12,000 estaría representada por la curva 1, y el macropéptido quedaría representado por la curva 2, que nos habla de un fragmento con peso molecular cercano a 7,000.

Así pues, la para- $\kappa$ caseína que ha sufrido un cierto grado de hidrólisis, pasa a ser soluble y se suma a los fragmentos que ya antes lo eran, como es el caso del macropéptido.

Al haber empleado una leche prácticamente libre de proteólisis microbiana, tanto en el patrón cromatográfico de los estándares, como para los quesos experimentales, se tiene la presencia de los mismos fragmentos en el Queso control ( Gráfica 17), que en los estándares de queso (curvas 1 y 2 Gráfica A). Lo anterior, referente al primer día de maduración en el queso control. Así pues, ambas gráficas muestran una acción neta por parte de la renina empleada en la elaboración del queso. La diferencia de alturas en las curvas se atribuye a un mayor tiempo de maduración del queso control antes de correr el cromatograma; el queso estándar se corrió inmediatamente después del cuajado.

Regresando a las gráficas 17 a 21 vemos la aparición de nuevos fragmentos y aumentos y/o disminuciones en los ya presentes. Hasta en el queso control se observa una acción terciaria debida a la renina.

Cabe notar que prácticamente todos los quesos en el 1<sup>er</sup>, 2<sup>o</sup> y (sólo algunos hasta el) 3<sup>er</sup> período de maduración presentan las curvas correspondientes a la para-κcaseína - ligeramente hidrolizada y al macropéptido\*. Hay una mayor tendencia a desaparecer o, más propiamente, a ser hidrolizado hasta niveles no detectables, del macropéptido, lo que también queda explicado por el desuerado gradual durante la maduración.

La acción conjunta de renina y de las proteasas microbianas, es lo que da origen a la aparición y desaparición del resto de las curvas en los quesos que sí contenían los inóculos respectivos.

El queso 2, conteniendo el inóculo de *S. cremoris*, -- *S. lactis* y *S. diacetilactis*, presenta un alto grado de solubilización protéica, lo cual queda claramente indicado en su cromatograma, por la aparición de péptidos menores en -- mayor cantidad (curva central) desde el 1<sup>er</sup> día de maduración, hidrolizando incluso la fracción de para- $\kappa$ caseína con su consecuente disminución.

La acción proteolítica mayor aún se encuentra en el -- queso 3, conteniendo el inóculo de *S. cremoris*, *S. lactis* y - *P. shermanii*, lo cual venía ya indicado por el alto grado - de nitrógeno soluble reportado en el Cuadro 3.

La hidrólisis protéica es tan rápida que no queda claramente detectada en los cromatogramas, para lo que se hubiese requerido un menor lapso de tiempo entre una medición y - la siguiente.

En resumen, resaltan las siguientes observaciones:

- 1.- El queso Control, a pesar de no contener inóculo, presenta un cierto grado de proteólisis, de la cual prácticamente la renina es el agente responsable.
- 2.- El queso con mayor grado de proteólisis desde el primer día de maduración es el que contiene la combinación *S. cremoris*, *S. lactis* y *P. shermanii*.
- 3.- A medida que transcurren los diversos períodos de maduración, se puede observar disminución de algunos péptidos antes presentes en mayor cantidad y/o aumento de éstos, además de la aparición de nuevos péptidos de menor peso molecular.

- 4.- Hay una gran similitud en el comportamiento del queso 1 (S. cremoris, S. lactis) y el queso 4 (S. cremoris, S. lactis, L. cremoris) a los 30 días de maduración, a pesar de contener el último a *Leuconostoc cremoris*, lo cual coincide con lo encontrado por Reynoso (Reynoso, 1981) (Gráfica 2), en cuanto al muy similar rango de preferencia en lo concerniente a textura, característica sensorial que representa una aportación importante de la proteólisis en quesos.
- 5.- De acuerdo con los datos aportados por el Cuadro 8, en lo referente a la cantidad de nitrógeno soluble, es evidente que el queso 3 (S. cremoris, S. lactis, P. shermanii) presenta una proteólisis excesiva, por lo elevado de dicho coeficiente en los tres períodos de maduración; de hecho, es en este queso donde se presentan los mayores valores del coeficiente  $N_s/N_t$ .
- 6.- El rendimiento del queso con la combinación S. cremoris, S. lactis, P. shermanii, elaborado en el trabajo de Reynoso (Reynoso, 1981), resultó ser el más bajo, lo cual coincide con el alto grado de solubilización del nitrógeno, factor que repercute en la pérdida de peso del queso y, por tanto, en su rendimiento.

(Rendimientos reportados por Reynoso, 1981:

S. c, S. l = 0.44 ; S. c, S. l, S. d = 0.48  
 S. c, S. l, P. sh = 0.40 ; S. l, S. c, L. c = 0.43. Control = 0.42)



#### IV.b.5) DETERMINACION DEL GRADO DE LIPOLISIS.

##### IV.b.5.1) Determinación de grasa contenida en los quesos.

En el Cuadro = 9 aparecen los porcentajes de grasa cruda contenida en los quesos en los diferentes períodos de maduración.

En todos los casos se observa una disminución de la grasa conforme transcurre el tiempo de maduración.

##### IV.b.5.2) Resultados de la cromatografía de gases de la fase lipídica de los quesos experimentales.

El Cuadro = 10 nos muestra los ácidos grasos libres, determinados por cromatografía de gases, de la fracción lipídica de los quesos 0 al 4, en los diferentes períodos de maduración.

De aquí podemos observar que el queso control ya no muestra las menores cantidades de ácidos grasos libres, o sea, el menor desarrollo de lipólisis, como ocurrió en las determinaciones de acidez y de desarrollo de proteólisis.

Las variaciones aquí se presentan más al llegar a los 30 días de maduración, especialmente en el queso 2, conteniendo la mezcla S. cremoris, S. lactis y S. diacetylactis.

La actividad lipolítica de la mezcla conteniendo P. shermanii, no indicó, en caso alguno, la determinación de ácido propiónico, cuya producción era de esperarse. Esto, al igual que en el caso de la determinación de acidez, puede deberse -----

C U A D R O # 9

CONTENIDO DE GRADA CRUDA (%) DE LOS QUESOS EXPERIMENTALES  
EN LOS TRES PERIODOS DE MADURACION.

TIEMPO	Queso 0 Control	Queso 1 S.c,S.l	Queso 2 S.c,S.l,S.d	Queso 3 S.c, S.l,P.sh	Queso 4 S.c,S.l, L.c
1 <sup>er</sup> dfa	1.- 44.71	1.- 43.8	1.- 43.56	1.- 43.41	1.- 45.2
	2.- 46.5	2.- 43.14	2.- 44.8	2.- 42.48	2.- 50.27
15 <sup>o</sup> dfa	1.- 42.67	1.- 43.47	1.- 43.17	1.- 42.6	1.- 44.8
	2.- 43.8	2.- 42.64	2.- 44.45	2.- 41.99	2.- 45.86
30 <sup>o</sup> dfa	1.- 42.39	1.- 42.49	1.- 42.9	1.- 41.64	1.- 44.01
	2.- 40.03	2.- 38.2	2.- 43.0	2.- 41.45	2.- 45.12

\*  
 CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS LIBRES DE LA FASE LIPIDICA  
 DE LOS QUESOS EN LOS TRES PERIODOS DE  
 MADURACION

ACIDO GRASO	QUESO CONTROL		QUESO 1 S.c,S.1		QUESO 2 S.c,S.1,S.d		QUESO 3 S.c,S.1,P. sh		QUESO 4 S.c,S.1,L.c		% Wt.2	
	$\mu$ mol ac. g.grasa	% Wt <sub>1</sub>	$\mu$ mol ac. g. grasa	% Wt <sub>1</sub>	$\mu$ mol ac. g. grasa	% Wt <sub>1</sub>	$\mu$ mol ac. g. grasa	% Wt <sub>1</sub>	$\mu$ mol ac. g. grasa	% Wt <sub>1</sub>		
	1er día-mad.	Acético	10	0.061	122	0.73	9	0.056	115	0.7		58
	Butírico	42	0.37	80.5	0.71	178	1.6	49	0.4	119	1.05	2.79
	Caprónico	5	0.061	25	0.29	59	0.69	6	0.07	22	0.26	2.34
	Caprílico	10	0.14	18.5	0.26	35	0.5	10	0.15	27	0.39	1.06
	Cáprico	26	0.45	61.5	0.77	128	2.2	39	0.67	103	1.8	3.04
	Láurico	--	--	--	--	58	1.16	27	0.53	45	0.89	2.87
	TOTAL	93	--	307.5	--	467	-	246	-	374	-	-
15 días-mad.	Acético	5	0.032	--	--	--	-	--	-	4	0.024	0.09
	Butírico	32.5	0.29	81	0.72	87.5	0.77	40	0.35	90	0.795	2.79
	Caprónico	5	0.05	26	0.31	19	0.22	--	-	22	0.252	2.34
	Caprílico	18.5	0.27	25	0.36	23	0.32	17	0.25	23	0.335	1.06
	Cáprico	98	1.69	101	1.75	86	1.49	142	2.45	99.5	1.71	3.04
	Láurico	38.5	0.79	57	1.15	61	1.24	--	-	43	0.87	2.87
	TOTAL	197.5	--	290	--	206.5	-	199	-	281.5	-	-
30 días-mad.	Acético	10	0.062	--	--	13	0.077	11	0.07	7.5	0.045	0.09
	Butírico	96	0.85	62.5	0.55	93	0.82	96.5	0.85	71	0.62	2.79
	Caprónico	57	0.66	12.5	0.14	14	0.16	16	0.14	17.5	0.2	2.34
	Caprílico	42	0.605	15	0.21	25	0.36	23.5	0.34	15	0.2	1.06
	Cáprico	64	1.107	69	1.19	122	2.1	106.5	1.83	87	1.49	3.04
	Láurico	--	--	36	0.77	81	1.62	66	1.09	70	1.4	2.87
	TOTAL	269	--	195	--	348	-	319	-	267	-	-

% Wt<sub>1</sub> = % en peso problema

% Wt<sub>2</sub> = % en peso reportado de ácidos grasos totales de la leche

\* Las cifras son promedio de dos determinaciones.

a que la bacteria propiónica no se creció en el medio citado anteriormente para lograr su mayor actividad.

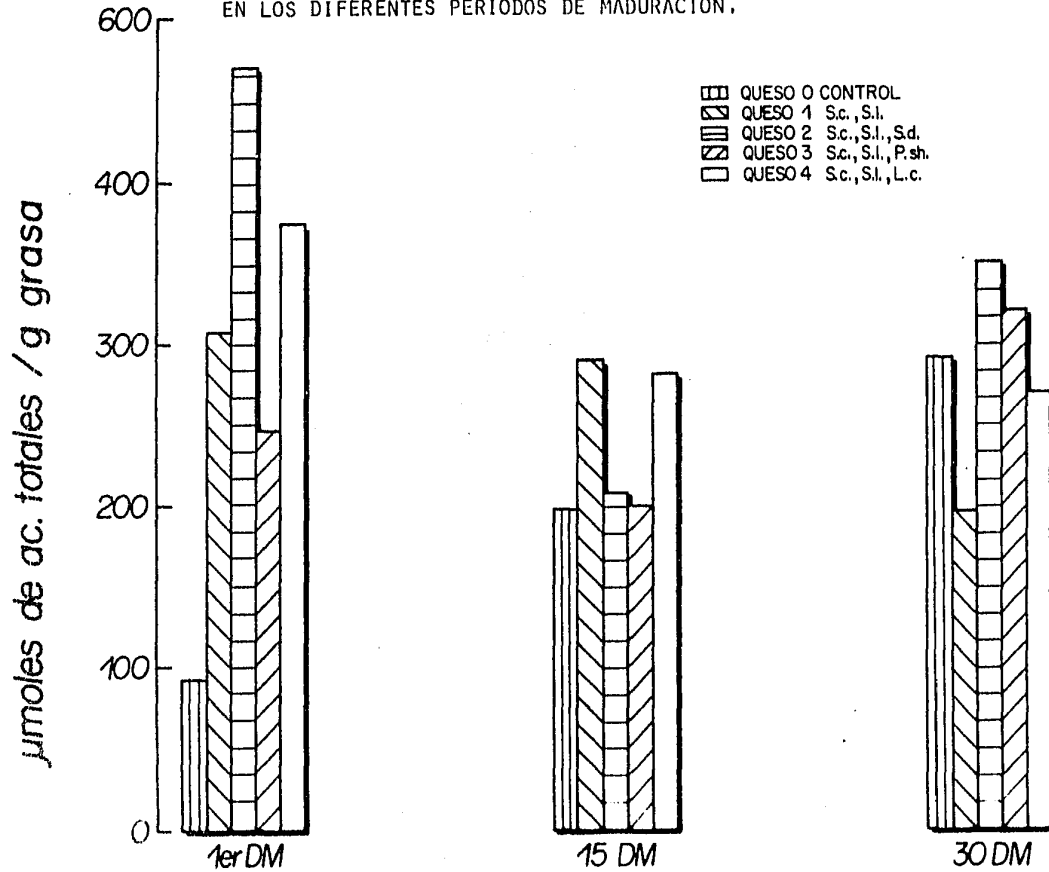
Observando los porcentajes de cada ácido graso libre, y comparándolos con los reportados contenidos en la grasa de la leche ( Cuadro # 10 ), vemos que ninguno excede al porcentaje de grasa de leche, a excepción de la producción de acético en el queso 1, 3 y 4, en el 1<sup>er</sup> día de maduración, pero esta acumulación se explica pues el acético, al igual que el propiónico y el butírico, son también producto de la síntesis microbiana.

Para observar más claramente los comportamientos de los diferentes quesos en cuanto a su contenido de ácidos grasos, en los diferentes períodos de maduración, podemos analizar la Gráfica # 22, donde se presentan los ácidos grasos totales de cada queso, agrupados por período de maduración. También contamos con la Gráfica # 23, donde se observa la acción lipolítica neta de los quesos inoculados, es decir, restándoles el contenido total del queso control.

En la primera gráfica observamos un comportamiento creciente del queso control. El queso 1 y el 4, por el contrario, muestran un comportamiento decreciente. Los quesos 2 y 3 muestran comportamientos variables.

En la Gráfica 23 vemos que a los 15 días de maduración con respecto al 1<sup>er</sup> día, hay un consumo de ácidos en todos los quesos, pero que ninguno sobrepasa en consumo a la cantidad producida sólo por el queso control, fenómeno que ya se hace evidente a los 30 días de maduración, en los que el queso 1 y el queso 4 ya consumen hasta de los ácidos grasos producidos por el blanco. es decir, los que produciría el queso

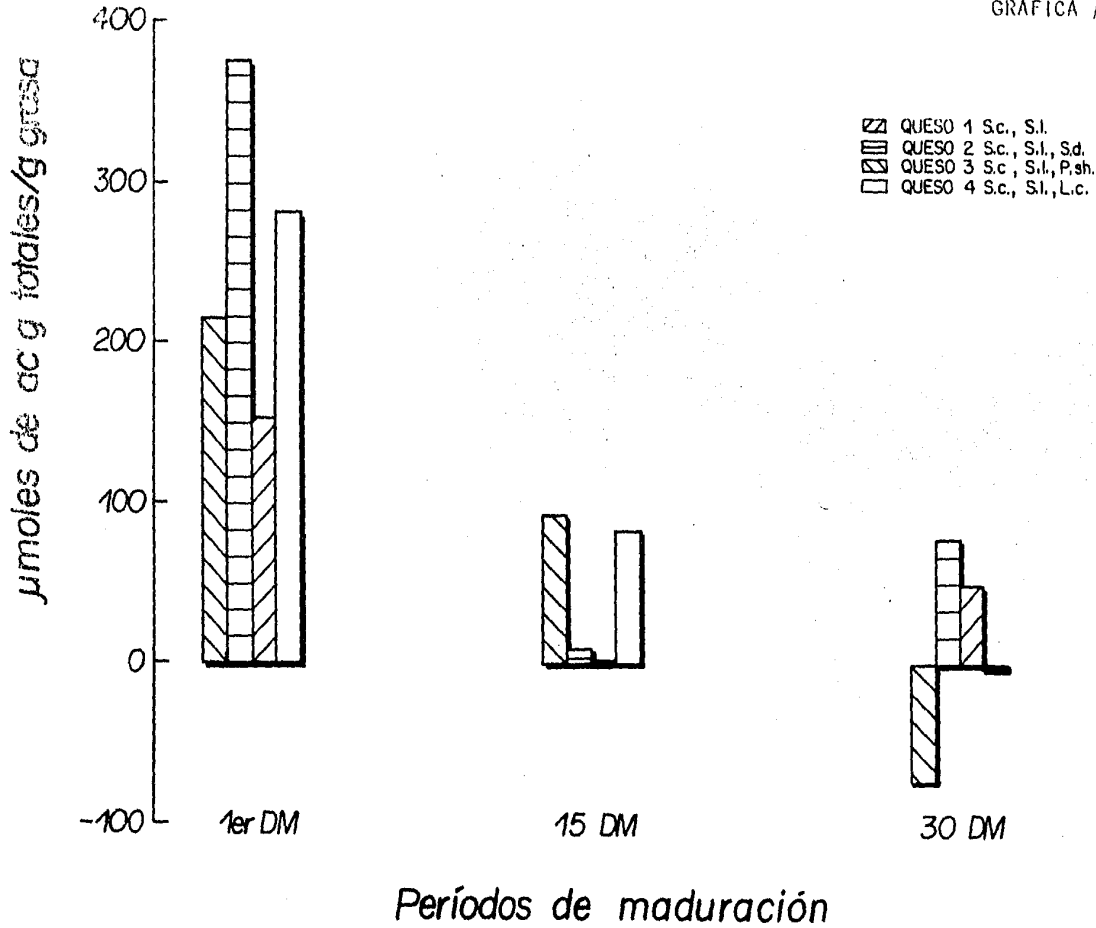
MICROMOLES DE ACIDOS GRASOS LIBRES TOTALES POR GRAMO DE GRASA, DE LOS QUESOS 0-4,  
EN LOS DIFERENTES PERÍODOS DE MADURACIÓN.



Períodos de maduración

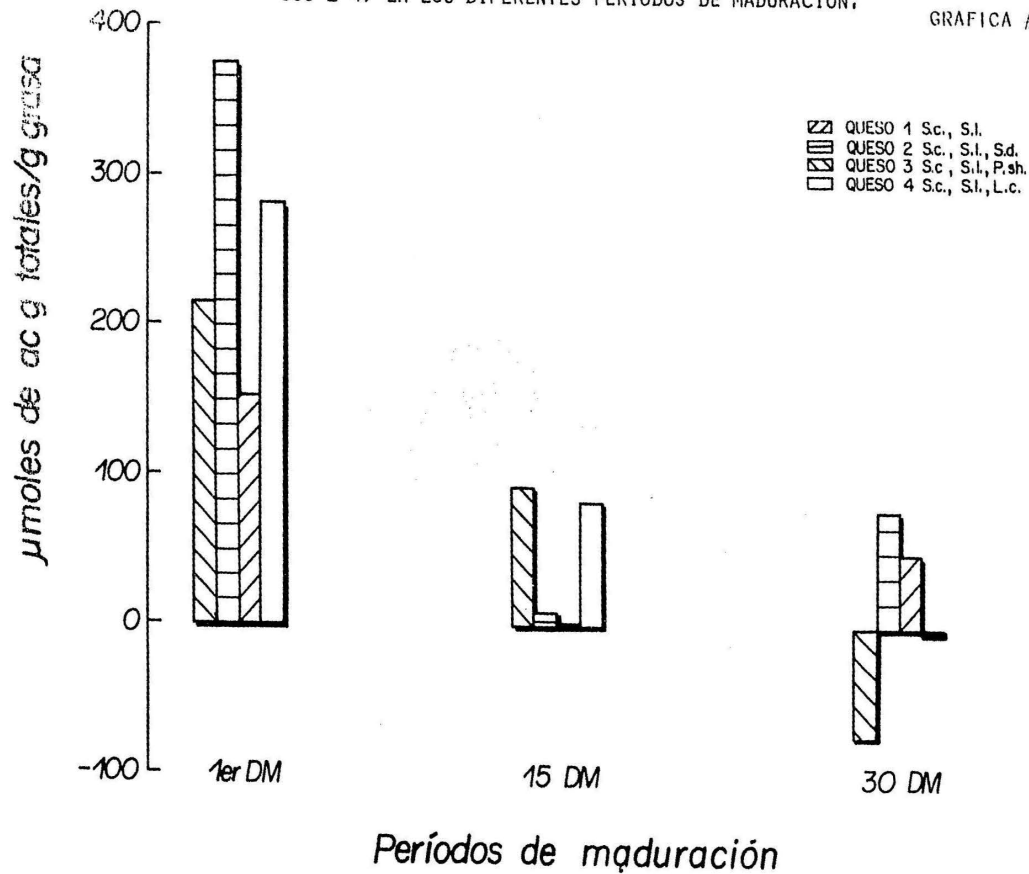
MICROMOLES DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES TOTALES NETOS POR GRAMO DE GRASA, DE LOS QUESOS 1-4, EN LOS DIFERENTES PERÍODOS DE MADURACIÓN.

GRAFICA # 23



MICROMOLES DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES TOTALES NETOS POR GRAMO DE GRASA, DE LOS QUESOS 1-4, EN LOS DIFERENTES PERÍODOS DE MADURACIÓN.

GRAFICA # 23



por sí solo.

IV.b.5.3) Resultados de la cromatografía de gases de la fracción soluble en agua de los quesos experimentales.

El Cuadro # 11 muestra las cantidades de los tres - ácidos grasos libres (Acético, Propiónico y Butírico), determinados en esta prueba.

Del cuadro podemos inferir lo siguiente:

- El queso Control de nuevo presenta variaciones con respecto a las cantidades determinadas en las demás pruebas, donde se comportaba más homogéneamente con respecto a los demás - quesos.
- Cabe también observar que aquí sí la mayor producción de - ácido propiónico se presenta en el Queso 3, conteniendo la bacteria propiónica; la cantidad no es muy relevante, si consideramos la cantidad producida por el queso Control, de cuya diferencia se producen tan solo 36 micromoles de ácido propiónico/gramo de queso seco y desgrasado.

Así pues, la actividad del Propionibacterium, o más propiamente dicho, de la mezcla *S. cremoris* y *S. lactis* y *P. shermanii*, también de hecho fue baja. Pareciera ser que este microorganismo o la mezcla de inóculo se limitó a la acción proteolítica, lo cual también establece que las condiciones del queso no son en lo más mínimo favorables para *P. shermanii*, microorganismo - específico en la producción de queso suizo, el cual tiene características de elaboración y maduración especiales.



## C L A D R O # 11

CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS VOLATILES LIBRES DE LA FASE  
SOLUBLE EN AGUA, DE LOS QUESOS, EN LOS TRES  
PERIODOS DE MADURACION

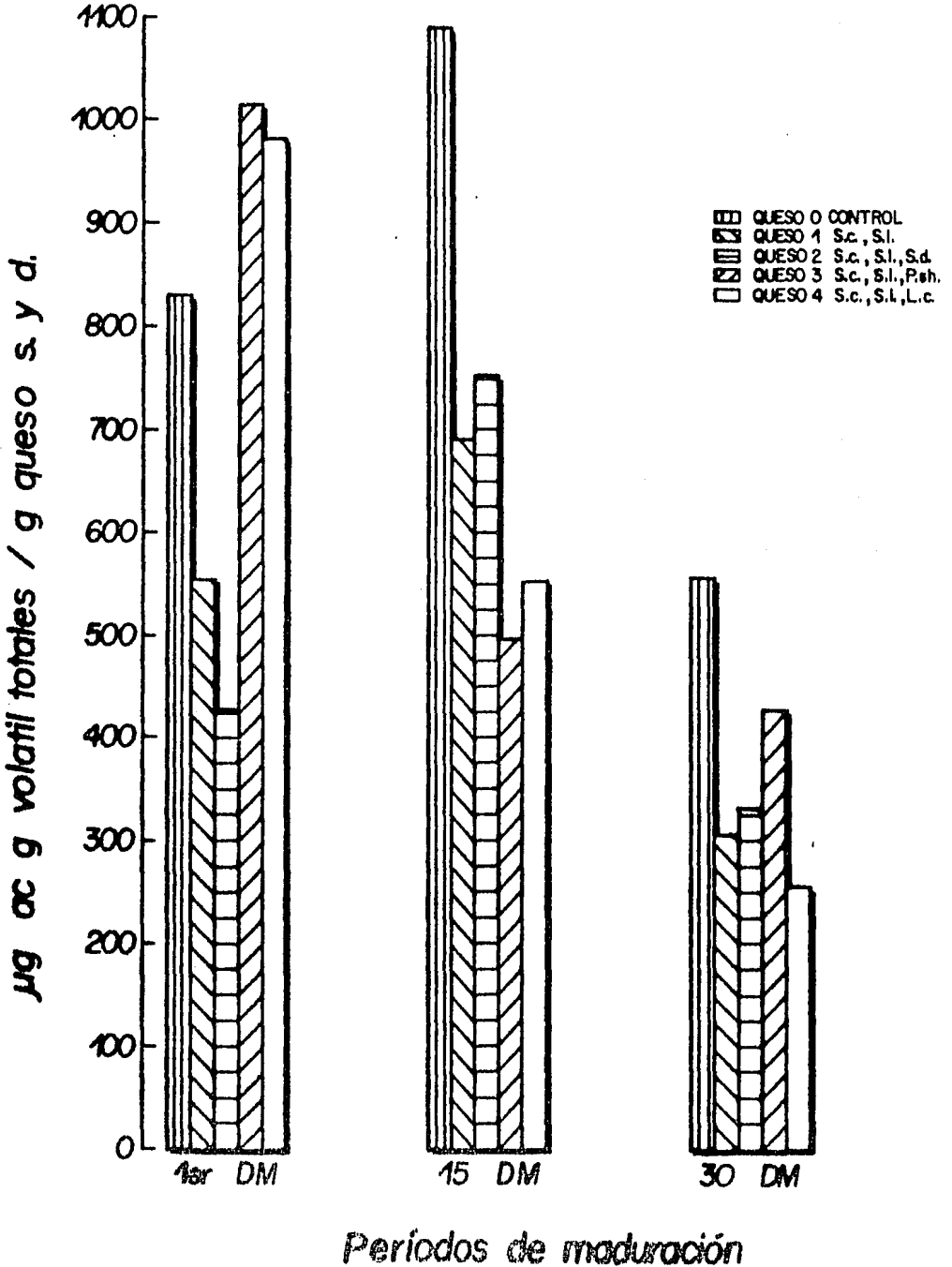
(μmoles de ácido graso)

g de queso seco y des-  
grasado

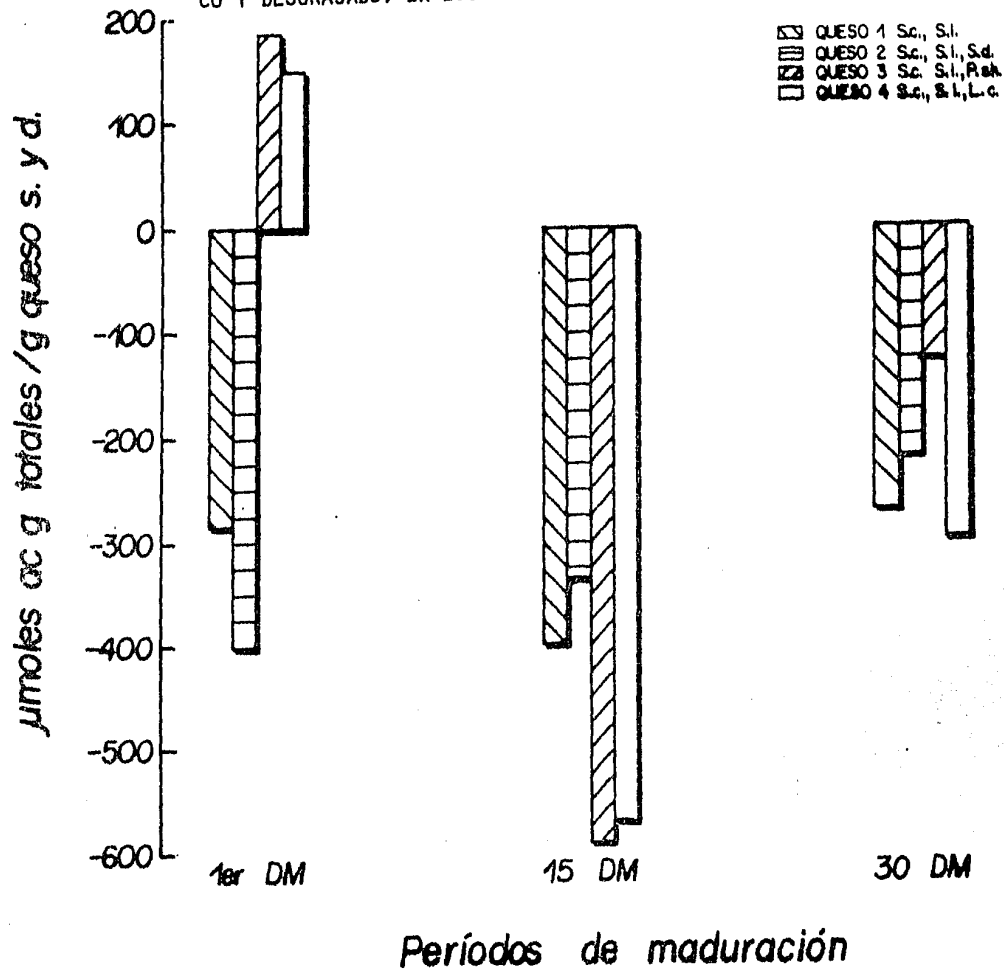
	ACIDO GRASO	Queso 0 Control	Queso 1 S.c,S.l	Queso 2 S.d	Queso 3 P.sh	Queso 4 L.c
1 día	Acético	551	389.5	329	779.5	769
	Propiónico	209	114.5	72	164	144.5
	Butírico	70	41.5	26	73.5	67
	TOTAL	830	545.5	427	1,016.0	980.5
15 días	Acético	915.5	494.5	620	371.5	385.5
	Propiónico	118	145	97.5	100	120
	Butírico	55.5	52	36	27	45.5
	TOTAL	1,089.0	691.5	753.3	498.5	551.0
30 días	Acético	409.5	235.5	237.5	287.5	207
	Propiónico	58	34	52	94	29
	Butírico	87	38	43	44	20
	TOTAL	554	307.5	332.5	425.5	256

GRAFICA # 24

CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS VOLÁTILES LIBRES TOTALES POR GRAMO DE QUESO SECO Y DES-  
 ASADO, EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN, QUESOS 0-4,



CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS VOLÁTILES LIBRES TOTALES NETOS POR GRAMO DE QUESO SECO Y DESGRASADO, EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MADURACIÓN, QUESOS 1-4.



Ayudándonos de la Gráfica # 24, la cual muestra los -- ácidos grasos totales libres/gramo de queso seco y desgrasado, observamos una severa variación en los comportamientos, es decir, en la producción y consumo de los ácidos grasos volátiles. A los 30 días, todos los quesos coinciden en una disminución.

La Gráfica # 25, nos muestra la actividad lipolítica neta, restando el control, donde sólo aparecen los quesos del 1 al 4.

De aquí, se ve que los quesos 1 y 2 muestran consumo más allá de lo producido por el control desde el primer día, mientras que los quesos 3 y 4 empiezan a consumir del control hasta los quince días de maduración, siendo parejo el comportamiento de consumo por parte de los cuatro quesos al llegar al último período de maduración.

En resumen, parece ser que no es posible hallar correlación alguna entre las cantidades individuales de ácido graso, o entre el total de ácidos grasos presentes en un queso, con las características propias que habían venido mostrando los diferentes quesos en los otros análisis.

Sin embargo, si observamos los Cuadros 12 y 12' en los que se exponen los porcentajes de ácidos grasos libres reportados por 2 autores, para quesos suizos, vemos también variaciones considerables de un ácido graso determinado, en un queso

C U A D R O # 12

ACIDOS GRASOS LIBRES EN QUESOS SUIZOS COMERCIALES

(% en peso)

Fuente: S.L. Biede, 1979

ACIDO GRASO	Queso A	Queso B	Queso C	Queso D	Queso E	Leche
Acético	0.639	0.785	0.836	0.55	0.66	0.09
Propiónico	1.364	1.206	1.122	1.232	0.682	0
Butírico	0.079	0.046	0.152	0.182	0.181	2.79
Caprílico	0.048	0.112	0.051	0.059	0.048	2.34
Caprílico	0.106	0.068	0.033	0.042	0.028	1.06
Cáprico	0.233	0.154	0.092	0.101	0.062	3.04
Láurico	0.238	0.145	0.095	0.105	0.059	2.87

C U A D R O # 12'

ACIDOS GRASOS LIBRES EN QUESO SUIZO ELABORADO CON

*L.helveticus*, *S. thermophilus* y *P.shermanii*

Fuente : Paulsen, 1980.

ACIDO GRASO	% en peso	% en peso de Leche
Acético	0.33	0.09
Propiónico	1.203	0
Butírico	0.0308	2.79
Caprílico	0.0169	2.34
Caprílico	0.0134	1.06
Cáprico	0.038	3.04
Láurico	0.0545	2.87

que es del mismo tipo de otro que muestra el doble del porcentaje de dicho ácido graso.

Desgraciadamente, no se cuenta con reportes en los períodos de maduración intermedios; los diferentes investigadores que han trabajado sobre este punto, se limitan a reportar el resultado final, al concluir la maduración, lo que podría haber ayudado a una mejor comparación.

Desde luego que también es importante mencionar que las cantidades que aparecen en el Cuadro 12, difieren grandemente de las encontradas en este estudio, pero, ante todo, hay que tener presente que se trata de dos quesos muy diferentes, elaborados y madurados de muy distinta manera, empezando desde el inóculo utilizado.

Pareciera ser pues, que la proporción de ácidos grasos libres contenidos en un queso, sí es determinante en las características sensoriales que los clasifican dentro de un tipo u otro de queso.

Las Figuras 2 y 3 nos muestran los cromatogramas estándar de las determinaciones de ácidos grasos libres en fase lipídica y en fase acuosa, respectivamente.

1

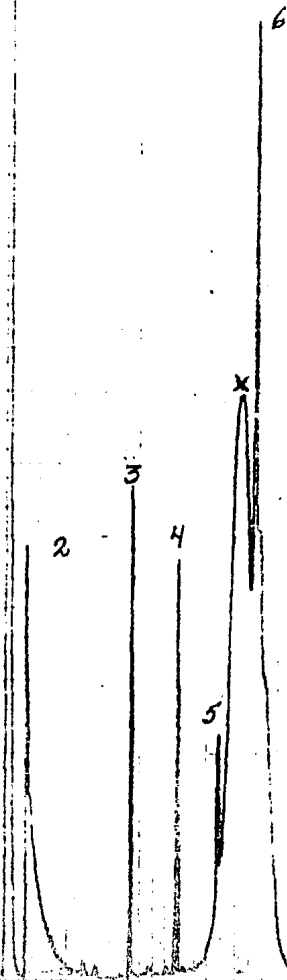
Figura 2

Acidos Grasos libres

Fase lipidica

Cromatograma Estándar

- Pico 1 = Cloroformo  $tr = 3' 00''$   
 Pico 2 = Ac. Acético  $tr = 5' 40''$   
 Pico 3 = Ac. butírico  $tr = 13' 04''$   
 Pico 4 = Ac. caprílico  $tr = 16' 27''$   
 Pico 5 = Ac. Caprílico  $tr = 19' 30''$   
 Pico 6 = Ac. Láprico  $tr = 22' 07''$

Queso Control 15 días  
de MaduraciónFigura 3AGV'S  
(fase acuosa)Cromatograma  
Estándar.

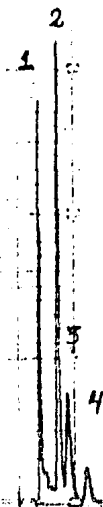
Queso Control

15 Días  
de Maduración

- Pico 1 = agua  
 Pico 2 = Ac. acético  
 Pico 3 = Ac. propiónico  
 Pico 4 = Ac. butírico

tiempos de retención :

- Pico 1 = 23 seg.  
 Pico 2 = 1 min 33 seg.  
 Pico 3 = 2 min 20 seg.  
 Pico 4 = 3 min 43 seg.



C A P I T U L O V

C O N C L U S I O N E S

---



## C O N C L U S I O N E S

Durante el madurado de los productos lácteos industrializados, ocurren cambios trascendentes en los tres principales componentes de la leche: grasa, caseínas y lactosa. Dichos cambios, en el caso de los quesos en general, se llevan a efecto por la presencia de carbohidrasas, proteasas y lipasas, proporcionadas por los microorganismos de la leche, - los iniciadores, la renina y la leche misma.

Los iniciadores lácticos, así como los aditivos empleados en el procesamiento de los productos lácteos, son fundamentales para obtener cambios en sabor, olor, color y textura.

La formación de sustancias sápidas se debe principalmente a la acción de iniciadores sobre los componentes de la leche, particularmente sobre las caseínas y materia grasa.

La acción anabólica de los microorganismos, a partir de los componentes del medio, también aporta compuestos importantes para impartir las características finales al producto.

Numerosos son los factores que intervienen en la conformación de un producto lácteo, pero, de los estudiados en el presente trabajo, podemos concluir más fácilmente si correlacionamos los resultados con aquellos encontrados por Reynoso (Reynoso, 1981), referentes a las características de -

aceptabilidad basados en los parámetros sensoriales.

Para proceder a efectuar dicha comparación, emplearemos un cuadro (Cuadro 13), donde se engloban los resultados de - ambos trabajos, para poder visualizar mejor las posibles co rrelaciones.

Analizando los cinco quesos experimentales, podemos - correlacionar los siguientes puntos, en las diferentes com binaciones de inóculo empleadas.

1. - El queso Control presenta, de acuerdo con la tabla anterior, acciones bioquímicas mínimas que marcan una estrecha relación con la poca aceptación de su textura y olor que se - encontró anteriormente. Sin embargo, la sola acción de la renina logró hidrolizar las proteínas de este queso e impartirle características medias de sabor.

Los ácidos grasos volátiles producidos en mayor cantidad en este Control pudieran ser los responsables de la poca aceptabilidad en cuanto a olor.

- 2.- El queso conteniendo el inóculo que presentó la menor des viación estándar en su aceptabilidad por sabor, fue el se leccionado como el queso más aceptado, a lo que se sumó - su mejor textura y moderada aceptabilidad en olor y color.

Estos resultados, producidos por *S. lactis* y *S. cre* moris, parecen estar estrechamente vinculados con la manera en que se comportó este queso ante los parámetros - aquí estudiados: alta producción de acidez en etapas de

CUADRO # 13

CARACTERIS- TICAS SENSO RIALES.	Queso 0 CONTROL	Queso 1 S.c, S.l	Queso 2 S.c,S.l S.d	Queso 3 S.c,S.l, P.sh.	Queso 4 S.c,S.l, L.c	
Color	++++	+++	++	++++	+	
Olor	++	+++	++++	++++	+	
Sabor	+++	++++	++	+	++++	
Textura	+	++++	+++	++	++++	
ACTIVIDAD MI- CROBIOLOGICA BIOQUIMICA						
Desarrollo de acidez.	+ menor produc- ción en los tres pe- riodos de mad.	+++ rápida produc- ción	++++ mayor Produc- ción	++ lan- to y poca	+++ buena tenta	
Variación del N° de microorganismos	-	Mayor disminu- ción	Estable	Estable	Estable	
Proteólisis (30 D.M.)	+	+++	++++	++++	++	
Lipólisis	1 D.M.	+	+++	++++	++	++++
	30 D.M.	++	++++	++++	+++	+++
AGV%	1 D.M.	+++	++	+	++++	++++
	15 D.M.	++++	+++	++++	+	++
	30 D.M.	++++	++	+++	++++	+

maduración temprana; disminución de las poblaciones microbianas hacia el final de la maduración; solubilización - protéica pausada y moderada, y una nada exagerada cantidad de ácidos grasos libres presentes en el último periodo de maduración.

- 3.- El queso conteniendo el inóculo *S. cremoris*, *S. lactis* y *S. diacetylactis*, es altamente aceptado por su olor, lo que parece demostrar la mayor presencia de ácidos grasos libres encontrada.

Su poca aceptabilidad en sabor y textura puede deberse, en parte, al exceso de ácidos grasos libres y a la solubilización protéica que, aunque moderada, produce un elevado número de fragmentos menores, no presentes en los cromatogramas de los otros quesos.

En el caso específico de este queso, por contener al *Streptococcus diacetylactis*, las características de sabor y olor estarían también dadas por la presencia de diacetilo, pero este compuesto sería materia de otro estudio.

- 4.- El queso conteniendo la bacteria propiónica, pareciera ser el de peor sabor; su textura se consideró también mala y, aunque su olor fue bueno, los comportamientos de la proteólisis exagerada que presenta y su lenta producción de acidez, parecen ser los factores responsables de las malas cualidades organolépticas.

Hacia el final de la maduración también contiene un elevado número de ácidos grasos libres, lo que hizo que mejorara su olor, para cuando se efectuaron las pruebas panel.

5.- Y, finalmente, el queso con olor y color menos aceptable y con segundo lugar en aceptabilidad de sabor y textura, es el que contenía el inóculo *S.cremoris*, *S.lactis* y *L.cremoris*. Lo anterior se explica por su grado moderado de proteólisis muy similar al del queso con *S.cremoris* - y *S.lactis*.

La acidez desarrollada es lenta, pero llega a tener niveles aceptables hacia el final de la maduración.

En este queso, los ácidos grasos libres al 1° y 15° días de maduración se presentaban en cantidades altas, - pero se observó una tendencia hacia la mayor disminución presentada, en comparación con los otros quesos, a los - 30 días de maduración, lo que pudo hacer de este queso - el menos aceptable en lo concerniente a su olor.

Aunque el estudio individual de los factores aquí citados es muy valioso debido a que aporta conocimientos básicos que ayudan a tratar de entender más las interacciones que se presentan entre los diversos componentes del producto, no - hay que olvidar que dichas interacciones funcionan como un - todo, se entremezclan para dar determinada o determinadas ca racterísticas al producto; diluyen, suavizan y mezclan íntimamente los diversos sabores y olores, haciendo muy complejo el estudio de su desarrollo y, principalmente, de sus efectos.

La importancia de los inóculos para acelerar, producir, mejorar determinada o determinadas características organolépticas, también para marcar defectos, se explica con las diferencias de aceptabilidad encontradas por Reynoso, (Reynoso, 1981), y por los datos encontrados en los quesos que no contenían el inóculo (queso Control).

Así mismo, la proporción en la mezcla de cada bacteria láctica para utilizar como inóculo en la elaboración de un queso de tipo semimadurado y las características que se espera que aporte cada bacteria individualmente, deben considerarse cuidadosamente, ya que estos factores van íntimamente ligados con las características finales del producto y la buena o mala aceptación que tendrá.

Como recomendaciones cabría señalar la necesidad de elaborar quesos, ya a un nivel semiindustrial, en el que se probará si es posible utilizar los inóculos elegidos, suspendidos en el medio de cultivo y comprobar si esto no afectaría el sabor o el color del producto final. De ser así, tratar de probar otras formas para llegar a la más fácil, práctica y económica, en que se podrían comercializar las bacterias con la industria láctea nacional.

En cuanto a la elección del inóculo adecuado, este trabajo puede ser de gran utilidad para poder seleccionar las bacterias basándose más en las características que, como mezcla iniciadora, presentaron; es decir, los niveles de producción de acidez, las manifestaciones de proteólisis

y de lipólisis, así como el comportamiento de los microorganismos. De esta manera, se podrían aprovechar los diferentes comportamientos de las mezclas para, por poner un ejemplo, acortar los tiempos de maduración:

Puesto que la proporción de inóculo manejada en este trabajo fue de 1:1:1, en el queso inoculado con *S. cremoris*, *S. lactis* y *S. diacetylactis*, pudiera ser que mejoraran sus características de sabor (Ver Cuadro 13) si el *Streptococcus diacetylactis* se inoculara en menor proporción. Además de prácticamente asegurarse lo anterior, la velocidad de producción de acidez también se incrementaría, al igual que la proteólisis, pudiendo ser muy factible obtener las características de un queso que ha llegado al nivel de madurez esperado, en un menor tiempo. No es necesario mencionar las ventajas económicas que esto podría presentar, ya a un nivel industrial.

Otra forma de implementar el proceso podría ser trabajando con cepas rápidas productoras de acidez.

El queso conteniendo en su inóculo a *Propionibacterium shermanii*, podría prácticamente descartarse su uso en trabajos futuros, ya que su comportamiento no cumple con lo esperado para obtener un queso de buena calidad, lo cual explica el por qué dicho microorganismo se emplea para la elaboración de un tipo de queso muy diferente: el queso Suizo.

Este trabajo, además de explicar, en parte, las características sensoriales de los quesos de Reynoso, puede fungir como base teórica para el desarrollo de trabajos

y de lipólisis, así como el comportamiento de los microorganismos. De esta manera, se podrían aprovechar los diferentes comportamientos de las mezclas para, por poner un ejemplo, acortar los tiempos de maduración:

Puesto que la proporción de inóculo manejada en este trabajo fue de 1:1:1, en el queso inoculado con *S. cremoris*, *S. lactis* y *S. diacetylactis*, pudiera ser que mejoraran sus características de sabor (Ver Cuadro 13) si el *Streptococcus diacetylactis* se inoculara en menor proporción. Además de prácticamente asegurarse lo anterior, la velocidad de producción de acidez también se incrementaría, al igual que la proteólisis, pudiendo ser muy factible obtener las características de un queso que ha llegado al nivel de madurez esperado, en un menor tiempo. No es necesario mencionar las ventajas económicas que esto podría presentar, ya a un nivel industrial.

Otra forma de implementar el proceso podría ser trabajando con cepas rápidas productoras de acidez.

El queso conteniendo en su inóculo a *Propionibacterium shermanii*, podría prácticamente descartarse su uso en trabajos futuros, ya que su comportamiento no cumple con lo esperado para obtener un queso de buena calidad, lo cual explica el por qué dicho microorganismo se emplea para la elaboración de un tipo de queso muy diferente: el queso Suizo.

Este trabajo, además de explicar, en parte, las características sensoriales de los quesos de Reynoso, puede fungir como base teórica para el desarrollo de trabajos



posteriores o de otros estudios relativos al tema.

Así pues, hemos visto una vez más, que la utilización de las bacterias lácticas iniciadoras, producidas en México, puede considerarse como exitosa y de gran futuro, lo cual ya se sabía, por el trabajo de Reynoso, (Reynoso, 1981), que es, de hecho, el que orilló a la elaboración de éste.

La difusión a nivel industrial que de ellas se haga, una vez consideradas las recomendaciones expuestas, sería el siguiente gran paso. Desde luego, que esto ayuda a suplir cierto grado de importaciones más no representa la solución a todos los problemas de importación que se tienen en la industria láctea, o que pudieran tenerse en un futuro, pero sí es el principio en la búsqueda de otras tantas soluciones.

B I B L I O G R A F I A

---

## Bibliografía.

1. Alais, Ch. Ciencia de la Leche, Principios de Técnica Lechera, Cía. Editorial Continental, S.A. México, 1970.
2. Aston, W. John. Detection of Carbonyl sulphide in cheddar cheese headspace. *Journal of Dairy Research*. 48:473-478, 1981.
3. Babel, F. Antibiosis by Lactic Culture Bacteria. *Journal of Dairy Science*. Vol. 60, No. 5, 1977.
4. Biede, S.L. and Hammond, E.Y. Swiss Cheese Flavor: I. Chemical Analysis. *Journal of Dairy Science*. 62:227-237, 1979.
5. Biede, S.L. and Hammond, E.Y. Swiss Cheese Flavor: II. Organoleptic Analysis. *Journal of Dairy Science*. 62: 238-248, 1979.
6. Collins, E.B. Biosynthesis of Flavor. Compounds by Microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 55:1622, 1972.
7. Creamer and Richardson. New Zealand. *Journal of Dairy Science and Technology*. 9:9, 1974. Citado por O'Keefe 1976.
8. Edwards, J. and Kosikowski, F.V. Bitter Compounds from Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*. 66:727-734, 1983.
9. El-Hagarawy, J.; Slatter, W.; Harper, W. Organic Acid Production by Propionibacteria: I. Effect of strains, pH, carbon source, and intermediate fermentation products. *Journal of Dairy Science*. 40:579-587, 1957.
10. Farrow, J.A.E. Lactose Hydrolysing in Streptococcus lactis and Streptococcus cremoris and also in some other species of Streptococci. *Journal of Applied Bacteriology*. 49:493-503, 1980.

11. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Production Yearbook. Colección FAO. Estadística No. 22. Vol. 34. Roma, 1980.
12. Forss David A. Review of the Progress of Dairy Science. Mechanisms of Formation of Aroma Compounds in Milk and Milk products. Journal of Dairy Research. 46:691-706, 1979.
13. Fox & Yuiney. Journal of Dairy Research. 40:229, 1973. Citado por O'Keefe, 1976.
14. Frazier, W. Food Microbiology. 2a. Ed. Mc.Graw-Hill Book Co., U.S.A., 1976.
15. Green Margaret L. Review of the progress of Dairy Science. Milk Coagulants. Journal of Dairy Research. 44: 159-188, 1977.
16. Green Margaret L. and Marshall, R.J. The acceleration by cationic materials of the coagulation of casein micelles by rennet. Journal of Dairy Research. 44:521-531, 1977.
17. Guthy, Kl. and Novak, G. Observations on the primary phase of milk coagulation by rennet under standardized conditions. Journal of Dairy Science. 44:363-366, 1977.
18. Kato, I. and Ando, K. Action of Renin on Casein. III. Effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein on the secondary phase. Journal of Dairy Science. 63:25-31, 1980.
19. Kilara, Arun. Lactic Fermentations of Dairy Foods and their Biological Significance. Journal of Dairy Science. 61:473-478, 1981.
20. Ledford, R.A. and O'Sullivan. Journal of Dairy Science. 49:1098, 1966. Citado por O'Keefe, 1976.
21. Manning, J. Manning. Chemical production of essential Cheddar Flavour contributions of individual volatile components. Journal of Dairy Research. 46:523-529, 1978.

22. Manning, Donald J. and Moore Caroline. Headspace analysis of hard cheeses. *Journal of Dairy Research*. 46: 539-545, 1979.
23. Manning, Donald J. Cheddar cheese flavour studies I. Production of volatiles and development of flavour during ripening. *Journal of Dairy Research*. 45:479-490, 1978.
24. Manning, Donald J. Cheddar cheese flavour studies II. Relative flavour contributions of individual volatile components. *Journal of Dairy Research*. 46:523-529, 1978.
25. Marcos, A.; Alcalá, M. and Fernández, J. Water Activity and Chemical Composition of Cheese. *Journal of Dairy Science*. 64:622-626, 1981.
26. McKay, Larry L. Microorganisms and their instability in milk and milk products. *Food Technology*. pp. 181-185, May, 1978.
27. Morris, H.A. Cheese Ripening-Trends and Perspectives. *Journal of Dairy Science*. 61:1198-1203, 1978.
28. Mulvihill, Donald and Fox, Patrick. Proteolytic specificity of chymosin of bovine  $\alpha_1$ . *Journal of Dairy Research*. 46:641-651, 1979.
29. O'Keefe, Arthur; Fox, Patrick and Daly, C. Proteolysis in Cheddar Cheese: role of coagulant and starter bacteria. *Journal of Dairy Research*. 45:465-477, 1978.
30. O'Keefe, A.M. and Fox, P.F. Denaturation of porcine pepsin during Cheddar Cheese Manufacture. *Journal of Dairy Research*. 44:335-343, 1977.
31. O'Keefe, R.B. and Fox, P.F. Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Research*. 43:97-107, 1976.
32. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. William Horwitz, Editor. Twelfth Edition, 1975.

33. Paulsen, P.V. Role of Microflora in the Production of Free Fatty Acids. *Journal of Dairy Science*, 1980.
34. Pérez-Gavilán, J. Bioquímica y Microbiología de la Leche. Ed. Limusa, 1a. Edición, 1984.
35. Pillay, V.T. and Myhr, A.N. Lipolysis in milk I. *Journal of Dairy Science*. 63:1213-1218, 1980.
36. Publicación Oficial Bimestral de la Asociación Nacional de Productores de Leche Pura, A.C., 1980-5.
37. Reddy, M.S. and Vedamuth, E.R. Agar Medium for differential Enumeration of Lactic Streptococci. *Applied Microbiology*. 24:947, 1972.
38. Reiter, B. *Journal of Dairy Research*. 36:65, 1969. Citado por O'Keefe, 1976.
39. Reynoso-Bautista, J.J. Tesis Licenciatura. Desarrollo y estandarización de una técnica para la fabricación de un Queso Semimadurado utilizando diversos cultivos lácticos. Universidad Iberoamericana. México, D.F. 1981.
40. Rusoff, L. El Milagro de la Leche. *La Industria Lechera*. 38(441):175-185, Argentina, 1956.
41. Salanitro, J.A. and Muirhead, A. Quantitative Method for the Gas-Chromatographic Analysis of Short-Chain Monocarboxylic and Dicarboxylic Acids in Fermentation Media. *Applied Microbiology*. Vol. 29:374-381, March, 1981.
42. Sears, Y. Alimento de Generaciones. *La Hacienda*. 49(11):35, 1954.
43. Sephadex. Gel-Filtration in theory and practice. *Pharmacia Fine Chemical*. Upplands Grafiska, A.B. Swede, 1974.

44. Stadhouders, J.; Hup, G. and Exterkate, K. Bitter flavour in Cheese 1. Mechanism of the Formation of the bitter flavour in Cheese. *Neth Milk Dairy Journal*. 37: 157-167, 1983.
45. Subsecretaría de Ganadería Dinámica de la Industrialización de la Leche (1965-1975). Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. *Gaceta* 1(10):5-9, 1979.
46. Webb, B.H.; Johnson, A.H. and Alford, J.A. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. 2nd. Edition. Ed. AVI Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut, 1978.
47. Whitaker, J. Biochemical Changes occurring during the fermentation of High-protein Foods. *Food Technology*. pp. 175-180, 1978.
48. Wong, N.P.; Lacroix, D.D.; Vestal, J.H. and Alford, J.A. Composition of Cheddar Cheese made with Different Milk Clotting Enzymes. *Journal of Dairy Science*. 60:1522-1525, 1977.
49. Yamamoto, T. and Yoshitake, M. *International Dairy Congress*, Copenhagen, B. 395, 1962. Citado por O'Keefe, 1976.
50. Yanai, Y.; Rosen, B. and Pinsky, A. The microbiology of pickled cheese during manufacture and naturation. *Journal of Dairy Research*. 44:149-153, 1977.
51. Yang, N.L. and Sandine, W.E. Acid Producing Activity of Lyophilized Lactic Streptococcal Cheese Starter Concentrates. *Journal of Dairy Science*. 62:908-915, 1979.