

00567

1/2
28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO LÁCTEO MODIFICADO
CON EXTRACTO ENZIMÁTICO DE
Penicillium caseicola

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE ALIMENTOS
(QUÍMICA DE ALIMENTOS)
PRESENTA
Q F B ENRIQUE MARTINEZ MANRIQUE

ASESOR DRA AMELIA FARRÉS GONZALEZ-SARAVIA

FALLA DE ORIGEN

ABRIL DE 1995



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Sergio Revah Morsev
Primer Vocal	Dra. Amanda Gálvez Mariscal
Secretario	M en C Ma. del Carmen Wachar Rodarte
Primer Suplente	M en C Daniel Pedrero F
Segundo Suplente	M en C Mariano García Garibay

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO EXPERIMENTAL:

Laboratorio 112 conjunto "E", Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, U N A M

AUSENTE DEL TEMA:

Dra. Amelia Ferris González-Saravia

AUSENTE:

QFB Enrique Martínez Martínez

A mis Padres,

Gracias por su paciencia, por seguir apoyandome en todas las decisiones que tomo y sobre
todo gracias por su amor

A la memoria de mis hermanos,

Rafael y Guillermo, por su apoyo desde las alturas

A mis hermanos,

Daniel, Hector, Victor, Rene, Ernestina y Andres,

por seguir dandome su apoyo siempre que lo necesito y por tenerme paciencia

A mis sobrinos,

Rosalba, Aida, Daniela, Terence, Valeria, Ramona, Victor, Monarrial, Roxio, Andres, Israel,

Francisco, Pablo, Monica, Guillermo, Marnel y,

5 gracias cada quien seran de estimulo para mejorar y seguir adelante siempre

**A mis padrinos,
Felicitas y Enrique,
por su confianza y apoyo.**

**En forma muy especial
a Sandra,**
pues sin su apoyo moral y físico, no habría podido realizar este trabajo. Y como no nos pueden otorgar el grado en forma mancomunada (que tanto se merece), creo que es justo nombrarla Maestra en Ciencias honoraria .
Gracias por tu paciencia.

**A Dios,
por ayudarme a salir adelante,
y sobre todo por darme salud y bienestar.**

AGRADECIMIENTOS

Deseo brindar mi más sincero agradecimiento, por la valiosa ayuda que me brindaron en el desarrollo del presente trabajo, a las siguientes personas:

A la Dra. Amelia Farrés Gonzalez-Saravia, mi asesor de tesis, por aceptarme dentro de su grupo de trabajo y apoyarme siempre, no sólo en el trabajo sino también en las cuestiones personales, y sobre todo, gracias por brindarme su amistad.

A la M. en C. Carmen Labastida del Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, U.N.A.M., por su ayuda en el análisis cromatográfico.

A la Q.F.B. Norma Vázquez del Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., por prestarme su equipo de cromatografía y por sus valiosos consejos.

A la Q.F.B. Victoria Coutiño del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, U.N.A.M., por su orientación y gran ayuda, en la realización de la evaluación sensorial.

A los compañeros del laboratorio 312, conjunto "E" del Departamento de Alimentos y Biotecnología, por su amistad, comprensión y ayuda.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y su paciencia.

A todos los miembros del Departamento de Alimentos y Biotecnología.

ÍDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. GENERALIDADES DE SABOR	2
2.2. SABOR EN PRODUCTOS LÁCTEOS	3
2.3. DESARROLLO DE SABOR EN QUESO	5
3. OBJETIVOS	10
3.1. OBJETIVO GENERAL	10
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	10
4. METODOLOGÍA	11
4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO	11
4.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	12
4.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR	12
4.4. CONSERVACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	13
4.5. DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA LIPASA	13
4.6. PROCESO DE MODIFICACIÓN DEL QUESO	13
4.6.1. SELECCIÓN DE MATERIA PRIMA	13
4.6.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MATERIA PRIMA	14
4.6.2.1. Determinación de hongos y levaduras	14
4.6.2.2. Cuenta de coliformes totales	14
4.6.2.3. Cuenta de coliformes fecales	15
4.6.2.4. Determinación de <i>Salmonella</i>	16
4.6.2.5. Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.6.3. DETERMINACIÓN DE GRASA	17
4.6.4. MEDICIÓN DE pH	17
4.6.5. MEDICIÓN DE ACIDEZ	17
4.6.6. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE FUSIÓN	18
4.6.7. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ENZIMA	18
4.6.8. DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	19
4.6.9. DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE INCUBACIÓN	19
4.6.10. FORMA DE INCORPORACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	19

4.6.11. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES	21
4.7. EVALUACIÓN SENSORIAL	21
4.7.1. PRUEBA DE NIVEL DE AGRADO	21
4.7.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO	23
5.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	23
5.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR	23
5.4. CONSERVACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	24
5.5. DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA LIPASA	25
5.6. PROCESO DE MODIFICACIÓN DEL QUESO	27
5.6.1. SELECCIÓN DE MATERIA PRIMA	27
5.6.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MATERIA PRIMA	27
5.6.3. DETERMINACIÓN DE pH Y ACIDEZ	28
5.6.4. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE FUSIÓN	29
5.6.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA	35
5.6.6. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN	36
5.6.7. DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE INCUBACIÓN	38
5.6.8. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES	40
5.7. EVALUACIÓN SENSORIAL	49
4.7.1. PRUEBA DE NIVEL DE AGRADO	49
4.7.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO	49
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
7. BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXO 1	69
1.1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	69
1.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR	71
ANEXO 2	73
2.1. CUESTIONARIO DE LA PRUEBA DE NIVEL DE AGRADO	73
2.2. LISTA DE DESCRIPTORES DE ACEPTACIÓN DEL QUESO PROCESADO	74
2.3. LISTA DE DESCRIPTORES DE RECHAZO DEL QUESO PROCESADO	75

ANEXO 3	76
3.1. CUESTIONARIO DEL ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO	76
3.2. DESCRIPTORES GENERADOS EN ENTRENAMIENTO DE JUECES	77
3.3. DISCUSIÓN DE DESCRIPTORES Y DEFINICIONES CON LOS JUECES	78
3.4. LISTA DE QUESOS UTILIZADOS EN ENTRENAMIENTO DE JUECES PARA EL ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO	79

1. INTRODUCCIÓN

La hidrólisis de la grasa de la leche catalizada por enzimas lipolíticas principalmente, ha sido un gran problema en la industria de lácteos, debido a la producción de sabores indeseables en la leche, crema, queso y, en general, en productos obtenidos a partir de leche. En los últimos años han sido aplicadas, bajo procesos controlados, estas enzimas, para la generación de sabores deseables en diferentes productos lácteos.

La generación de mayor variedad de sabores es una demanda de los consumidores en busca de nuevos productos. Una demanda adicional es que los mismos tengan un origen natural. La tecnología enzimática ofrece una herramienta poderosa para lograrlo, particularmente al disponer de una amplia gama de enzimas microbianas con diferentes propiedades y especificidades.

En el presente trabajo se emplea el sistema enzimático de *Penicillium caseicolum* para obtener un producto lácteo modificado, el caso específico de queso. Este producto se seleccionó por ser el que ofrece mejores perspectivas de desarrollo en el mercado, pues de los productos lácteos es uno de los de mayor consumo, además de poder proporcionar una alternativa al problema importante de manejo de "excedentes".

Se escogió trabajar con *Penicillium caseicolum* pues se había observado que su actividad lipolítica era mayor al de otros microorganismos como, *G. candidum*, *M. miehei*, *P. camembert* y otros del género *Penicillium* y sólo semejante a *R. delemar* aunque este microorganismo tenía además, una gran actividad proteolítica, lo cual podría ser perjudicial para el proceso de modificación pues posiblemente generaría problemas con el manejo del extracto enzimático, producir sabores indeseables y afectar la textura del producto (comunicación personal Tobalina y Farrés).

Además se emplearon las condiciones de obtención del extracto enzimático de *Penicillium caseicolum* por fermentación sumergida previamente establecidas por el grupo de trabajo, pues se facilitaba el manejo del extracto enzimático en comparación con una fermentación en estado sólido.

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DE SABOR

El hombre, a través de la historia, siempre ha buscado hacer más apetecibles sus alimentos, agregándoles diferentes especias o hierbas aromáticas. Más recientemente se ha obtenido sabores por medios químicos y en los últimos años la generación de sabor se ha desarrollado por métodos biotecnológicos (Mor, 1990).

El sabor, como propiedad de los alimentos es muy importante. A un ingrediente que se agrega para dar un sabor particular a un alimento se le denomina saborizante. Este se puede utilizar en el alimento por diferentes razones: para crear un perfil sensorial del alimento muy diferente, para incrementar la potencia de un sabor específico, simular sabores muy caros, o reemplazar sabores no disponibles (Giese, 1994).

Existen diferentes definiciones de sabor, pero todas ellas tienen coincidencias. Una de las más generales podría ser la siguiente: "la combinación de gusto y olor, que pudieran ser influenciadas por malestar, calor y frío, así como por sensaciones dactilares" (Thomson, 1986).

Los sabores en alimentos pueden estar presentes en forma natural y también pueden ser producidos durante su cocción o procesamiento. Además pueden ser generados por reacciones enzimáticas, o por fermentación microbiana (Mermelstein, 1989).

En los últimos años, la búsqueda de saborizantes de origen natural por el consumidor ha sido cada vez mayor. La Food and Drug Administration (FDA) define como "natural" a los productos provenientes de organismos vivos o sus fuentes derivadas, es decir, productos obtenidos de fermentación, substratos naturales modificados por enzimas, células de plantas y cultivos vegetales (Dziezak, 1986).

Los saborizantes de origen natural en alimentos pueden obtenerse por diferentes formas: extracción, destilación, concentración, hidrólisis y biotecnología (Mor, 1990). Los métodos químicos son extensamente empleados para la generación de saborizantes comerciales, aunque los procesos biológicos, llevados a cabo con enzimas, contribuyen también al desarrollo de éstos.

De los diferentes procesos mencionados anteriormente, el enzimático tiene grandes ventajas sobre los demás. Sus reacciones son específicas, las condiciones de reacción son suaves y se reduce la formación de productos de desecho, evitándose así un costoso tratamiento de éstos (Dziezak, 1986). Otras ventajas consisten en que se necesitan cantidades muy pequeñas de enzima, pueden ser inactivadas fácilmente por cambios de

temperatura o pH y, bajo ciertas condiciones las enzimas pueden ser reutilizadas. Las posibles fuentes de enzimas son: plantas, animales y microorganismos.

Las enzimas generalmente se encuentran en los alimentos por cuatro motivos principales: son inherentes al alimento, son derivadas de contaminación microbiana, se generan por microorganismos adicionados a los alimentos, y por último, son enzimas que se agregan directamente al alimento (Shahani, 1976). Sus principales sustratos en los alimentos son: carbohidratos, lípidos y proteínas (Dziezak, 1986).

2.2. SABOR EN PRODUCTOS LÁCTEOS

El sabor de los productos lácteos se origina por transformaciones microbianas, enzimáticas y/o químicas. Estas transformaciones normalmente producen un aumento en las concentraciones de compuestos volátiles y no volátiles, los cuales están correlacionados con algunas notas de sabores típicos o defectos del sabor. La leche, como ingrediente principal de estos compuestos, provee los sustratos para que se lleven a cabo dichas transformaciones. Los sustratos principales para que ocurran las diferentes reacciones son: la grasa, las proteínas y los carbohidratos de la leche. La grasa de la leche está compuesta principalmente por triacilglicéridos, 97-98% del total, mientras que las principales proteínas que las compone son las caseínas, 82%, y el carbohidrato de la leche es la lactosa (Muir, 1992, Law, 1982). Éstos son los componentes de la leche, que servirán como sustrato para la generación de sabor.

La principal función de la lactosa en el desarrollo de sabores es servir como fuente de carbono para diferentes bacterias. Éstas pueden rápidamente infectar a la leche, y la acidifican al convertir la lactosa a ácido láctico, lo cual es importante en diversos productos, como yogurt y quesos (Pszczola, 1988). El ácido láctico es el responsable del sabor "refrescante" de todos los productos de leche fermentada y aunque no es volátil, sirve como un excelente precursor de más sabores distintivos y aromas característicos de cada tipo de leche fermentada (Marshall, 1984). Además, los ácidos grasos libres y productos de proteólisis limitada son característicos de sabores presentes en otros productos lácteos, como crema, mantequilla, y también de queso y yogurt.

Los causantes de sabores amargos en los productos lácteos son los aminoácidos y péptidos, los cuales son generados como resultado de la hidrólisis de las proteínas de la leche, aunque también puede deberse, pero en mucho menor grado, a una excesiva lipólisis de la grasa de la leche (Schmidt, 1990).

La acción de las lipasas sobre la grasa de la leche para generar ácidos grasos libres, influye sobre el sabor del queso, así como la acción de proteasas sobre las proteínas que generan péptidos y aminoácidos (Bigelis, 1992).

La importancia de los ácidos grasos en la generación de sabores característicos de diferentes productos lácteos es indiscutible y los diferentes ácidos juegan un papel específico para cada sabor característico. Por ejemplo, el ácido butírico es característico del sabor de los quesos Romano y Provolone. Además son precursores de una gran variedad de compuestos que son responsables de sabores característicos como son: β -cetoácidos, metil cetonas, aldehídos y alcoholes (Gatfield, 1988).

Pero como ya se mencionó antes, no sólo se pueden generar sabores agradables en los productos lácteos, también se producen sabores indeseables si no se tienen los cuidados necesarios durante su procesamiento. La grasa de la leche es fuente de ácidos grasos de cadena corta que pueden generar un sabor amargo; también contiene ácidos grasos insaturados y fosfolípidos que pueden ocasionar autooxidación. Las proteínas del suero de la leche son fuente de compuestos sulfurados que son responsables del sabor a cocido en leches que han sido calentadas. Los aminoácidos pueden sufrir reacciones de oscurecimiento no enzimáticas al combinarse con los azúcares, produciendo un sabor a caramelo y la lactosa actúa como sustrato para reacciones microbianas y reacciones de Maillard (Azzara y Campbell, 1992).

En los últimos años se han empleado las enzimas lipolíticas o lipasas, bajo procesos controlados, para la generación de sabores deseables en diferentes productos lácteos. Este tipo de proceso se conoce como lipólisis.

La lipólisis está definida como la hidrólisis catalizada enzimáticamente de triglicéridos produciendo ácidos grasos libres (Arnold, 1975).

Las lipasas tienen diferente especificidad, lo cual afecta su papel e importancia en el desarrollo del sabor. Se dice que el factor principal que desarrolló la llamada "tecnología lipolítica" fue el descubrimiento de una gran variedad de lipasas con diferente especificidad para longitudes de cadena de ácidos grasos, tipo de triglicérido y condiciones físicas del sustrato. La especificidad de la enzima sobre triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos es diferente. Otra característica de especificidad mencionada es la forma física del sustrato, es decir, que varía dependiendo de si el sustrato está en solución o en emulsión. Debido a la mayor superficie grasa-agua que se obtiene con un sustrato emulsificado, que es donde actúa la lipasa; es mejor trabajar con sustratos en estas condiciones. Se ha demostrado que éste es un factor muy importante en la aplicación de lipasas en el desarrollo de sabores en productos

lácteos, porque si el sistema de reacción no está emulsificado, la actividad de la enzima disminuye considerablemente.

La caracterización de las propiedades únicas de varias enzimas lipolíticas y el reconocimiento del sabor potencial que puede resultar de la grasa de la leche por su composición característica de ácidos grasos, han llevado al desarrollo de numerosas aplicaciones de lipólisis controlada para desarrollar saborizantes. Entre ellas se encuentra la modificación enzimática de la grasa de la leche, para el desarrollo de sabor en quesos italianos, americanos y en yogurt. También está la grasa de leche lipolizada para usarse en mantequilla, queso o crema como saborizante.

Las etapas principales para la manufactura de productos lipolizados se menciona a continuación (Moskowitz, 1987).

1. Preparación del sustrato
2. Preparación del sustrato enzimático en solución acuosa y estandarizar su actividad
3. Adición de la enzima al sustrato
4. Homogeneización para formar una emulsión estable y así promover el máximo rango de actividad enzimática
5. Incubación bajo temperatura controlada hasta obtener el grado de lipólisis deseado
6. Inactivación de la enzima
7. Estandarización del producto final
8. Empaque del producto

De los productos que se pueden elaborar con enzimas lipolíticas o lipolizados, uno de los más estudiados es la elaboración de quesos, aunque también se aplican en formulaciones para panadería, en la generación de sabores a mantequilla, y en cremas.

2.3. DESARROLLO DEL SABOR EN QUESOS

El origen de la fabricación de quesos es probablemente tan antiguo como el hombre mismo, pues es posible hallar evidencias de su fabricación en dibujos o escrituras de casi todas las civilizaciones antiguas. Hoy en día el queso se elabora en casi todo el mundo, en una forma o en otra (El Soda, 1986).

Queso es el nombre genérico de un grupo de alimentos obtenidos de leche fermentada (Fox, 1993), o la concentración de sólidos de leche producida por procesos de acidificación y deshidratación (Banks, 1992).

Existen más de 4000 diferentes quesos reconocidos en el mundo y ofrecen un amplio espectro de sabores. Son productos que el consumidor compra por su sabor más que por cualquier otra cosa.

La química del sabor en quesos es compleja, se han identificado una gran variedad de componentes del sabor, por ejemplo en queso Cheddar se han identificado alrededor de 180, mientras que en queso Suizo, 125 aproximadamente (Moskowitz, 1987). Muchos de estos compuestos se encuentran en otros quesos, lo que dificulta la caracterización de el/los componente(s) principal(es) del sabor. Existen ciertos compuestos que pueden ser característicos de un queso; por ejemplo, se determinó que el ácido butírico estaba estrechamente relacionado con el sabor característico de queso Provolona y Romano (Huang y Dooley, 1976).

Una gran cantidad de compuestos producidos durante la maduración está en concentraciones y proporciones relativamente típicas para cada variedad de queso. Un número de las reacciones durante la maduración puede ser acelerada con el uso de enzimas. Los quesos modificados enzimáticamente contendrán casi todos estos compuestos; no obstante, sus concentraciones relativas pueden variar, dependiendo de las condiciones de elaboración del producto.

Algunos de los compuestos importantes identificados en el sabor del queso son: ácidos grasos libres, aldehídos, metil cetonas, ácido láctico, ácido acético y productos de hidrólisis de proteínas como péptidos y aminoácidos. Metil cetonas, etanol, 2-butanol, así como una gran variedad de aldehídos producidos por amino ácidos y aminoras, son importantes componentes del sabor del queso cheddar (Shahani *et al*, 1976)

El desarrollo del sabor en el queso es inicialmente un proceso enzimático. Las primeras enzimas involucradas son la quimosina o renina y posteriormente los cultivos iniciadores. Se complementa con la adición de enzimas como lipasas, adición de microflora secundaria como hongos o levaduras, las enzimas propias de la leche y bacterias no iniciadoras (Steele y Ünü, 1992).

El sabor del queso es determinado en parte por la calidad de la materia prima, por lo que el control del sabor del queso se inicia desde la elaboración, donde se establecen las condiciones para el desarrollo de las actividades biológicas posteriores, por ejemplo, acidez, cepa de microorganismos adecuada, temperatura, etc. Durante la maduración del queso, las condiciones ambientales son controladas para permitir el desarrollo adecuado del sabor, (Kristoffersen, 1973).

Para cualquier tipo de queso, el proceso de maduración puede ser descrito como la serie de reacciones relacionadas con el metabolismo del ácido láctico, lipólisis, oxidación y proteólisis, las cuales pueden ser seguidas por reacciones entre los productos formados en cada vía. Algunas de estas reacciones son, probablemente, puramente químicas, pero en la mayoría de ellas los microorganismos juegan un papel muy importante, a través de sus sistemas enzimáticos (Adda *et al.*, 1978).

La proteólisis y la lipólisis son considerados dos de los procesos de mayor importancia en el complejo fenómeno de maduración de quesos, el cual siempre involucra una gran variedad de cambios físicos, químicos y microbiológicos, que tienen lugar bajo condiciones controladas (Salji y Kroger, 1981).

Los quesos que han sido tratados enzimáticamente para aumentar su sabor, o una porción significativa de su perfil de sabor, pueden ser llamados quesos modificados enzimáticamente (QME) (Moskowitz, 1987). Los quesos modificados enzimáticamente se diferencian de los quesos naturales, en que, en éstos últimos es de gran importancia tanto el sabor como la textura y se consumen directamente, sin necesidad de algún otro proceso (Green, 1984). Mientras que en los quesos modificados lo importante es obtener un producto con un sabor muy intenso y generalmente se utilizan como ingredientes en otros productos como: galletas, chocolates, dips de queso, ensaladas, sopas, cremas etc. (Arnold, *et al.*, 1975; Dziezak, 1986; Moskowitz, 1987; Kilara, 1985).

La enzima para obtener el QME puede ser adicionada durante su elaboración o después que el queso ha sido prensado. La naturaleza del producto es afectada por el tipo de enzima usada, las condiciones de incubación y la etapa en la cual la enzima es adicionada. Los quesos tienen un perfil de sabor característico, que puede ser producido por la adición de enzimas a la leche o a la cuajada fresca. Alternativamente, el mismo proceso puede ser utilizado para producir quesos con sabores fuertes, por alteración de las condiciones de elaboración. Generalmente estos quesos tienen un cuerpo y una textura modificadas que se logra al agregar esporas de hongos que producirán las enzimas modificadoras del sabor y se requiere varios meses para el desarrollo del sabor.

Se pueden obtener sabores intensos en quesos, en tiempos más cortos que los empleados en procesos normales, adicionando la enzima directamente a la cuajada o al queso fundido, seguido por un proceso de incubación controlada, a este proceso se le denomina maduración acelerado (Law, 1984). Este proceso aunque aumenta el sabor del queso, generalmente no llega a los niveles de un QME pero si es mayor que el de un queso natural y es importante el sabor completo del no sólo aumentar ciertas notas, como sucede

en el QME. Además la textura debe cuidarse mucho, pues el queso se consume directamente. Este proceso es importante debido a que se ahorra tiempo de elaboración, lo cual puede reeditar en un menor gasto de fabricación.

Existe otro tipo de queso en el cual se podrían emplear enzimas lipolíticas para incrementar su sabor. Este es el queso procesado, el cual es producido al fundir, un queso natural o una mezcla de ellos con diferente grado de maduración, con agentes emulsificantes (Caric y Kaláb, 1993). Estos quesos tienen ciertas ventajas sobre los quesos naturales como: mantienen su calidad durante más tiempo de almacenaje, se tiene una gran variedad de presentaciones y sabores, así como diferentes envolturas y además se pueden emplear otros ingredientes lácteos o no lácteos. Estos quesos se pueden clasificar, de acuerdo a su contenido de agua y consistencia en: quesos procesados, quesos procesados con ingredientes opcionales como ácidos orgánicos, suero de leche, etc., y quesos procesados con gomas para retener mayor cantidad de agua (Kosikowski, 1982).

Para elaborar estos quesos y obtener sabores más intensos, se pueden utilizar quesos modificados enzimáticamente y otros quesos que han sido tratados con enzimas lipolíticas u otro tipo de enzimas. Para utilizarse lipasas directamente en la elaboración de quesos procesados para modificar su sabor, la limitante que se tendría sería la temperatura de inactivación de la enzima que se deseara usar. Por lo tanto, para salvar este problema se debería tener una enzima muy estable al calor o disminuir la temperatura de fusión del queso. Lo anterior abriría aún más, la variedad de presentaciones y sabores, que se podrían obtener en este tipo de quesos.

Como ya se mencionó anteriormente, junto con la lipólisis ocurre otro proceso que influye también en la generación del sabor, pero en menor grado, e influye más en la textura y presentación del producto. Éste es la proteólisis, que es la hidrólisis de las proteínas presentes en el queso. Este proceso se debe llevar a cabo bajo condiciones controladas utilizando enzimas proteolíticas, ya que una actividad excesiva de las proteasas provocaría sabores amargos en el queso (Pahkala *et al*, 1985), lo cual perjudicaría al producto. Por eso se han realizado estudios para agregar enzimas proteolíticas encapsuladas en liposomas para lograr un mayor control sobre su actividad e incluso poder recuperarla (Aikhalaf *et al*, 1988, 1989).

La proteólisis es de gran importancia debido a que si se maneja adecuadamente se pueden obtener mejores productos que si se usaran sólo lipasas, ya que éstas últimas contribuyen principalmente para dar los sabores deseados en el queso, y las proteasas permiten obtener la textura deseada y notas características del sabor.

Resumiendo, la "tecnología de lipólisis" es de gran importancia para la industria láctea, especialmente para los fabricantes de quesos, debido a los menores problemas que se presentan en ésta con respecto a la tecnología tradicional. Por ejemplo, esta última involucra fermentaciones con varios microorganismos y las reacciones son muy lentas, difíciles de detener y por lo tanto de controlar, lo que provoca que se obtengan productos con calidad variable. Además, el tiempo de elaboración es mayor, creando problemas de almacenamiento y distribución. Lo mencionado anteriormente repercute directamente en el aspecto económico, es decir, se requiere mayor inversión si se desea obtener un producto de calidad y aun con esto se corre un riesgo de no obtener la calidad deseada. En cambio, utilizando enzimas es posible ejercer un control sobre el proceso de elaboración, obteniéndose una calidad uniforme; se disminuyen tiempos de elaboración, sobre todo para los quesos que deben su sabor a un proceso de maduración, teniendo como consecuencia una posible disminución en costos, y si no, cuando menos se asegura la calidad del producto y se protege el prestigio de la empresa que lo elabora, lo cual a la larga repercutirá en una mayor ganancia.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Elaborar un queso procesado y modificar su sabor con el extracto enzimático de *P. caseicolum* y caracterizar el producto final.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Obtención y cuantificación de la lipasa de *Penicillium caseicolum*

Determinación de las condiciones de fusión del queso

Determinación de las condiciones de modificación del queso

Caracterización del producto final mediante cromatografía de gases

Evaluación y caracterización sensorial del queso modificado

4. METODOLOGÍA

4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO

Una cepa de *Penicillium caseicola* proveniente del Cepario de la Facultad de Química, UNAM, se inoculó en cajas Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (Bioxon) y se incubó (Incubadora Precision System, U.S.A.) a 29°C durante seis días hasta su esporulación. Transcurrido ese tiempo se recuperaron las esporas en glicerol al 50%. Se determinó la densidad óptica (Espectrofotómetro Spectronic 21-D, U.S.A.) de la solución de esporas, utilizando como blanco glicerol al 50%, a una longitud de onda de 540nm, colocando un ml de muestra, más tres ml de agua.

Se inoculó un ml de la solución de esporas, con una densidad óptica de 0.12, en el medio de cultivo "D", descrito por Celerin y Fergus (1971), suplementado con casaminoácidos al 1% (Tabla 1) y se incubó durante seis días (Incubadora con agitación orbital New Brunswick G25, U.S.A.) con agitación a 150 rpm y una temperatura de 29°C. El producto de la fermentación se filtró por medio de un sistema Millipore, con papel filtro Whatman no. 1 (diámetro de 4.5 cm), puesto a peso constante en estufa a 60°C, y se determinó la biomasa por diferencia de peso, secandola durante 24 horas a la misma temperatura.

El filtrado fue dializado durante 24 horas, a 5°C contra agua destilada. Después se le determinó actividad lipolítica y proteína extracelular.

TABLA 1
Composición del medio "D" empleado en la obtención del extracto enzimático de
P. caseicola

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Glucosa	10 g/L
Casaminoácidos	10 g/L
KNO ₃	2 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L
Aceite de Olivo	20 ml/L
Solución de Elementos Trazas*	1 ml/L

* Los Elementos traza utilizados son: ZnSO₄.7H₂O=439.6mg/L, Fe(NO₃)₂=723.5mg/L, MnSO₄.4H₂O=203mg/L.

4.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

La actividad lipolítica fue determinada por caída de pH provocado por la liberación de ácido butírico sobre tributirina, al 5% (v/v) en agua desmineralizada a 4°C y 0.05% de Tween 80 (Polyoxyethyl-2-sorbitan-mono-oleato, Sigma), en amortiguador Tris-maleatos 1.25 mM pH 6.0 homogeneizada bajo las condiciones de reacción propuestas por Espinosa (1990). Se midió el pH en el Potenciómetro Corning M103, U.S.A. colocando su electrodo en un tubo de vidrio, dispuesto en un recipiente con agua con un control de temperatura Termomix Neslab, U.S.A. y agitación magnética Coming, Stirrer PC-353, U.S.A.. Se preparó una solución de tributirina.

Se mezclaron siete ml del amortiguador Tris-maleatos, dos ml de tributirina homogeneizada y un ml de extracto enzimático a 37°C y con agitación moderada. Se registró el pH en el punto inicial y después a intervalos de un minuto, durante cinco minutos de reacción. Los resultados se reportaron como unidades de lipasa (UL), definidas como la cantidad de enzima capaz de liberar un μmol de ácido butírico en un minuto, al compararse contra una curva patrón de caída de pH con ácido butírico.

4.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR

La proteína extracelular se midió utilizando el método propuesto por Bradford (1976), que implica la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) a la proteína, que provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm, y en esta última longitud de onda se monitorea.

Se preparó una solución alcohólica-ácida de Azul de Coomassie G-250 al 0.01% , disolviendo el colorante en etanol al 95% y agregándole ácido fosfórico al 5% (p/v) . La solución se filtró con papel filtro Whatman no. 5 hasta que quedó una solución rojiza-café. Se preparó también una solución de cloruro de sodio 0.15M y una solución de albúmina sérica bovina (Sigma) con una concentración máxima de 100 $\mu\text{g}/0.1$ ml.

En un tubo de ensayo (12 X 100 mm) se agregaron 0.05 ml de la solución de cloruro de sodio, 0.05 ml del extracto enzimático y cinco ml de la solución de Azul de Coomassie. Se agitó en un Vortex (Fisherbrand, U.S.A.) y se dejó reposar durante diez minutos, después se determinó la densidad óptica (espectrofotómetro Spectronic 21-D, U.S.A.) a una longitud de onda de 595 nm.

La cantidad de proteína se determinó comparando la absorbancia obtenida contra una curva patrón realizada con albúmina sérica bovina de 0-100 $\mu\text{g}/0.1$ ml.

4.4. CONSERVACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Se establecieron tres diferentes condiciones de conservación del extracto enzimático: refrigeración, congelación y liofilización.

Al extracto enzimático obtenido se le determinó la actividad lipolítica, después se colocó en ampollitas de 10 ml de capacidad, de éstas, tres se colocaron a temperatura de refrigeración a 5°C, otras tres se guardaron a -15°C y se liofilizó un número igual y se mantuvieron en un desecador. Se mantuvieron en las condiciones antes descritas durante 6 semanas. Transcurrido este tiempo, se determinó nuevamente la actividad lipolítica de los extractos y se comparó con la actividad inicial, que fue considerada como el 100%.

4.5. DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA LIPASA

Se disolvieron tres ampollitas con extracto liofilizado (cada una contenía diez ml de extracto enzimático antes de liofilizarse) en 15 ml de agua destilada, colocándose 1.5 ml en tubos de ensayo (12 X100 mm) con tapón de rosca. Se incubaron por triplicado a diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70°C) durante 15 minutos, manteniéndose un control a temperatura ambiente. Posteriormente se determinó la actividad lipolítica al extracto de los tubos de cada condición. El control se consideró como el 100% de actividad.

4.6. PROCESO DE MODIFICACIÓN DEL QUESO

4.6.1. SELECCIÓN DE MATERIA PRIMA

Partiendo de la premisa de que con materia prima de mala calidad se obtendrá un producto final de mala calidad, la selección de la materia prima es de suma importancia en el presente trabajo. Entre las características más importantes a evaluar se encuentran la cantidad de grasa, el pH y la calidad microbiológica del queso que se utilizara como materia prima. La cantidad de grasa y el pH son parámetros muy importantes, el primero es quizás el más importante, porque es el sustrato que la lipasa utilizara en el proceso para la generación de sabor, pues quesos elaborados con suero de leche o con bajo contenido de grasa no desarrollan sabores intensos, por ejemplo, sólo quesos con 50% de grasa (base seca) o más desarrollaran un sabor típico de quesos cheddar (Margalit, 1981). El pH es importante en el proceso de fusión del queso, normalmente se recomiendan valores entre 5.5-6 (Patart, 1990). La calidad microbiológica no es menos importante, pues la presencia de microorganismos no deseados puede afectar el proceso si éstos utilizan el sustrato de la

lipasa, si generan compuestos que alteren el sabor del producto o si producen enzimas lipolíticas exocelulares, ésto alterara los resultados que se obtengan. Por otra parte, si se presenta contaminación por microorganismos patógenos, se corren graves riesgos de salud ya que el producto será consumido directamente, es decir, el consumidor no le proporcionara algún tratamiento o procesamiento, que pudiera eliminar los microorganismos, antes de consumirlo.

4.6.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MATERIA PRIMA

Se seleccionó como materia prima queso tipo Manchego marca Caperucita y se le realizaron las siguientes pruebas microbiológicas, tanto a la materia prima como al producto final utilizado en las evaluaciones sensoriales.

4.6.2.1. Determinación de Hongos y Levaduras.

Se pesaron diez gramos de muestra y se homogeneizaron en licuadora con 90 ml de una solución amortiguadora de fosfato monopotásico estéril, ajustado a pH de 7.2 con hidróxido de sodio 1 N. De esta solución se tomaron diez ml y se pasaron a un matraz con 90 ml de solución amortiguadora, repitiéndose la operación en otro matraz. De cada dilución se tomó un ml para verterlo en una caja Petri y agregar de 12 a 15 ml de medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) acidificado, fundido y mantenido a una temperatura de 45-48°C. Se homogeneizó y se dejó solidificar. Una serie de cajas se incubó a 22 °C durante 5 días y la otra serie a 35°C durante 48 horas. La cuenta de colonias de hongos se realizó de la serie incubada a 22°C, y las colonias de levaduras de las incubadas a 35°C y también de las de 22°C, según donde fue mas elevado el número de colonias. El número de colonias encontradas se multiplicó por el inverso de la dilución, para determinar la cuenta de hongos y levaduras por gramo. Cada dilución se realizó por triplicado (NOM-F-255-1978)

4.6.2.2. Cuenta de Coliformes Totales.

Se realizó un recuento de colonias en medio sólido, para lo cual se transfirió un ml de cada dilución, de 10E-1 hasta 10E-5 a cajas Petri, y después se agregó 12 a 15 ml del medio Agar Bilis Rojo Violeta (Bioxon) fundido a 44-46°C. Se dejó solidificar y se incubaron las cajas en posición invertida durante 24 horas a 32-35°C.

Se contaron las colonias rojo obscuro, con halo de precipitación y diámetro de 0.5 mm o mayor, que se consideran como típicas de organismos coliformes.

También se realizó el recuento por dilución en tubo, inoculándose un ml por dilución a cada uno de tres tubos que contenían diez ml del medio de Caldo Lauril Sulfato Triptosa (Oxoid). Se incubaron los tubos por 48 horas a 35°C. Se examinaron a las 24 horas y se observó si existía acumulación de gas en la campana de fermentación que tenía cada tubo. La presencia de gas, en cualquier cantidad dentro de 48 horas, hace la prueba positiva.

Prueba confirmativa. Se agitaron suavemente los tubos positivos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa (Oxoid) que resultaron positivos en la prueba presuntiva. Se transfirieron de una a dos asadas de cada tubo a otros que contenían el Caldo Lactosa Billa Verde Brillante (LBVB) (Bioxon) al 2%. Estos tubos se incubaron por 48 horas a 35°C y se realizó la lectura correspondiente sobre la producción de gas. Se determinó el número de microorganismos de acuerdo con la tabla publicada en la Norma Oficial Mexicana (NOM-F-254-1977), tomando como base el número de tubos en los que resultó positiva la producción de gas en 48 horas a 35°C. Las diferentes pruebas se realizaron por duplicado.

4.6.2.3. Cuenta de Coliformes Fecales

Prueba presuntiva. Se inoculó un ml de cada dilución, desde 10E-1 hasta 10E-5, a cada tubo con diez ml de Caldo Lauril Sulfato Triptosa. Se incubaron durante 48 horas a 35°C. Se revisó a las 24 horas si existía producción de gas en las campanas de fermentación, se reincubaron otras 24 horas. La presencia de gas dentro de las 48 horas indicó que la prueba era positiva.

Prueba confirmativa. Los tubos positivos de la prueba anterior se agitaron suavemente y se transfirieron de dos a tres asadas de cada tubo a otros con Caldo EC (Oxoid). Los tubos se incubaron 48 horas a 44.5°C. Se revisó producción de gas a las 24 y 48 horas de incubación, considerándose positiva la prueba si se generó gas dentro de las 48 horas. En forma paralela se transfirieron de dos a tres asadas de los tubos positivos de la prueba presuntiva, a tubos con Caldo Lactosa Billa Verde Brillante y agua peptonada. Se incubaron los tubos durante 48 horas a 44.5°C. Se revisó la producción de gas a las 24 y 48 horas. Además se adicionó a los tubos con agua peptonada de dos a tres gotas del reactivo de Kovac (prueba del Indol). Una coloración roja hace positiva la prueba.

Los resultados se reportaron como Número Más Probable (NMP) por gramo de muestra, según los tubos que hayan dado positivo las pruebas de EC, Lactosa Billa Verde Brillante y agua peptonada de acuerdo a la tabla que se publica en la Norma Oficial Mexicana (NOM-F-308-1992). La pruebas se realizaron por triplicado.

4.6.2.4. Determinación de *Salmonella*

Considerando que la técnica para la determinación de *Salmonella* es muy extensa, sólo se referirán los pasos generales que se siguieron de la metodología establecida por la Norma Oficial Mexicana (NOM-F-304-1977).

Se preparó la muestra y se transfirió al medio de pre-enriquecimiento (agua peptonada). Se pasó al enriquecimiento (Caldo Selenita Cistina y Caldo Tetratiónato marca Oxoid). Se continuó con el aislamiento (Agar Sulfito de Bismuto, Agar SS, Agar Mac Conkey, Agar Verde Brillante, marca Bioxon). De las colonias típicas se inocularon en tubos de Agar TSI por estría y picadura. Las colonias que dieron positivo se les aplicaron las pruebas bioquímicas (Agar Citrato de Simmons, SIM, Caldo Surraco, Ureasa, Caldo RM-VP, Malonato, Manitol, marca Oxoid). Las pruebas serológicas no se realizaron.

4.6.2.5. Determinación de *Staphylococcus aureus*

Método de Baird Parker. Se colocó 0.1 ml de cada dilución, 10E-1 a 10E-3, sobre una placa con agar Baird Parker (Oxoid) y se extendió con una varilla de vidrio, se incubaron las cajas invertidas a 35-37°C durante 24-48 horas. A las 24 horas se seleccionaron las cajas que tuvieron de 50 a 150 colonias aisladas, se contaron y marcaron aquéllas que parecieron negras y brillantes con o sin ligero borde blanco y rodeadas por una zona clara en el fondo opaco. Esas colonias se dejan incubar otras 24 horas. Se suman las colonias características que hayan aparecido, se escoge la caja que contenga más de 150 colonias sospechosas y se efectúa la prueba de coagulasa.

Método Vogel Johnson. Se transfirieron 0.5 ml de cada dilución a tubos con Caldo Soya Tripticasa (Oxoid). Se incubó a 35°C durante 48 horas. Se inoculó de los tubos con desarrollo a placas de agar Vogel Johnson para obtener colonias aisladas. Se incubó a 35°C durante 48 horas. Se seleccionaron las colonias negras (reductoras de telurito) convexas, brillantes y se efectuó la prueba de la coagulasa.

Prueba de Coagulasa. Se sembró el número de colonias sospechosas que correspondía según el cuadro presentado en la Norma Oficial Mexicana (NOM-F-310-1978), a tubos con tres ml de caldo Infusión Cerebro-Corazón (Difco) y se incubó a 35-37°C durante 24 horas. Se agregó 0.3 ml de plasma y se incubó a 35-37°C y se observó a intervalos de una hasta seis horas. Si hubo formación de coágulo la prueba fue positiva.

4.6.3. DETERMINACIÓN DE GRASA

Se empleó el método de Gerber establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-F-307-S-1980). Se transfirieron diez mililitros de ácido sulfúrico, enfriado a no más de 15°C, a un butirómetro de Van Gulik, se adicionaron tres gramos de queso, a una temperatura no mayor de 15°C y un mililitro de alcohol isoamílico, se tapa el butirómetro y se agita con cuidado voltenándolo hacia abajo y hacia arriba, después se coloca en la centrifuga de Gerber y centrifugar durante cinco minutos. Cumplido el tiempo de centrifugación, sacar el butirómetro y leer de inmediato el porcentaje de grasa sobre la escala, haciendo coincidir la base de la columna de grasa con el cero, por medio del ajuste del tapón,

4.6.4. MEDICIÓN DE pH

Para la determinación del pH, se pesó un gramo de muestra y se trituró en un mortero pasándose a un vaso de precipitados con ayuda de diez ml de agua destilada. Se introdujo directamente el electrodo de vidrio del potenciómetro (Coming M103, U.S.A.), previamente calibrado con solución amortiguadora, en el vaso de precipitados y se leyó el valor de pH directamente (NOM-F-99-1970).

4.6.5. MEDICIÓN DE ACIDEZ

La determinación se basó en lo establecido por Hegan *et al.* (1991) y SEP (1993) y consistió en pesar diez gramos de queso finamente picado, que se aforaron a 100 ml con agua destilada a 40°C. Se licuó la muestra. Se filtró la solución en embudo Buckner y matraz Kitasato al vacío. Se tomaron 25 ml del filtrado, que corresponde a 2.5 g de muestra, se vertieron en un matraz Erlenmeyer. Se agregaron cinco gotas de fenolftaleína como indicador y se valoró con una solución de hidróxido de sodio 0.1N. La acidez se determinó como % ácido butírico.

La técnica empleada tiene ciertas limitantes, una de ellas es que, como la determinación se realiza en solución acuosa, el % de acidez se determina con base en ácidos solubles en agua como son: ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico y ácido butírico principalmente. Los tres primeros no son producto de lipólisis son generados por bacterias lácticas (Margalit, 1981), sólo el butírico puede ser generado por lipólisis, por lo que el seguimiento de la actividad lipolítica podría resultar alterada por la acción de estos ácidos. Además el ácido butírico puede ser también generado por la fermentación de la lactosa y del ácido láctico (Choisy *et al.*, 1990).

Para poder determinar si la acidez generada durante el proceso de modificación del sabor, estaba siendo medida correctamente, considerando principalmente al ácido butírico generado por la lipasa presente en el extracto enzimático, se corrió en forma paralela un blanco que no contenía el extracto. Si la acidez que se determinaba, estaba siendo producida por otro agente ajeno al extracto enzimático, se detectaría en el blanco un aumento de acidez. También, como se ha demostrado que la lipasa de *Penicillium caseicola* tiene mayor afinidad por el ácido butírico que por otros ácidos grasos contenidos en la grasa de la leche (Alhir *et al*, 1990), se pensó que el seguimiento de la generación de este ácido, daría una idea bastante aproximada de la actividad de la lipasa durante el proceso de modificación.

4.6.6. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE FUSIÓN

Se picaron finamente 50 g de queso, se colocó en vasos de precipitado Pyrex de 250 ml y se llevaron a un baño con agitación rotatoria y control de temperatura (incubadora con agitación orbital New Brunswick G25, U.S.A.), aumentando esta última 1°C/min hasta llegar a 45°C. Se agregaron sales de fusión, probándose tres diferentes tipos de sales: citrato de sodio, polifosfatos y una mezcla de sales comerciales (Mezcla de Joha C con 69.7% de P₂O₅ y Joha T con 40-42% P₂O₅ marca Vigusa) además de probarse un blanco sin sales. Se agregaron a una concentración de 3% con respecto al peso del queso (Patart, 1990) y disueltas en cinco ml de agua destilada. Además se agregaron a diferentes temperaturas (25, 30 y 35°C). Las diferentes condiciones se probaron por triplicado y se evaluaron de acuerdo a la textura, separación de fases y temperatura de fusión que se generaban en el producto.

Al llegar a 45°C se agregó un ml de extracto enzimático, se mezcló perfectamente y se pasó a un frasco estéril para colocarlo a temperatura constante (incubadora Precision) durante 4 días, a lo que se llamó proceso de maduración o incubación.

4.6.7. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ENZIMA

Se llevó a cabo el proceso de fusión en el que se agregó un ml de extracto enzimático a 50g de queso, con diferentes actividades lipolítica (23.7, 43.1, 69.9 y 108 UL). Se realizó el seguimiento del proceso de maduración determinando pH y acidez: cada 24 horas durante cuatro días. Se corrió un blanco sin extracto enzimático. Los parámetros evaluados en las diferentes condiciones se determinaron por triplicado.

4.6.8. DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

Para determinar la temperatura de incubación, se siguió el proceso general de fusión y se probaron dos temperaturas, 29 y 37 °C. Se realizó un seguimiento del desarrollo de acidez y pH cada 24 horas durante cuatro días. Se corrió un blanco para cada temperatura sin extracto enzimático. Las diferentes condiciones se probaron por triplicado y se determinó su efecto mediante un análisis de varianza ($p \leq 0.05$ y 0.01).

4.6.9. DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE INCUBACIÓN

Para realizar esta determinación se realizó el seguimiento del proceso de maduración midiendo acidez y pH cada 24 horas durante siete días. Se corrió un blanco sin extracto enzimático, en forma paralela. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

4.6.10. FORMA DE INCORPORACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Se probaron dos diferentes formas de incorporación del extracto enzimático. El primero consistió en agregar 1 ml en el vaso de precipitados donde se realiza la fusión del queso y la segunda se agregó en el frasco de incubación, en la misma cantidad. Las condiciones se ensayaron por triplicado y se determinó su efecto realizando un análisis de varianza ($p \leq 0.05$ y 0.01).

Se pensó que la forma de incorporación del extracto lipolítico al queso durante el proceso de modificación podía influir en la acción de la enzima, pues como se mencionó antes, la enzima se agregaba al vaso en el que se fundía el queso y después se pasaba a otro recipiente para incubarlo. Lo que se deseaba probar es que al transferir el producto de un recipiente a otro, el extracto no se quedara en el primero o que no se mantuviera la emulsión y que esto se reflejara en una menor generación de acidez, lo cual indicaría que se perdía enzima al realizar la operación, pues las otras condiciones se mantendrían constantes.

Los resultados mostraron (Figura 1) que existía una mayor generación de acidez cuando se agregaba el extracto directamente en el vaso de incubación. Para determinar si la diferencia era significativa entre las dos condiciones, se realizó un análisis de varianza ($p \leq 0.01$), el cual mostró que realmente la diferencia fue significativa (Tabla 2).

4.6.8. DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

Para determinar la temperatura de incubación, se siguió el proceso general de fusión y se probaron dos temperaturas, 29 y 37 °C. Se realizó un seguimiento del desarrollo de acidez y pH cada 24 horas durante cuatro días. Se corrió un blanco para cada temperatura sin extracto enzimático. Las diferentes condiciones se probaron por triplicado y se determinó su efecto mediante un análisis de varianza ($p \leq 0.05$ y 0.01).

4.6.9. DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE INCUBACIÓN

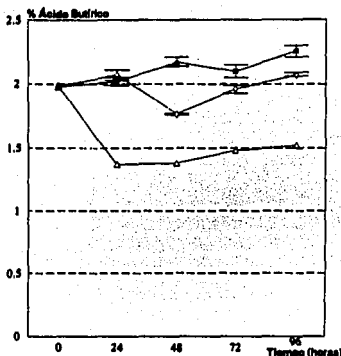
Para realizar esta determinación se realizó el seguimiento del proceso de maduración midiendo acidez y pH cada 24 horas durante siete días. Se corrió un blanco sin extracto enzimático, en forma paralela. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

4.6.10. FORMA DE INCORPORACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Se probaron dos diferentes formas de incorporación del extracto enzimático. El primero consistió en agregar 1 ml en el vaso de precipitados donde se realiza la fusión del queso y la segunda se agregó en el frasco de incubación, en la misma cantidad. Las condiciones se ensayaron por triplicado y se determinó su efecto realizando un análisis de varianza ($p \leq 0.05$ y 0.01).

Se pensó que la forma de incorporación del extracto lipolítico al queso durante el proceso de modificación podía influir en la acción de la enzima, pues como se mencionó antes, la enzima se agregaba al vaso en el que se fundía el queso y después se pasaba a otro recipiente para incubarlo. Lo que se deseaba probar es que al transferir el producto de un recipiente a otro, el extracto no se quedara en el primero o que no se mantuviera la emulsión y que esto se reflejara en una menor generación de acidez, lo cual indicaría que se perdía enzima al realizar la operación, pues las otras condiciones se mantendrían constantes.

Los resultados mostraron (Figura 1) que existía una mayor generación de acidez cuando se agregaba el extracto directamente en el vaso de incubación. Para determinar si la diferencia era significativa entre las dos condiciones, se realizó un análisis de varianza ($p \leq 0.01$), el cual mostró que realmente la diferencia fue significativa (Tabla 2).



EN VASO DE INCUBACION	↔	1.98	2.02	2.17	2.1	2.26
EN VASO DE FUSION	↔	1.98	2.07	1.766	1.96	2.07
BLANCO	↔	1.98	1.37	1.38	1.48	1.52

FIGURA 1. Comparación de la acidez generada, cuando se agrega el extracto enzimático en el vaso donde se fundió el queso y cuando se agrega en el vaso que se incubó el mismo queso. El blanco no contiene extracto enzimático.

TABLA 2

Análisis de varianza para comparar la generación de acidez al variar la forma de incorporación del extracto enzimático. Se agregó en el vaso de incubación o en el vaso de fusión.

Variable	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F
Forma de Incorporación del Extracto Enzimático	1	0.1178	0.1178	10.6161**
Error	28	0.3107	0.0111	
Total	29	0.4285		

** Existe diferencia significativa entre las formas de incorporación del extracto enzimático $p < 0.01$

Lo anterior nos indicó que se pudo perder cierta cantidad de extracto al realizar el cambio de recipiente y que la emulsión pudo sufrir modificación aunque a simple vista no se noto. Por lo tanto para el presente trabajo se escogió agregar el extracto en el vaso de incubación.

4.6.11. CUANTIFICACION DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES (AGL)

A un gramo de queso finamente picado se le agregaron cinco ml de éter etílico, un ml de ácido sulfúrico 4 N y 2.5 g de sulfato de sodio anhidro. Se trituró la mezcla y se dejó reposar por lo menos una hora antes de añadirle cinco ml de hexano. Se centrifugó a 2000 rpm (Centrifuga Sol Bat, U.S.A.) durante cinco minutos. El sobrenadante separado se pasó por una columna que contenía un gramo de alúmina neutra grado IV inactivada con 4 % de agua (Sigma). El eluido se pasó dos veces por la columna y se lavó con una mezcla de hexano-éter dietílico (1:1) y se secó al vacío. La alúmina se mezcló con éter diisopropílico que contenía 6 % (v/v) de ácido fórmico, se mezcló vigorosamente y se centrifugó en viales de 1.5 ml en una microcentrifuga (Eppendorf 5415C, Brinkmann Instruments, Alemania) a 5000 rpm/5min. El sobrenadante se separó en viales y se mantuvieron a -15°C hasta que se realizaron las determinaciones.

Los AGL se cuantificaron en un cromatógrafo de gases (Varian 3700, U.S.A.) equipado con un integrador (Varian 4290, U.S.A.) y una columna de vidrio 10 % SP-216-PS en 100/120 Supelcoport con las condiciones descritas por Deeth *et al.* (1983). Se obtuvieron los perfiles de modificación a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Se analizaron las cinéticas y velocidades de liberación de los ácidos grasos libres C:4, C:6, C:8, C:10, C:12, C:14, C:16, C:17, C:18:1. Además se obtuvo el perfil de AGL de las muestras empleadas en las pruebas sensoriales.

4.7. EVALUACIÓN SENSORIAL

4.7.1. PRUEBA DE NIVEL DE AGRADO

Se proporcionaron aproximadamente cinco gramos de queso procesado en pequeños recipientes de plástico, los cuales se colocaron en paneles en donde se llevó a cabo la prueba. A cada juez se le proporcionó un lápiz y la hoja del cuestionario (Anexo 2.1.) y se les indicó que leyeran las instrucciones con atención y si tenían alguna duda preguntarían, además de dar una explicación oral. Los jueces fueron 100 personas, estudiantes,

trabajadores y visitantes del conjunto "E" de la Facultad de Química, UNAM, en donde se efectuó la prueba.

Los jueces señalaron su nivel de agrado en una escala de -5 a 5 y se realizó el análisis de los datos obtenidos, calculando la media y la desviación estándar para determinar la aceptación del producto por parte del consumidor (Pedrero y Pangborn, 1989)

4.7.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO

Todo el trabajo de la presente prueba se realizó en el laboratorio de Análisis Sensorial, Departamento de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.

Selección de jueces. La selección de los jueces se realizó entre personas que tuvieran conocimiento sobre el tipo de análisis que se realizaría. Se escogieron cinco y se les dió una plática de información sobre el proyecto y los objetivos de la prueba.

Entrenamiento. La segunda etapa consistió en el entrenamiento de los jueces que se realizó en cuatro sesiones de dos horas de duración, en las que se les dió a probar una gama de diferentes tipos de quesos, que abarcaban desde los denominados como frescos hasta los madurados, incluyendo el queso procesado. Se les pidió que describieran los atributos sensoriales que percibieran en cada una de las muestras proporcionadas.

Selección de Información. En una tercera etapa se analizó la información generada en la etapa previa, obteniéndose los descriptores más importantes para el análisis que se deseaba realizar. Estos descriptores se discutieron en dos sesiones de trabajo para que los jueces se pusieran de acuerdo y homogeneizaran el "criterio y lenguaje sensorial" con el que realizarían la evaluación del queso procesado. Además se definieron los patrones o referencias que describirían cada atributo que se mediría.

Evaluación del queso procesado. Se llevaron a cabo cinco pruebas del queso modificado, en diferentes días cada una, en las que se proporcionó en una charola, además del producto modificado, dos quesos diferentes (queso manchego y brie), para que se calificaran también y poder compararlos con el modificado. Además se les proporcionó otra charola con las referencias de los descriptores, la hoja del cuestionario con los atributos a evaluar y un lápiz.

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de un Análisis de Varianza de dos vías y una prueba de rango múltiple (Duncan). La metodología anterior tuvo como sustento teórico lo expresado por Stone *et al*, (1974); Zook y Wessman, (1977); Sidel y Stone, (1976).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO

Las condiciones que se emplearon para la obtención del extracto fueron determinadas previamente dentro del grupo de trabajo (Tobalina *et al.*, 1990; Tobalina comunicación personal). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1 y, como se puede observar, no existió gran variabilidad entre las réplicas, considerando que el coeficiente de variación está entre 6 y 8 %. Estos valores se cuantificaron para establecer las características generales del extracto con el que se trabajó y utilizar, dentro de lo posible, siempre un extracto que cumpliera con condiciones semejantes.

TABLA 1
Resultados de obtención del extracto enzimático de *P. caesiolum*

ESTADÍSTICA	BIOMASA mg/ml	PROTEÍNA EXTRACELULAR µg/ml	ACTIVIDAD LIPOLÍTICA UL	ACTIVIDAD ESPECÍFICA µM Ac. Estérico µg Prot.
PROMEDIO DE TRES REPLICAS	21.71	27.5	118.57	4.31
*DS	1.5825	1.7321	7.5450	0.2586
**CV (%)	7.2	6.29	6.36	6.0

*Desviación estándar

**Coeficiente de variación

5.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

El método que se empleó en el presente trabajo fue el de caída de pH y los resultados obtenidos de la validación de este método se presentan en el Anexo 1.1.

5.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR

La cuantificación de proteína extracelular se realizó por el método propuesto por Bradford (1976) y los resultados de la validación del método se presentan en el Anexo 1.2.

5.4. CONSERVACIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Una vez obtenido el extracto enzimático, se determinó la forma más adecuada de su conservación. Se examinaron las formas más comunes de conservación: refrigeración, congelación y liofilización, pues se contaba con el equipo necesario y no requería de mayor sofisticación el realizarlas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2, y se puede observar que los mejores porcentajes de actividad, después de 6 semanas de almacenamiento, se presentaron cuando se liofilizó la muestra, ya que no sólo se mantuvo la actividad sino que se concentró. Ésto podría ser porque se elimina el agua y ésto disminuye la actividad enzimática del extracto, evitando que la lipasa pueda ser degradada por proteasas presentes en él, y además, porque se puede resuspender la muestra en un volumen menor al que se liofiliza.

TABLA 2

Conservación de extracto enzimático en diferentes condiciones de almacenamiento

EXTRACTO RECIÉN OBTENIDO (% Actividad Inicial)	REFRIGERACIÓN 5°C % Actividad remanente después de 6 semanas *	CONGELACIÓN -15°C % Actividad remanente después de 6 semanas *	LIOFILIZACIÓN % Actividad remanente después de 6 semanas *
100	28.46		
100		68.77	
100			144.28

* Promedios de tres replicas

Si bien de los tres procesos utilizados el de mayor complejidad, por el equipo que se requiere y la forma en que se prepara la muestra, es el de liofilización, este proceso fue el seleccionado, por los resultados que se obtuvieron tomando en cuenta que realmente existe diferencia altamente significativa entre las muestras para $p < 0.01$ (Tabla 3). Además al liofilizar las muestras, se disminuye notablemente la posibilidad de contaminación y se pueden obtener diferentes concentraciones de enzima, variando la cantidad de agua en la que se resuspenda la muestra liofilizada.

TABLA 3
Análisis de Varianza para diferentes condiciones
de conservación del extracto enzimático de
P. caseicola

Condiciones	Promedio %Actividad Remanente	Varianza	N
Refrigeración	28.46	0.1766	3
Congelación	68.77	0.0506	3
Liofilización	144.28	0.1056	3

F = 93453.37 Para ps0.01 Si existe
diferencia significativa
entre promedios

5.5. DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA LIPASA

En la elaboración de quesos modificados enzimáticamente, uno de los puntos críticos es la incorporación de la enzima al producto lácteo (Moskowitz y Noelck, 1987). Esto es particularmente importante en el caso del presente trabajo, en el que se tenía que fundir el queso para formar una emulsión en la que pudiera actuar la lipasa, ya que la misma actuara en interfase agua-aceite (Whitaker, 1972; Arnold, 1975; Shwimmer, 1981; Junge, 1984; Stauffer, 1989; Brady *et al.*, 1990; Godfredsen, 1990). Para lograrlo resulta crítica la temperatura de incorporación de la enzima al producto lácteo para iniciar el proceso de modificación.

Por lo mencionado anteriormente fué necesario determinar la estabilidad térmica de la lipasa, para así establecer la temperatura máxima a la que se podría trabajar sin que la enzima sufriera algún daño. Como se muestra en la Figura 1, la enzima mantuvo su actividad casi sin cambio hasta los 50°C, pero por arriba de esta temperatura decrece notablemente hasta perderla por completo a 60°C, posiblemente por desnaturalización o algún cambio en la estructura de su sitio activo.

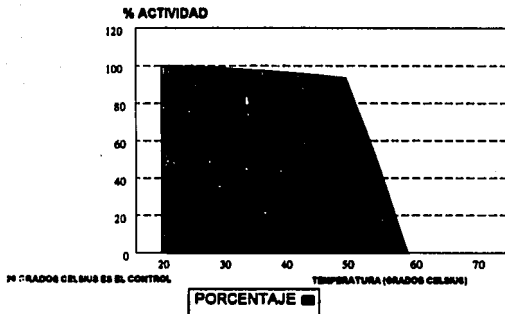


FIGURA 1. Estabilidad térmica de lipasa de *P. caesicolum* donde el porcentaje se refiere a la actividad remanente. Las condiciones de reacción se especifican en la metodología (4.5).

5.6. PROCESO DE MODIFICACIÓN DEL QUESO

5.6.1. SELECCIÓN DE MATERIA PRIMA

En estudios previos realizados dentro del grupo de investigación, se habían evaluado diferentes tipos de queso que podrían servir como materia prima para elaborar productos modificados (Nurko, 1990). En ellos se determinó que el queso tipo manchego marca Caperucita cumplía con las condiciones requeridas, ya que tenía una calidad microbiológica buena y constante, además de otras características fisicoquímicas importantes para el proceso, como buena consistencia para fundir, es decir, existía menos separación de grasa durante el calentamiento que en los otros quesos que se examinaron, así como cumplir con el contenido de grasa que marca la norma y tener un pH inicial adecuado para el proceso de fusión. Las características señaladas se corroboraron en el presente trabajo, lo que confirmó la calidad constante del queso.

5.6.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MATERIA PRIMA

El control microbiológico fué un factor primordial para determinar la calidad de la materia prima con la que se trabajó, ya que la presencia de microorganismos no deseados implicaba, desde el punto de vista técnico, tener otras variables en nuestro producto que no estarían bajo control, y desde el punto de vista sanitario, la posible presencia de microorganismos patógenos en el queso podría ocasionar problemas de salud en quienes lo consumieran. Además se necesitaba que la calidad de la materia prima no sólo fuera buena, sino que también fuera constante.

Para empezar a trabajar con el queso antes mencionado, se le realizaron nuevamente las pruebas de calidad microbiológica establecidas por la Norma Oficial Mexicana para queso tipo manchego (NOM-F-462-184) y el valor de pH, el cual es indicador de la calidad y fue un parámetro de control durante el desarrollo de la investigación.

Los resultados se pueden observar en la Tabla 4 comparados con lo que determina la Norma Oficial Mexicana. Se pudo confirmar la buena calidad del queso, ya que cumple con las especificaciones que se estipulen. Por lo tanto, se decidió continuar trabajando con este producto, ya que ofreció la seguridad de tener una materia prima de calidad buena y constante.

TABLA 4
Resultados del análisis químico y microbiológico de la materia prima

ESPECIFICACIONES	RESULTADOS EXPERIMENTALES	NORMA OFICIAL MEXICANA	
		MÍNIMO	MÁXIMO
Grasa (butírica) %	31	25	
pH	5.75	5	6
COLIFORMES (NMP/g)	400	---	10000 ufc/g
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	15	---	1000 ufc/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	NEGATIVO	---	100 ufc/g
<i>Salmonella</i> en 25g	NEGATIVO	---	NEGATIVO
HONGOS	30 col/g	---	40 ufc/g
LEVADURAS	20 col/g	---	40 ufc/g

5.6.3. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ y pH

La medición de acidez tuvo como objetivo principal realizar el seguimiento del proceso de modificación del sabor del queso procesado, como una etapa previa de la caracterización del producto por cromatografía de gases, con las posibles limitantes expuestas en la metodología. Se pudo observar que la acidez determinada en los blancos sin extracto enzimático, corridos en forma paralela a las mediciones realizadas, se mantuvo por abajo de la que se generó con el extracto enzimático, manteniéndose en la acidez inicial o variando poco con respecto a ésta. Lo mencionado anteriormente nos indica, que no se está generando acidez en el queso *per se*, al menos no en gran porcentaje, y que ésta se genera sólo en mayor porcentaje, cuando se agrega el extracto enzimático (Figuras 2-6). Además, en los perfiles de ácidos grasos libres obtenidos por cromatografía de gases, se pudo comprobar la especificidad de la lipasa de *P. casei* por el ácido butírico, pues éste aumento su concentración 20 veces, durante el proceso de modificación (Figura 8), más que los otros ácidos grasos libres (AGL) analizados. Al comparar los porcentajes de grasa lipolizada en el queso, obtenidos por porcentaje de acidez expresado como ácido butírico (7.35%) y el determinado por cromatografía de gases como AGL (8.4%) para cuatro días de modificación, se encontró que fueron similares. También se ha reportado en queso suizo, que una porción considerable de ácidos grasos libres insolubles en agua (C:6-C:18), se encuentran al analizar la fase acuosa. Lo que lleva a suponer que existen otros factores, además de la solubilidad en agua o aceite, que tienen que ver con la extracción de los AGL.

por ejemplo, que se encuentren localizados en la interfase agua-aceite del queso y sean arrastrados en la fase acuosa, o que los ácidos grasos se unan a los grupos cargados positivamente de proteínas y péptidos de la fase acuosa (Biede y Hammond, 1979).

Lo mencionado anteriormente nos permite suponer que el método utilizado para la determinación de acidez, es aceptable y fue útil para este trabajo específico. Pero deben tenerse en cuenta las limitante que tiene el método, principalmente que la determinación se realiza en fase acuosa y que la mayoría de los ácidos generados por lipólisis, estrictamente hablando, no son solubles en agua, además, será más complicado seguir el proceso de lipólisis a una enzima que no tenga especificidad por el ácido butírico o que no se sepa su especificidad, por lo tanto, se deben analizar los objetivos que se tienen antes de emplear éste método.

El valor de pH se utilizó como una prueba comparativa con la acidez, para determinar si se tenía una relación entre las dos mediciones, que pudiera corroborar los datos obtenidos en acidez.

Estas determinaciones tienen la ventaja de ser rápidas y económicas. Lo anterior es importante, si se toma en cuenta que debido a los objetivos del trabajo, en el que se intentó establecer las condiciones de elaboración y modificación del sabor de queso procesado, se tenían que realizar una gran cantidad de determinaciones, lo cual fue una limitante para utilizar otras pruebas que pudieran considerarse como más precisas, pero que son más complejas y era difícil utilizarlas como una determinación de rutina, por ejemplo, la cromatografía de gases, la cual se reservó para caracterizar el producto final.

5.6.4. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES DE FUSIÓN

Para establecer las condiciones de fusión se tomaron en cuenta los pasos generales propuestos por Kilara (1985) para modificación de productos lácteos, así como el proceso de modificación en crema presentado por Matute (1992). Se realizaron cambios para adaptarlas a las condiciones requeridas en el proceso de modificación de queso y de acuerdo al extracto lipolítico que se utilizó.

En el proceso de fusión una limitante operativa es la temperatura de inactivación de la lipasa, que como ya se mencionó anteriormente, se iniciaba por arriba de 50°C, por lo que fue necesario lograr la fusión por abajo de esta temperatura. El problema importante consistió en evitar la separación de fases agua-aceite durante la fusión, por que la lipasa, como ya se dijo antes, actúa en la interfase agua-aceite.

Para lograr lo anterior se utilizaron sales fundentes, las cuales, además de disminuir la temperatura de fusión y evitar la separación de fases, mejoraron la textura, y como consecuencia de las dos primeras características permitieron que se generara mayor acidez, que como ya se explicó fue el índice que se utilizó para establecer que la lipasa estaba actuando sobre el sustrato y modificando el sabor del producto.

Se probaron tres diferentes sales fundentes: citratos, polifosfatos y sales comerciales. En estudios anteriores (Nurko, 1990) se habían probado las dos primeras, obteniéndose mejores resultados en cuanto a textura con los citratos; pero la temperatura de fusión era mayor a la que se necesitaba en este trabajo, por lo que se decidió probar las sales que se utilizan en forma comercial, además de las que se habían utilizado anteriormente, para comparar los resultados. Los mejores resultados se obtuvieron con la mezcla comercial, ya que como se puede observar en la Tabla 5, con ellas se obtuvo la menor temperatura de fusión, no existió separación de fases y se obtuvo una buena textura.

TABLA 5
EFEECTO DE LAS SALES FUNDENTES EN TEXTURA Y GENERACIÓN DE ACIDEZ

SALES FUNDENTES	TEXTURA (1)	SEPARACION DE FASES (2)	TEMPERATURA DE FUSION (°C)	ACIDEZ GENERADA * (96hrs)
Citratos	Regular	Poca	44	1.86±0.12
Polifosfatos	Regular	Poca	45	2.13±0.01
Comerciales	Buena	Nada	39	2.32±0.04
Bianco**	Mala	Mucha	58	1.38±0.81

*La acidez fue determinada en % Acido Butírico

**Sin sales fundentes y sin extracto enzimático

(1) Textura Mala= Muy gruesa y chiclosa. Textura Regular= Pocos grumos y no chiclosa. Textura buena= Sin grumos ni chiclosa

(2) Mucha= Se observa directamente. Poca=Se observa al mover la muestra. Nada=No se observa al mover la muestra.

Por otra parte, la acidez generada fue mayor, cuando se usaron las sales comerciales, como se puede observar también en la Figura 2, además, se realizó un análisis de varianza para comparar los diferentes perfiles de acidez, que se lograron con las tres diferentes sales y se observó que existía diferencia significativa entre ellas ($p \leq 0.05$). Mediante la prueba de rango múltiple LSD (diferencia mínima significativa) se estableció que entre las sales comerciales y citrato de sodio existía diferencia significativa y que polifosfatos

no tenía diferencia significativa con ninguno de las dos (Tabla 6), por lo que se decidió que se utilizarían las sales comerciales durante todo el proceso de modificación, por que daba mejores características de textura que polifosfatos, pero principalmente porque daba un mayor margen de temperatura para poder trabajar con menor riesgo a perder la actividad de la enzima.

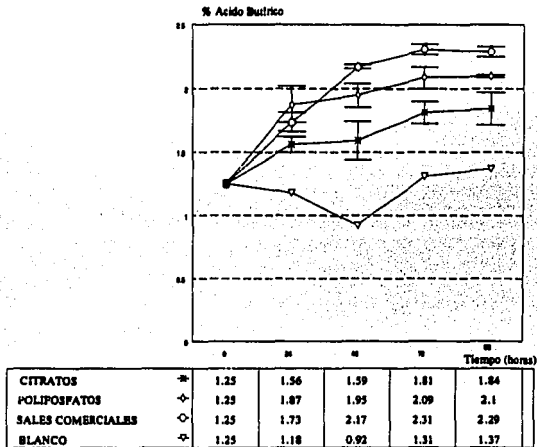


FIGURA 2. Comparación de las diferentes sales de fusión utilizadas en el proceso de modificación. El blanco utilizado no contenía sales de fusión

TABLA 6
Análisis de Varianza y prueba de rango múltiple LSD para comparar
las diferentes sales de fusión utilizadas en el proceso de modificación.

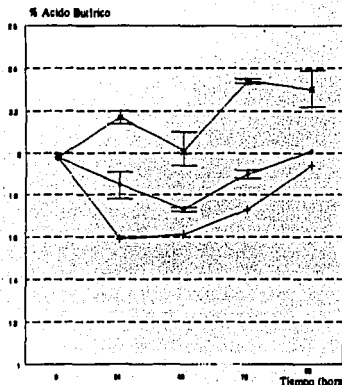
Variable	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F
Sales de fusión	2	0.9228	0.4614	4.0103*
Error	42	4.8323	0.1151	
Total	44	5.7551		

* Existe diferencia significativa entre las sales $p \leq 0.05$

Prueba LSD		
Promedios % Acidez		Grupos
1.61		Citrato de sodio a
1.85		Polifosfatos a-b
1.95		Sales comerciales c

a,b,c Letras iguales no existe diferencia significativa $p \leq 0.05$

Para reafirmar la utilidad de las sales de fusión en el proceso, se realizó un experimento en el cual, a una muestra a modificar se le agregaban sales y a otra no. Como se puede observar en la Figura 3, al realizar el proceso de modificación con sales de fusión se obtuvo una mayor generación de acidez que cuando no se utilizaron, y la diferencia que existe entre ellas es altamente significativa, como se pudo determinar al realizar un análisis de varianza ($p \leq 0.01$) para comparar las dos condiciones (Tabla 7), lo que confirmó la necesidad de utilizar las sales de fusión.



	*	-	+	0	12	24	36	48
CON SALES DE FUSION	*	1.98	2.17	2.01	2.34	2.3		
SIN SALES DE FUSION	-	1.98	1.85	1.73	1.9	2.01		
BLANCO	+	1.98	1.59	1.61	1.73	1.94		

FIGURA 3. Determinación de la influencia que tiene el usar sales de fusión y no usarlas, en la generación de acidez. El blanco no contiene sales de fusión ni extracto enzimático.

TABLA 7
Análisis de Varianza para comparar el proceso de modificación usando sales de fusión y sin utilizarlas

Variante	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F
Con o sin Sales de fusión	1	0.5603	0.5603	28.5787**
Error	28	0.549	0.0196	
Total	29	1.1093		

** Existe diferencia significativa entre las sales $p \leq 0.01$

También se probaron diferentes temperaturas de incorporación de las sales. Ello permitió establecer que se lograban mejores resultados (mayor generación de acidez), al agregar las sales a una temperatura de 25°C mas que a 30 o 35°C. Ésto quiere decir que se deben de agregar desde el inicio del proceso de modificación. La diferencia entre las temperaturas fué significativa como se demostró al realizar la prueba de t-Student a los resultados obtenidos (Tablas 8 y 9). Esto se explica porque las sales, al estar presentes desde el inicio del calentamiento, empiezan a interaccionar con la caseína para formar un compuesto más estable al calor que el formado entre la proteína y el calcio lo que evita se produzca separación de fases al fundir el queso (Patart, 1990), esto favorece una mejor textura del queso fundido y también una mejor incorporación de la enzima, lo cual repercutirá en su actividad sobre el sustrato.

TABLA 8
INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCORPORACIÓN DE SALES DE FUSIÓN EN EL
DESARROLLO DE ACIDEZ

TEMPERATURA DE INCORPORACIÓN	ACIDEZ INICIAL * (0 horas)	ACIDEZ FINAL* (96 horas)	INCREMENTO DE ACIDEZ *
25	0.83	3.66	2.83a
30	0.98	2.05	1.07 b
35	1.10	2.14	1.04 b

* La acidez está reportada como % de ácido butírico

a,b Letras diferentes indica que existe diferencia significativa para $p \leq 0.01$

TABLA 9
Prueba t-Student para determinar si existe diferencia entre las temperaturas
de incorporación de las sales de fusión.

Condición	Promedios % Acidez	Varianza	No. muestras analizadas
Temp. incorporación $t=2.7828^{**}$	1.05	1.0504	3

** Existe diferencia significativa entre las condiciones $p \leq 0.01$

5.6.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA

En el grupo de trabajo se habían realizado anteriormente investigaciones en los que se modificó el sabor de crema con diferentes extractos enzimáticos, entre ellos el de *Penicillium caseicola*, y con el cual se obtuvo una acidez de 3.5% reportado, como ácido butírico (Tobalina, comunicación personal). A los productos obtenidos se les aplicó una prueba sensorial de preferencia, y los jueces escogieron con mayor frecuencia como primera opción el de *P. caseicola*. Tomando lo anterior como base, se buscó obtener como mínimo esta acidez en el queso modificado, para lo cual fue necesario determinar con qué actividad lipolítica se alcanzaba ésta, y posteriormente determinar si el sabor generado en el queso tenía aceptación entre los consumidores.

Para realizar lo anterior se utilizaron extractos con diferente actividad lipolítica y los resultados obtenidos mostraron que la acidez esperada se obtuvo con una actividad de 108 UI (Figura 4) y que se alcanzó en un tiempo menor a los 4 días que duraba el proceso de modificación. Lo anterior indicó que se podría cumplir con el objetivo de aumentar el sabor en un tiempo más corto que el normalmente empleado en la elaboración de quesos madurados, que puede ser de 20 hasta 120 días, dependiendo del tipo de queso (Kinsel y Hwang, 1976; Law, 1984; Arbige, 1986).

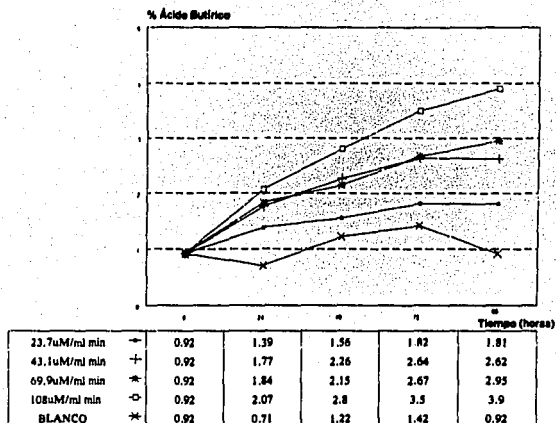


FIGURA 4. Desarrollo de acidez generado con extracto enzimático con diferente actividad de *P. caseolicolum*. El blanco no tiene extracto enzimático.

5.6.6. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN

Para la determinación de la temperatura de maduración se experimentó con 29 y 37°C. Éstas se escogieron tomando en cuenta los trabajos realizados por Lamberet y Lenoir (1976) y Alhir *et al.*, (1990), pero si bien, establecieron la temperatura óptima de la lipasa de *P. caseolicolum*, en 35°C, entre 28 y 38°C se mantiene por arriba del 90% de su actividad. Esto nos ofrecía un margen de temperatura para poder trabajar y escoger la temperatura de incubación de la muestra.

La mayor generación de acidez, de acuerdo a estudios previos del grupo de trabajo, se presentaba a 37°C, por lo tanto, se escogió esta temperatura para incubar el queso

durante el proceso de modificación. Por otra parte, se eligió 29°C como otra opción, porque a esa temperatura se obtenía el extracto enzimático.

Al probarse las dos temperaturas, se pudo observar que a 29°C se generaba una mayor acidez que a 37°C (Figura 5), lo cual nos indicaba que la lipasa actuaba con mayor eficiencia en la primera, ya que la actividad lipolítica del extracto utilizado fue la misma para las dos condiciones. Para asegurar que la generación de acidez no se producía químicamente por el tratamiento de la muestra por microorganismos presentes en el queso, sino que se debía a la lipasa, se corrió un blanco, sin extracto enzimático, en forma paralela para cada condición. Al analizar los resultados estadísticamente mediante un análisis de varianza se encontró que la diferencia entre las dos fue significativa ($p \leq 0.01$) (Tabla 10).

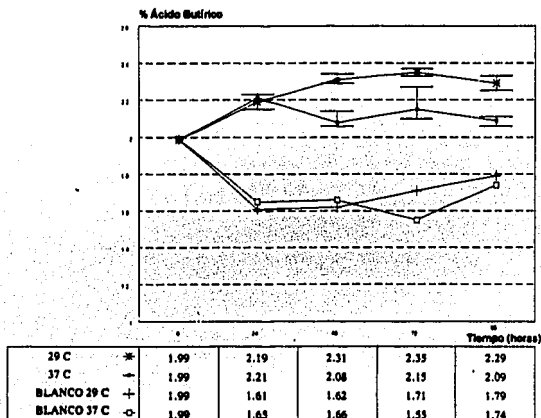


FIGURA 5. Comparación de diferentes temperaturas de incubación del producto modificado. Los blancos no tienen extracto enzimático.

TABLA 10
Análisis de Varianza para determinar si existe diferencia significativa entre las temperaturas de incubación

Variable	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F
Temp. incubación	1	0.1168	0.1168	9.3224**
Error	28	0.3507	0.0125	
Total	29	0.4675		

** Existe diferencia significativa entre las temperaturas $p \leq 0.01$

Por lo mencionado anteriormente se decidió utilizar la temperatura de 29°C, porque además era menos drástica y el gasto de energía sería menor, teniendo en mente su posible aplicación a nivel industrial principalmente.

5.6.7. DETERMINACIÓN DE TIEMPO DE INCUBACIÓN

El tiempo de incubación se había establecido en trabajos anteriores, aplicados en otros productos lácteos (Nurko, 1990; Orozco, 1993) y fue de 4 días, este tiempo se mantuvo ya que se considera un periodo corto, que era algo que se deseaba conseguir, para que disminuyera costos de elaboración por concepto de periodo de maduración, considerando la elaboración a nivel industrial.

Lo que se pretendía con esta prueba era mantener la incubación durante más días de los que normalmente se dejaba y observar el comportamiento de la lipasa mediante el seguimiento de la generación de acidez. Es decir, si conforme transcurría el tiempo aumentaba, por la acción de la lipasa sobre los triglicéridos y la consecuente liberación de ácidos grasos libres o si disminuía porque la misma lipasa no actuaba sobre el sustrato por que sufría algún tipo de inhibición, porque existiera limitación por sustrato o porque los compuestos liberados no modificaran la acidez. Si disminuía, determinar en que tiempo iniciaba el declive de la actividad de la enzima, esto para poder establecer ciertas limitantes en el uso del proceso o posibles aplicaciones del producto obtenido.

Como se pudo observar (Figura 6), durante los siete días de incubación la acidez siguió aumentando y no mostró una disminución, al menos hasta el tiempo probado. El porcentaje de acidez obtenido en el séptimo día de 4.96, equivale al 11.19% del total de la grasa en el queso y es un valor alto. Este porcentaje es superior a otros quesos reportados, por ejemplo, quesos camemberts normandos que alcanzan niveles de 6-10%, queso

roquefort 8%, queso gouda 1.5%, queso brie 3.2% y sólo es superado por quesos azules que alcanzan entre 18-25% (Choisy *et al.*, 1990). Mientras que al cuarto día la acidez obtenida de 3.77 correspondía a 7.35% del total de grasa, que comparado con los valores antes señalados, nos indicaba que estaba en el rango del común de los quesos madurados, exceptuando a los quesos azules que son de un sabor muy intenso y reforzaba la propuesta de dejar cuatro días de maduración al queso procesado.

Los resultados anteriores ofrecieron varias posibilidades de uso del proceso: podría emplearse para obtener un sabor intenso para utilizarse como concentrado de sabor a queso en diversos productos, por ejemplo, "dips", ensaladas, sopas, galletas, etc. y por otra parte existía la posibilidad de detener antes la incubación y utilizarlo como un queso con sabor madurado o variar los tiempos para obtener un perfil de sabor específico y ofrecerlo como producto terminado, de acuerdo a las preferencias del consumidor.

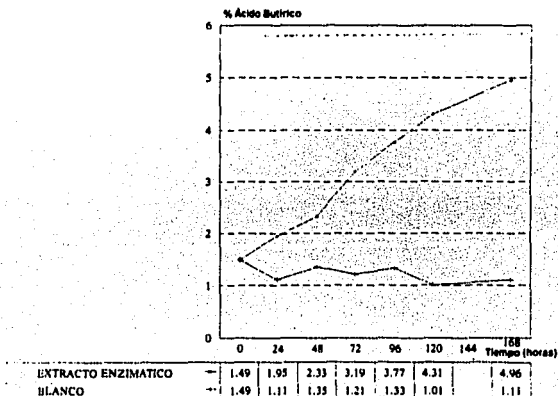


FIGURA 6. Determinación del tiempo de incubación por la acidez generada durante ocho días de incubación. El blanco no tiene extracto enzimático

4.6.9. CUANTIFICACIÓN DE ACIDOS GRASOS LIBRES (AGL)

El perfil de ácidos grasos libres (AGL) que se generó durante el proceso de modificación de sabor del queso procesado en las condiciones mencionadas anteriormente, sufrió un cambio progresivo en las concentraciones de los diferentes AGL, generados por la lipasa del extracto enzimático que se utilizó (Figura 7), pues en el blanco corrido en forma paralela al proceso (sin extracto enzimático), el cambio que se generó en las concentraciones de AGL fue mínimo (Figuras 8-17).

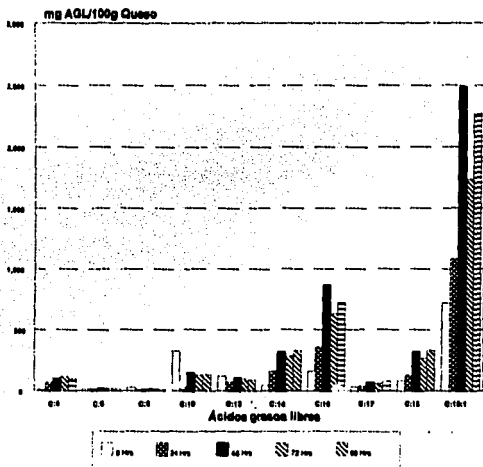


FIGURA 7. Perfil de ácidos grasos libres generados durante el proceso de modificación del sabor del queso procesado, llevado a cabo con extracto enzimático de *P. caseicola*

El total de AGL generados a las 96 horas de modificación, fue de 2530.7 mg/100g de queso, equivalente al 8.4% de lipólisis, considerando que la grasa de la leche está compuesta en un 98% de triglicéridos (Gresti *et al.*, 1993). Esta cantidad de AGL es parecida a lo reportado para queso romano rayado 2516mg/100g de queso, pero muy superior de los valores de otras variedades de quesos italianos como provolone 153-680, parmesano 281-499, y mozzarella 36-46 mg/100g de queso (Woo y Lindsay, 1984) y queso cheddar de menos de uno y hasta diez meses de maduración 276-1583.1mg/100g de queso (Woo y Lindsay, 1982). Pero fue menor a lo reportado para queso roquefort 3245.3 y queso azul 3523mg/100g de queso (Woo *et al.* 1984) y queso azul madurado aceleradamente 4282-4429mg/100g queso (Harte y Stine, 1977).

Diferentes autores (Kristoffersen, 1973; De Frutos *et al.*, 1991; Bigelis, 1992 y Lightfield *et al.*, 1993) han señalado la importancia de los ácidos grasos libres en el sabor en quesos, sin descartar el papel de otros productos, principalmente los derivados de degradación de proteínas. Estos ácidos, a su vez, son importantes porque son el principio de la cadena de reacciones que se producen para generar una gran variedad de compuestos, como metil cetonas y alcoholes secundarios, que son responsables del sabor en estos productos (Seitz, 1974; Kinsella *et al.*, 1976; Shahani *et al.*, 1976; Moskowit, 1987). También se ha mencionado que conocer el contenido de AGL de un queso no explica totalmente los aspectos de la calidad su sabor (Woo y Lindsay, 1984).

La magnitud de los cambios generados en el perfil de AGL comprobó que el sabor se había modificado. Los AGL que se liberaron en mayor cantidad fueron los ácidos butírico, mirístico, palmítico, esteárico y oleico, los cuales aumentaron 10.8, 7.8, 4.4, 3.9 y 3.2 veces respectivamente durante la modificación, lo que indicó que la lipasa de *P. casei*colum mostró cierta preferencia por los ácidos de cadena larga, pero ésta fue mayor para el ácido butírico, si bien los niveles de cada uno variaron con el tiempo, (Figuras 8-17). Cabe señalar que existió una disminución en el contenido de ácidos palmítico, esteárico y oleico de las 48 a las 72 horas (Figura 7), aunque después sigue aumentando sobre todo después de 96 horas (Figuras 14,16 y 17), esto puede atribuirse a que estos ácidos están siendo transformados en otros compuestos como metil-cetonas, pues se ha observado que esto pasa en queso roquefort (Kinsella y Hwang), sobre todo si se observa que la diferencia es mayor en el ácido oleico, que es el más susceptible a sufrir reacciones de oxidación (Margalit, 1981).

El perfil de AGL obtenido es semejante al que presentan otros tipos de quesos como camembert y brie, pues éstos aunque tienen un contenido total de AGL menor que el queso procesado, predominan en ellos los ácidos butírico, mirístico, palmítico, esteárico y oleico, mientras que caproico, caprílico, cáprico y laúrico se encuentran en cantidades pequeñas (Woo *et al.*, 1984) también se asemejan con algunos quesos suizos comerciales en la misma forma (Bied y Hammond, 1979).

Los resultados anteriores permitieron establecer que el sabor generado depende en forma importante del tiempo de modificación y de la especificidad de la lipasa, además de los parámetros establecidos como; la temperatura de incubación, el proceso de fusión y formación de la emulsión para que actúe la enzima y la calidad de la materia prima, principalmente en su contenido de grasa. Por lo mencionado anteriormente se abre una gama de posibilidades en la generación de sabor al utilizar esta enzima y modificar alguna de las variables mencionadas anteriormente.

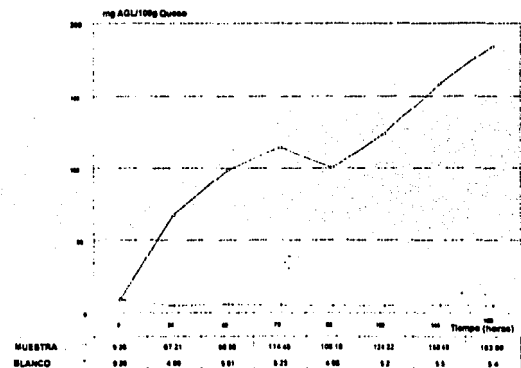


FIGURA 8. Cinética de liberación de ácido butírico generado con extracto enzimático de *P. caseicolaum* durante la modificación del sabor del queso procesado. El blanco no tiene extracto enzimático.

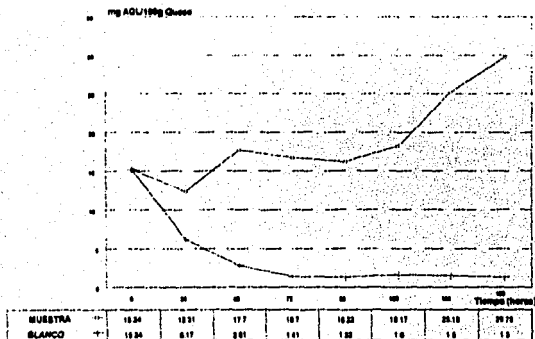


FIGURA 9. Cinética de liberación de ácido caproico generado con extracto enzimático de *P. caseicola* durante la modificación del sabor del queso procesado.
El blanco no tiene extracto enzimático.

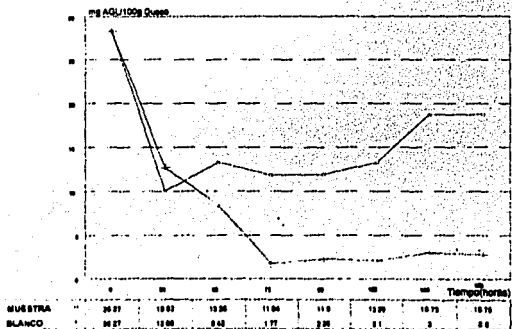


FIGURA 10. Cinética de liberación de ácido caproico generado con extracto enzimático de *P. caseicola* durante la modificación del sabor de queso procesado.
El blanco no tiene extracto enzimático.

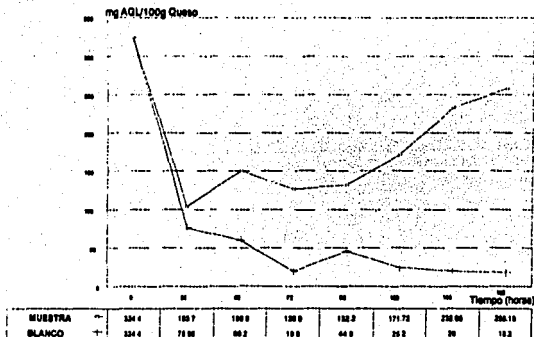


FIGURA 11. Cinética de liberación de ácido láctico generado con extracto enzimático de *P. casei* durante la modificación del sabor del queso procesado. El blanco no tiene extracto enzimático.

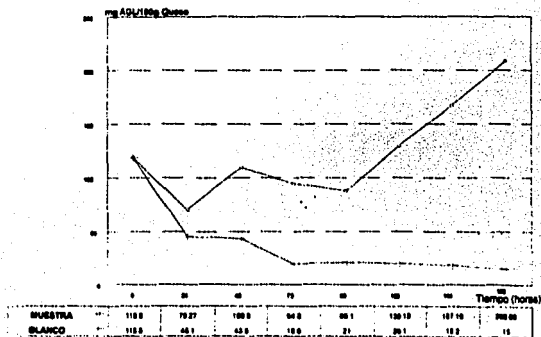


FIGURA 12. Cinética de liberación de ácido láctico generado con extracto enzimático de *P. casei* durante la modificación del sabor del queso procesado. El blanco no tiene extracto enzimático.

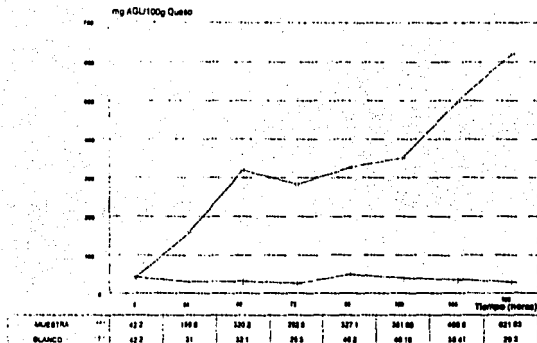


FIGURA 13. Cinética de liberación de ácido láctico generado con extracto enzimático de *P. caseicola* durante la modificación del sabor del queso procesado. El blanco no tiene extracto enzimático.

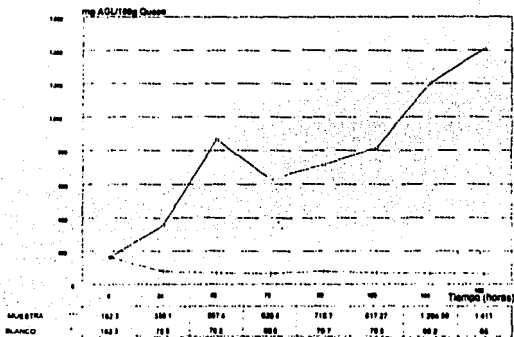


FIGURA 14. Cinética de liberación de ácido palmítico generado con extracto enzimático de *P. caseicola* durante la modificación del sabor del queso procesado. El blanco no tiene extracto enzimático.

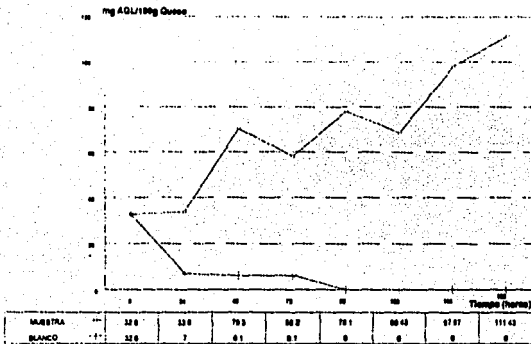


FIGURA 18. Cinética de liberación de ácido margárico generado con extracto enzimático de *P. caseicola* durante la modificación del sabor del queso procesado. El blanco no tiene extracto enzimático.

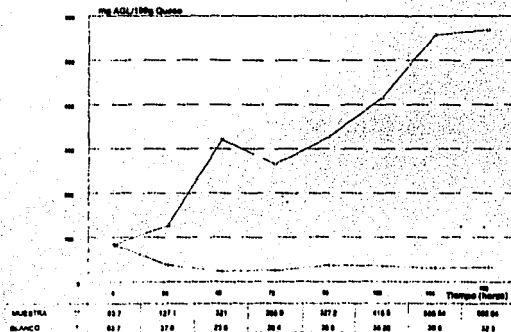


FIGURA 19. Cinética de liberación de ácido estearico generado con extracto enzimático de *P. caseicola* durante la modificación del sabor del queso procesado. El blanco no tiene extracto enzimático.

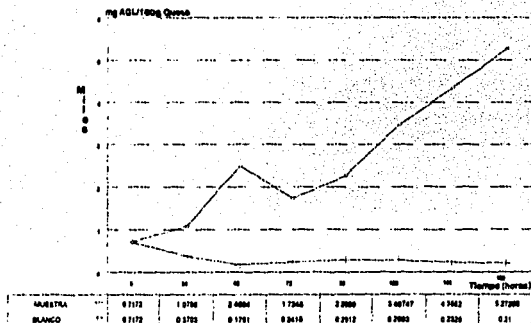


FIGURA 17. Cinética de liberación de ácido oleico generado con extracto enzimático de *P. caseicola* durante la modificación del sabor del queso procesado. El blanco no tiene extracto enzimático.

Se analizó también el perfil de ácidos grasos de las muestras utilizadas en las evaluaciones sensoriales, tanto para las pruebas cuantitativas como la de nivel de agrado. Esto se realizó para determinar qué tan diferentes eran las muestras, con respecto a su perfil de AGL, y qué tanto podrían influir en los resultados dados por los jueces.

Los resultados obtenidos mostraron que el perfil para cada tipo de ácido graso, evaluado por separado, fue muy parecido en las diferentes muestras (Figura 18), y al analizarse estadísticamente por la prueba t-Student, se comprobó que no existía diferencia significativa entre las diversas muestras, sólo existió para los ácidos cáprico, laurico y margárico para una $p < 0.05$. En cuanto al perfil analizado en forma total, es decir, todos los ácidos grasos en conjunto, se pudo observar que son similares, y al realizar un análisis de varianza entre las diferentes muestras para $p < 0.01$, no existió diferencia significativa entre ellos (Tabla 11). Los resultados anteriores indicaron que las diferentes muestras que se emplearon, no fueron diferentes en cuanto a su contenido de ácidos grasos, y que por lo

tanto, se disminuyó al mínimo la posibilidad de que las evaluaciones sensoriales fueran erróneas o poco confiables, porque se estuvieran evaluando muestras muy diferentes en cada prueba. Es importante considerarlo en el análisis descriptivo cuantitativo, pues éste se realizó en cinco diferentes sesiones y los resultados no se podrían analizar en conjunto si las muestras hubieran sido muy diferentes entre sí, pues eso indicaría que, estrictamente hablando, se habrían evaluado diferentes muestras, lo cual no sucedió.

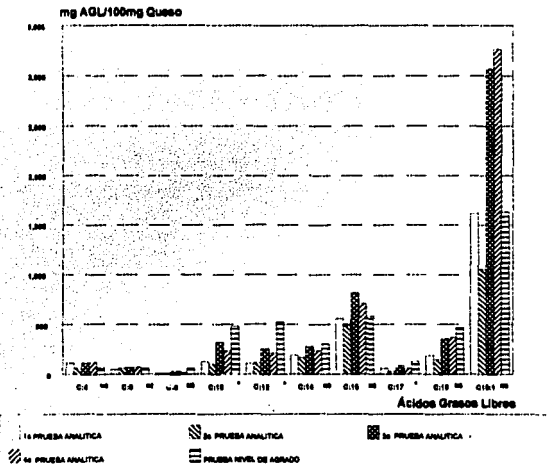


FIGURA 1B. Comparación de los perfiles de ácidos grasos libres que presentaron las diferentes pruebas sensoriales analíticas y la de nivel de agrado.

NS= NO existe diferencia significativa entre las pruebas
 * Existe diferencia significativa entre las pruebas $p < 0.05$

TABLA 11
Análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre las diferentes pruebas sensoriales analíticas y la de nivel de agrado

Variable	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F
Pruebas sensoriales	4	771367.73	192841.93	0.4057 NS
Error	45	21381894.16	475375.43	
Total	49	22163261.89		

NS= NO existe diferencia significativa entre las pruebas sensoriales

4.7. EVALUACIÓN SENSORIAL

4.7.1. PRUEBA DE NIVEL DE AGRADO

Inicialmente se determinó el nivel de agrado del producto modificado en una población estadísticamente representativa. El propósito de esta prueba fue tener una referencia de las posibilidades que el producto podría tener en los gustos del consumidor en general. El sabor generado en el queso modificado fue aceptado por un 72% de los jueces afectivos que participaron en la prueba sensorial de nivel de agrado (Tabla 12). El cuestionario empleado se muestra en el anexo 2.1.

4.7.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO

Dada la aceptabilidad del producto, se continuó con las pruebas sensoriales y se procedió a realizar una descripción sensorial del producto. Se determinó el perfil de sabor modificado del queso procesado y se comparó con el perfil de la materia prima, que fue queso manchego, y con un queso madurado elaborado con un hongo similar a *P. caseicola*, como lo es el queso brie (Figura 19). La diferencia entre este queso y el Procesado es que el Brie se deja madurar para que genere su sabor característico de 30 a 40 días, mientras que el procesado modificado alcanza su sabor en tan sólo 4 días, con la consecuente ventaja de un ahorro económico, además de poder obtener sabores más o menor intensidad, de acuerdo a las necesidades del mercado, variando los tiempos de modificación o la concentración de enzima.

TABLA 12
Hoja de variado de datos de la prueba de nivel de agrado para el queso modificado con el extracto enzimático de *P. caseicolum*

FECHA DE PRUEBA: 2-III-94							
Escala de Calificación: -5= DISGUSTA MUCHO A 5= GUSTA MUCHO							
para traducir de 0 a 10 centímetros							
JUEZ (n)	Calificación	JUEZ (n)	Calificación	JUEZ (n)	Calificación	JUEZ (n)	Calificación
1	10	26	8	51	7.50	76	6
2	10	27	8	52	7.50	77	6
3	10	28	8	53	7.50	78	6
4	10	29	8	54	7.50	79	6
5	10	30	8	55	7.45	80	6
6	10	31	8	56	7.40	81	6
7	10	32	8	57	8	82	9
8	10	33	8	58	7	83	5.6
9	10	34	8	59	7	84	5.45
10	9.65	35	8	60	7	85	5
11	9.50	36	8	61	7	86	5
12	9.40	37	8	62	7	87	5
13	9.35	38	8	63	7	88	4.35
14	9.10	39	8	64	7	89	4
15	9	40	8	65	7	90	4
16	9	41	8	66	7	91	4
17	9	42	8	67	7	92	3.95
18	9	43	8	68	7	93	3.70
19	9	44	8	69	7	94	3.10
20	9	45	7.90	70	7	95	3.10
21	9	46	7.90	71	7	96	3
22	8.55	47	7.90	72	7	97	2.60
23	8.50	48	7.80	73	7	98	2
24	8.50	49	7.55	74	6.40	99	0.30
25	8.50	50	8.50	75	6	100	0.20
SUMATORIA= 718.4		PROMEDIO= 7.18		DESV. EST.= 2.08			

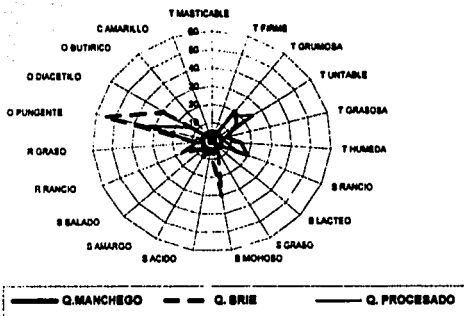


FIGURA 19. Comparación de los perfiles de sabor obtenidos en el análisis sensorial cuantitativo. El queso manchego está como referencia con un valor de 5. T, grumosa del Q. procesado y T. unttable del Q. brie están en cientos. T=textura, R=resabio, S=sabor, O=olor, C=color.

Para llevar a cabo la prueba descriptiva se realizó el entrenamiento de jueces, como ya se mencionó en la metodología. Para el entrenamiento se utilizaron diferentes descriptores que fueron generados en la prueba de nivel de agrado por los consumidores, (Anexos 2.2. y 2.3.); éstos fueron de gran ayuda para ahorrar tiempo de entrenamiento pues se tenía una idea, aunque general, del producto con el que se trabajaba. Pero los descriptores definitivos fueron establecidos por los mismos jueces al término del período de entrenamiento.

El cuestionario que se utilizó en las evaluaciones descriptivas cuantitativas definitivas se presentan en el Anexo 3.1., así como también las definiciones de los descriptores finales generados por los jueces para esta prueba.

Al observar por separado el análisis sensorial de la textura y color del queso procesado, se pudo observar que este queso y el manchego (materia prima), son semejantes, sólo difieren en untabilidad y grumosisidad siendo mayores en el queso procesado, y los dos

son diferentes al queso brie (Figura 20). Lo expuesto anteriormente se puede corroborar con el análisis estadístico realizado para estas características y mostrado en la Tabla 13. Estos resultados nos indican que la textura y color del queso procesado no se modificaron sustancialmente durante el proceso de elaboración ni durante la maduración.

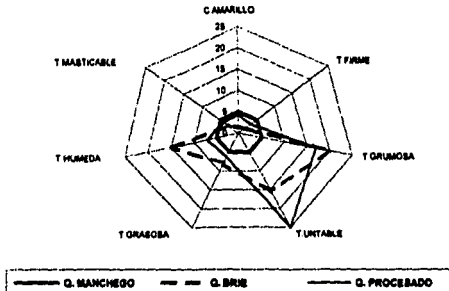


FIGURA 20. Perfil de textura y color generado en el análisis sensorial cuantitativo. Los valores de T. grumosa para Q. procesado y T. untable para Q. brie están en cientos. T=textura, C=color.

En cuanto al sabor y olor del queso procesado es diferente al queso manchego (materia prima) y más parecido al queso brie. Esta aseveración se puede observar en el sabor y olor lácteo, un atributo de quesos poco madurados, en el que la intensidad es menor, en los quesos procesado y brie que en el manchego. También en el sabor y resabio rancio, sabor amargo y olor a diacetilo, notas de sabor presentes en quesos madurados, por ejemplo, el diacetilo característico de quesos como Port Salut y Monterey Jack, sabor y olor rancio en queso suizo, provocado por una alta concentración de ácido butírico (Woo *et al.* 1984), el cual está presente en mayor cantidad (5 veces más) en queso brie y procesado que en el manchego. Estas características de sabor son más intensas en el queso procesado y brie que en el manchego (Figura 21) y son estadísticamente diferentes en forma significativa como se puede observar en la Tabla 13. Por lo que podemos decir que el sabor del queso procesado sí se modificó utilizando el extracto enzimático de *P. caseicolum* y que éste es semejante al del queso brie.

Esto es algo hasta cierto punto lógico, si se toma en cuenta que se ha encontrado que los perfiles de compuestos volátiles generados por *P. caseicola* y *P. camemberti* (este último utilizado en la elaboración de queso brie), son semejantes (Karahadian *et al.* 1985), incluso se dice que son especies muy parecidas y que sólo difieren en el color de sus esporas (Jollivet y Belin, 1993).

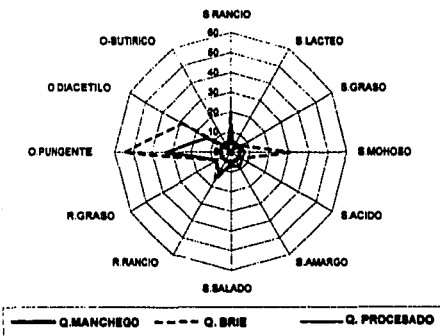


FIGURA 21. Perfil de sabor, olor y resabio, obtenido en el análisis sensorial cuantitativo. R=resabio, O=olor, S=sabor.

TABLA 13

Resumen de los resultados de las pruebas sensoriales, nivel de agrado y descriptiva cuantitativa, efectuadas al queso modificado con extracto enzimático de *P. caseicola*.

PRUEBA AFECTIVA: NIVEL DE AGRADO				
PROMEDIO: 7.184 n= 100 DESVIACIÓN ESTANDAR: 2.084 ACEPTACIÓN: 71.84%				
PRUEBA ANALÍTICA: ANÁLISIS DESCRIPTIVO CUANTITATIVO				
ATRIBUTOS	PRODUCTOS	PRUEBA DE DUNCAN		
		Q. BRIE	Q. MODIFICADO	Q. MANCHEGO
COLOR				
AMARILLO	**	1.194 a	3.988 b	4.574 b
OLOR				
PUNGENTE	**	6.460 a	3.994 b	0.602 c
DIACETILO	**	6.873 a	3.274 b	1.240 c
BUTÍRICO	**	2.136 a	2.982 a	4.450 b
SABOR				
RANCIO	**	7.078 a	4.996 b	1.776 c
LÁCTEO	**	2.016 a	2.604 a	4.320 b
GRASO	NS	5.070 a	4.667 a	3.874 a
MOHOSO	**	6.710 a	1.626 b	1.120 b
TEXTURA				
MASTICABLE	**	3.779 a	5.507 b	6.890 b
FIRME	**	2.836 a	5.158 b	7.854 b
GRUMOSO	**	0.384 a	3.418 b	0.086 a
UNTABLE	**	6.172 a	0.118 b	0.016 b
GRASOSA	**	4.582 a	3.544 b	2.821 b
HUMEDA	**	2.130 a	1.002 b	0.690 b
SABORES BÁSICOS				
ÁCIDO	*	4.088 a	4.270 a	3.192 a
AMARGO	**	5.328 a	4.684 a	2.930 b
SALADO	**	3.444 a	4.112 a	2.864 a
RESABIO				
RANCIO	**	6.156 a	4.808 a	1.938 b
GRASO	**	4.616 a	4.596 a	2.814 b

a-b-c Diferentes letras denotan que existe diferencia significativa para * ps 0.05 ** ps 0.01

El papel de los ácidos grasos libres en la generación de sabor resultó evidente al comparar los perfiles liberados de los tres quesos (Figura 22) que concordaron con los perfiles de intensidad de sabor obtenidos. La intensidad del sabor del queso manchego es menor a la que se obtuvo en el queso modificado, así como su concentración de ácidos grasos libres; mientras que en el queso brie su intensidad de sabor y concentración de ácidos grasos libres fueron similares al del procesado. También se realizó el análisis estadístico mediante la prueba t-Student para comparar los ácidos grasos de los diferentes quesos en forma individual, y se observó que con excepción del ácido caproico y el palmítico, en los demás ácidos existe diferencia significativa ($p \leq 0.01$) entre los tipos de queso, siendo el tipo manchego diferente del brie y procesado (Figura 22).

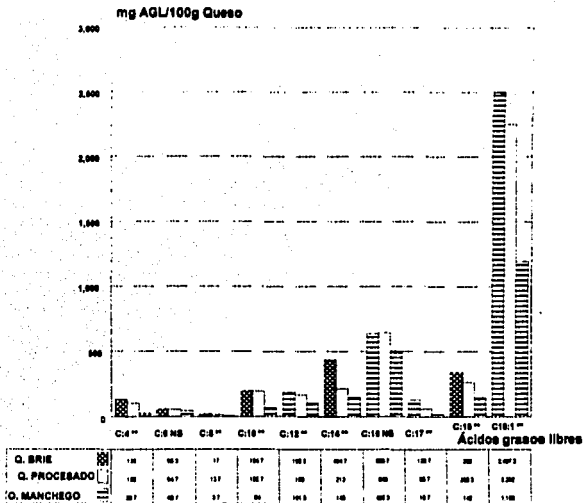


FIGURA 22. Comparación de los perfiles de ácidos grasos de los quesos utilizados en las pruebas sensoriales cuantitativas.

NS=NO existe diferencia significativa entre los quesos.

** Existe diferencia significativa entre los quesos $p < 0.01$.

Además, al comparar los perfiles de ácidos grasos de diferentes tipos de queso, tanto madurados como frescos, se pudo confirmar que la concentración de los ácidos juegan un papel importante en el sabor de los quesos, pues en los que tienen un sabor muy suave se detectó una menor concentración de éstos, mientras que, los que presentan un sabor más concentrado tuvieron una mayor cantidad de ácidos grasos (Figura 23). Furtado y Wishnitsky (1984), observaron que una correlación positiva, entre la generación de AGL y la intensidad del sabor, se presentaba en diferentes tipos de queso inoculándolos con esporas de *P. caseoliculum*. Podemos decir que algo semejante sucedió con el queso

procesado, pues su concentración de ácidos grasos aumento alrededor de tres veces, comparado con el manchego que fue la materia prima, y su sabor también se intensifico.

A los diferentes perfiles de AGL de los diversos quesos que se analizaron, se les realizó un análisis de varianza ($p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$), y se observó que existe diferencia significativa entre ellos (Tabla 14), y por la prueba de LSD, se determinó que los quesos camambert, brie y procesado, no eran diferentes entre sí, pero estos tres sí lo eran de los demás ($p \leq 0.01$) (Figura 23).

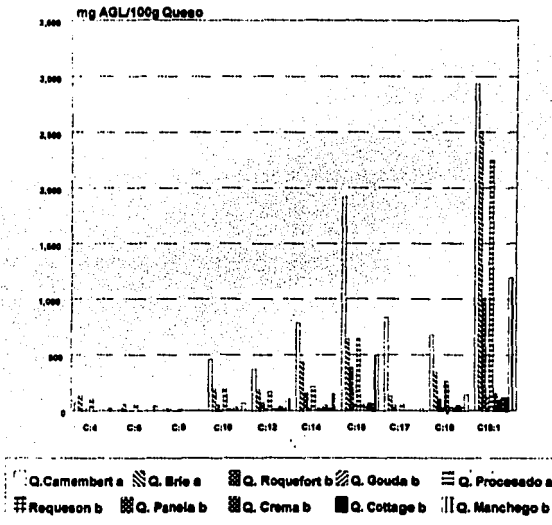


FIGURA 23. Comparación del perfil de ácidos grasos libres de diferentes quesos comerciales, incluyendo al queso procesado.
 a-b: Letras diferentes indican diferencia significativa entre los quesos $p < 0.01$

TABLA 14
Análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre los perfiles de ácidos grasos libres de diferentes tipos de quesos comerciales.

Variable	G.L.	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados	F
Diferentes quesos	9	6228936.68	692104.08	.3.2666**
Error	90	19068664.17	211874.05	
Total	99	25297600.86		

** Existe diferencia significativa entre los quesos $p \leq 0.01$

Es importante señalar que, en un mismo tipo de queso su contenido de AGL puede variar, pues los valores de los quesos camembert y brie analizados en el presente trabajo son mayores a los del queso procesado, mientras que algunos valores reportados por otros autores en la literatura para estos mismos tipos de quesos fueron menores (Choisy *et al*, 1990; Woo *et al*, 1984). Por lo que se puede suponer, que además del contenido total de ácidos grasos en un queso, es muy importante su balance o perfil que se tenga, pues este balance de AGL si es semejante en los tres casos y como se pudo probar, el sabor del queso procesado y el del brie son semejantes.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las condiciones de obtención del extracto enzimático fueron adecuadas pues se obtuvo una actividad lipolítica suficiente para lograr la modificación del sabor del queso procesado.

Para obtener un mejor proceso de fusión en el queso es necesario agregar sales fundentes, y las más adecuadas fueron la mezcla de sales comerciales (Joha C y Joha T de Vigusa).

Las sales de fusión deben agregarse desde el inicio del calentamiento para obtener mejores resultados en la elaboración del queso y en la actividad lipolítica.

La temperatura de incorporación del extracto enzimático debe ser menor de 50°C, porque por arriba de esta temperatura se pierde drásticamente la actividad lipolítica.

La temperatura de incubación con la que se obtuvieron mejores resultados, en el presente trabajo, fue de 29°C.

Un tiempo de incubación de 4 días es suficiente para modificar el perfil de ácidos grasos libres y consecuentemente el sabor del queso manchego empleado, agregando un mililitro de extracto enzimático con una actividad lipolítica de 108 UI.

Se puede generar un producto con un sabor más intenso si se deja un mayor tiempo de incubación, pues la enzima sigue actuando, al menos hasta 7 días.

La lipasa de *Penicillium caseicolum* empleada presenta especificidad por los ácidos grasos de cadena larga mirístico, palmítico, esteárico y oleico, pero la mayor especificidad es por el ácido butírico, siendo de cadena corta.

El extracto enzimático de *Penicillium caseicolum* sí actuó sobre el queso manchego como sustrato, y en las condiciones de modificación establecidas se generó un producto con sabor diferente al empleado como materia prima.

—Conclusiones y Recomendaciones—

El sabor y el olor obtenidos fueron más intensos, mientras que la textura y el color fueron más agradables, aunque el cambio, en estas últimas características, no fué estadísticamente significativo.

El sabor del producto modificado fué aceptado por consumidores estadísticamente representativos y el perfil obtenido por un análisis descriptivo cuantitativo fué similar al queso comercial madurado brie.

Se recomienda realizar una correlación entre los métodos de determinación del índice de acidez libre, en solución acuosa y por extracción de la fase grasa

También sería recomendable completar el estudio de los compuestos volátiles, generados durante el proceso de modificación del sabor del queso procesado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adda, J., Roger, S. y Dumont, J-P. (1978) Some recent advances in the knowledge of cheese flavor. en: Charalambous, G. e Inglett, G. Editores. Flavor of foods and beverages. Editorial Academic Press. U.S.A. p.p. 65-74.
- Adda, J. (1986) Flavour of dairy products. en: Birch, G.G. y Lindley, M.G. Editores. Developments in food flavours. Editorial: Elsevier Science Publishing Co., Inc. Inglaterra. Cap. 10. p.p.151-172.
- Alhir, S., Markakis, P. y Chandan, R. (1990). Lipase of *Penicillium caseicola*. J. Agric. Food Chem. 38:598-601.
- Alkhalaf, W., Piard, J-Ch., El Soda, M., Gripon, J-C., Desmazeaud, M. y Vassal, L. (1988). Liposomes as proteinase carriers for the accelerated ripening of Saint-Paulin type cheese. J. Food Sci. 53(69):1674-1679.
- Alkhalaf, W., El Soda, M., Gripon, J-C., y Vassal, L. (1989). Acceleration of cheese ripening with liposomes-entrapped proteinase influence of liposomes net charge. J. Dairy Sci. 72:2232-2238.
- Arbige, M., Freund, P., Silver, S. y Zelko, J. (1986). Novel lipase for Cheddar cheese flavor development. Food Technol. 40(4):91-98.
- Arnold, R.G., Shahani, K.M. y Dwivedi, B.K. (1975). Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J. Dairy Sci. 58(8):1127-1142.
- Azzara, C. y Campbell, L. (1992). Off-flavors of dairy products. en: Charalambous, G. Editor. Off-flavors in foods and beverages. Editorial Elsevier. Holanda. 1992. p. 329-374.
- Biede, S. y Hammond, E. (1979). Swiss cheese flavor: I. Chemical analysis. J. Dairy Sci. 62:227-237.
- Bigelis, R. Flavor metabolites and enzymes from filamentous fungi. Food Technol. 46(11):152-161.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

- Brady, L., Brzozowski, A., Derewenda, Z., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Tyrkenburg, J., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L. y Menges, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*. 343(2):767-774.
- Caric, M. y Kaláb, M. (1993). **Processed cheese products**. en: Fox, P. Editor. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Editorial Chapman and Hall. Inglaterra. Vol. 2. Cap. 15 p.p. 467-505.
- Celerin, E.M. y Fergus, C. (1971). Effects of nutrients, temperature, and relative humidity on germination of the ascospores of *Chaetomium thermophile* var *coprophile*. *Mycologia*. 63: 1030-1045.
- Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripo, J., Lamberet, G., Lenoir, J. y Tourner, C. (1990). **Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado**. en: Eck, A. coordinador. *El Queso*. Editorial Omega. España. Parte I. Cap. 4. p.p.57-94.
- De Frutos, M., Sanz, J. y Martínez-Castro, I. (1991). Characterization of artisanal cheeses by GC and GC/MS analysis of their medium volatility (SDE) fraction. *J. Agric. Food Chem.* 39:524-530.
- Deeth, H.C. , Fitz-Gerald, C.H. y Snow, A.J. (1983). A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *New Z. J. Dairy Sci. Technol.* 18: 13-20.
- Delobette, H., Friry, A., Plewniak, F. y Egly, JM. (1991). Le dosage des protéines. *Le Technoscope de Biofutur*. 41(1):3-11.
- Dziezak, J.D. (1986). Enzyme modification of dairy products. *Food Technol.* 40(4):114-120.
- Dziezak, J.D. (1986). An industrial reserch perspective. *Food Technol.* 40(4):108-113.
- Egan, H., Kirk, R., y Sawyer, R. (1986). **Análisis químico de alimentos de Pearson**. CECSA, México, D.F. Cuarta impresión. 1991. 586 pp.
- El Soda, M. Acceleration of cheese ripening: recent advances. *J. Food Prot.* 49(5):395-399.
- Espinosa, E. (1990). **Mejoramiento de las condiciones de producción de lipasa de *Rhizopus delemar* destinadas a la modificación de un sustrato lácteo**. Tesis. México, D.F. U.A.C.P. Y P. del C.C.H. U.N.A.M..

- Espinosa, E., Sánchez, S., y Farrés, A. (1990). Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. *Biotechnol. Lett.* 12(3):209-214.
- Fox, P. (1993). **Cheese: An overview.** en: Fox, P. editor. *Cheese: chemistry, physics and microbiology* Editorial Chapman and Hall. Inglaterra. Vol. I. Cap. 1. p p. 1-36.
- Furtado, M., Chandan, R. y Wishnetsky, T. (1984). Characterization of cheese curd ripened with *Penicillium caseicola* for producing a flavor concentrate. *J. Dairy Sci.* 67:2850-2855.
- Gatfield, I. (1988). Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. *Food Technol.* 42(10):110-122.
- Giese, J. Editor. (1994). **Modern alchemy: use of flavors in foods.** *Food Technol.* 48(2):106-116.
- Godtfredsen, S. (1990). **Microbial lipases.** en: Fogarty, W. y Kelly, C. *Microbial enzymes and biotechnology.* Editorial Elsevier Applied Science. 2a. edición. Inglaterra. p.p. 255-256.
- Green, M. (1984). **Milk coagulation and development of cheese texture.** en: Davies, F. y Law, B. Editores. *advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.* Editorial Elsevier Applied Science Publishers. Cap. 1. p.p. 1-33.
- Gresti, J., Bugaut, M., Maniongui, C. y Bezar, J. (1993). Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. *J.Dairy Sci.* 76:1850-1869.
- Harte, B. y Stine, C. (1977). Effects of process parameters on formation of volatile acids and free fatty acids in quick-ripened blue cheese. *J. Dairy Sci.* 60:1266-1272.
- Huang, H.T. y Dooley, J.G. (1976). Enhancement of cheese flavor with microbial esterases. *Biotechnol. Bioeng.* 18:909-919.
- Iverson, J. y Sheppard, J. (1989). Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data. *J. Dairy Sci.* 72:1707-1712.
- Jollivet, N. y Belin, J.M. (1993). Comparison of volatile flavor compounds produced by ten strains of *Penicillium camemberti* Thom. *J. Dairy Sci.* 76:1837-1844.
- Junge, W. (1984). **Esterasas,** en: Bergmeyer, H. *Methods of Enzymatic Analysis.* Editorial Verlag Chemie. Vol. IV. Capítulo 1. Alemania . p.p. 15-16.

- Karahadian, C., Josephson, D. y Lindsay, R. (1985). Volatile compounds from *Penicillium sp.* Contribution to Brie and Camembert cheese flavors. **J. Agric. Food Chem.** 33(3):339-343.
- Kilara, A. (1985). Enzyme-modified lipid food ingredients. **Process Biochem.** 20(4):35-45.
- Kinsella, J.E. y Hwang, D. (1976). Biosynthesis of flavors by *Penicillium roqueforti*. **Biotechnol. and Bioeng.** 18:927-938.
- Kristoffersen, T. (1973). Biogenesis of cheese flavor. **J. Agric. Food Chem.** 21(4):280-290.
- Kosokowski, F. (1982). **Cheese and fermented milk foods.** Editorial Kosikowski and associates. U.S.A. 2a. edición. Cap. 21. p.p.382-406.
- Lamberet, G. y Lenoir, J. (1976). Les caractères du système lipolytique de l'espèce *Penicillium caseicola* purification et propriétés de la lipase majeure. **Le lait.** 55:(11-12):622-644.
- Law, B.A. (1984). **Flavour development in cheeses.** en: Davies, F.L. y Law, B.A. Editores. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.* Editorial Elsevier Applied Science Publisher. Inglaterra. Cap. 7. p.p. 187-207.
- Law, B.A. (1984). **Accelerated ripening of cheese.** en: Davies, F.L. y Law, B.A. Editores. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.* Editorial Elsevier Applied Science Publisher. Inglaterra. Cap. 8. p.p.209-228.
- Lightfield, K.D. (1993). Composition and flavor of milk and cheddar cheese higher in unsaturated fatty acids. **J. Dairy Sci.** 76:1221-1232.
- Lowry, O., Rosebrough, J., Lewis, A. y Randall, R. (1954). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-275.
- Margalit, P. (1981). **Flavor microbiology.** Editorial Charles C. Thomas Publisher. U.S.A. Cap.3. p.p. 32-118.
- Marshall, V.M. (1984). **Flavour development in fermented milks.** en: Davies, F.L. y Law, B.A. Editores. *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.* Editorial Elsevier Applied Science Publisher. Inglaterra. Cap. 6. p.p. 153-186.

- Matute, P. (1992). Producción y evaluación de sistemas enzimáticos lipolíticos obtenidos por fermentación en estado sólido con *Penicillium canaliculatum* y su aplicación en la elaboración de un ingrediente modificado enzimáticamente con sabor a queso. Tesis. México, D.F. Universidad Iberoamericana.
- Menassa, A. Lamberet, G. (1982). Contribution à l'étude du système lipolytique du *Penicillium roqueforti*. *Le Lait*. 62: 32-43.
- Mermelstein, N. (1989). Food flavors. *Food Technol.* 43(12):99-106.
- Mor, J. (1990). Biotechnology in flavor synthesis. en: Bessiére, Y. y Thomas, A. Editores. Flavor science and technology. Editorial John Wiley & Sons. Inglaterra. p.p. 135-178.
- Moskowitz, G. y Noelck, S. (1987). Enzyme-modified cheese technology. *J. Dairy Sci.* 70:1761-1769.
- Muir, D.D. (1992). Milk chemistry and nutritive value. en: Early, R. Editor. The technology of dairy products. Editorial Blackie. Inglaterra. Cap.2. p. 24-38.
- NOM-F-99-1970. Norma Oficial Mexicana. Método de prueba para la determinación de pH en Quesos Procesados, SECOFI.
- NOM-F-254-1977. Norma Oficial Mexicana. Cuenta de organismos coliformes. SECOFI.
- NOM-F-255-1978. Norma Oficial Mexicana. Métodos de conteo de hongos y levaduras en alimentos. SECOFI.
- NOM-F-304-1977. Norma Oficial Mexicana. Método general de investigación de *Salmonella* en alimentos. SECOFI.
- NOM-F-308-1992. Norma Oficial Mexicana. Cuenta de organismos Coliformes totales. SECOFI.
- NOM-F-310-1978. Norma Oficial Mexicana. Determinación de cuenta de *Estafilococo aureo*, coagulasa positiva, en alimentos. SECOFI.
- NOM-F-462-1984. Norma Oficial Mexicana. Queso tipo Manchego. SECOFI.
- Nurko, E. (1990). Determinación de las condiciones de modificación de queso fresco y semimaduro con el sistema enzimático con actividad lipolítica de *Penicillium roqueforti*. Tesis. México, D.F. Universidad Iberoamericana.

- Orozco, M. A. (1993). Aplicación de sistemas enzimáticos lipolíticos en la obtención de sabores lácteos a partir de grasa de leche. *Tesis*. México, D.F. Universidad Iberoamericana.
- Pahkala, E., Antila, V. y Laukkanen, M. (1985). Accelerating the ripening of cheese by the addition of proteolytic enzymes. II preparation of Edam cheese. *Meljertieteellinen Aikakauskirja*. 43(1):33-46.
- Patart, J.P. (1990). Los quesos fundidos. en: Eck, A. El Queso. Editorial Omega. España. Parte V. Cap. 1. p.p. 349-361.
- Pedrero, F.D. y Pangborn, R.M. (1989). Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos. Alhambra, México, D.F. Primera edición. 249 pp.
- Pierce, J. y Suelter, C. (1977). An evaluation of the Comassie Brilliant Blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Anal. Biochem*. 81:478-480.
- Rivera-Muñoz, G., Tinoco-Valencia, J.R., Sánchez, S. y Farrés, A. (1991). Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. *Biotechnol. Lett.* 13(4):277-280.
- Salji, J.P. y Kroger, M. (1981) Proteolysis and lipolysis in ripening Cheddar cheese made with conventional bulk, starter and with frozen concentrated direct-to-the-vat starter culture. *J. Food Sci.* 46:1345-1348.
- Schmidt, R. (1990). Bitter components in dairy products. en: Rouseff, R. Editor. Bitterness in foods and beverages. Editorial Elsevier. Holanda. Cap. 11. p.p. 183-204.
- Schwimmer, S. (1981). Source book of food enzymology. Editorial The Avi Publishing Company, Inc. U.S.A. p.p. 400-404.
- Sedmak, J. y Grossberg, S. (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Comassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Biochem*. 79:544-552.
- Seitz, E. (1974). Industrial application of microbial lipases: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51(2):12-16.
- S.E.P. (1993). Elaboración de productos lácteos. Trillas, México, D.F. Primera reimpresión. 122 pp.
- Shahani, K.M., Arnold, R., Kilara, A. y Dwivedi, B. (1976). Role of microbial enzymes in flavor development in foods. *Biotechnol. Bioeng.* 18:891-907.
- Sidel, J., y Stone, H. (1976). Experimental design and analysis of sensory tests. *Food Technol.* 30(11): 32-38.

- Smeltzer, M., Hart, M. y Iandolo, J. (1992). Quantitative spectrophotometric assay for Staphylococcal lipase. *Appl. Environm. Microbiol.* 58(9):2815-2819.
- Stauffer, C. (1989). *Enzyme assays for food scientists*. Editorial Van Nostrand Reinhold. U.S.A. p.p. 187-192.
- Steele, J. y Ünlü, G. (1992). Impact of lactic acid bacteria on cheese flavor development. *Food Technol.* 46(11):128-132.
- Stone, H., Sidel, J., Oliver, S., Woolsey, A., y Singleton, R. (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technol.* 28(11): 24-34.
- Tobalina, F.; Rivera, M. y Farrés, A.(1990). Generation of cheese like flavors by lipases from *Penicillium candidum* and *Rhizopus delemar*. *Proceedings of the XXIII International Dairy Congress, Montreal, Canada.* p. 322.
- Thomson, D.M. (1986). *The meaning of flavour*. en: Birch, G.G. y Lindley, M.G. Editores. *Developments in food flavours*. Editorial: Elsevier Science Publishing Co., Inc. Inglaterra. Cap. I. p.p.1-21.
- Van Kley, H. y Hale, S. (1977). Assay for protein by dye binding. *Anal. Biochem.* 81:485-487.
- Versaw, W., Cuppett, S., Winters, D. y Williams, L. (1989). An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54(6):1557-1568.
- Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. y Erdmann, H. (1992). Comparison of lipase by different assays. *Enzyme Microb. Technol.* 14(8):631-639.
- Whitaker, J. (1972). *Principles of enzymology for the food sciences*. Editorial Marcel Dekker. U.S.A. p.p. 483-488.
- Woo, A. y Lindsay, R. (1982). Rapid method for quantitative analysis of individual free fatty acids in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 65:1102-1109.
- Woo, A., Kollodge, S. y Lindsay, R. (1984). Quantification of major free fatty acids in several cheese varieties. *J. Dairy Sci.* 67:874-878.
- Woo, A. y Lindsay, R. (1984). Concentration of major free fatty acids and flavor development in italian cheese varieties. *J. Dairy Sci.* 67:960-968.

-Bibliografie-

-Zook, K., Wessman, C. (1977). The selection and use of judges for descriptive panels. Food Technol. 31(11):56-61.

ANEXO I

1.1. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

Existen diferentes métodos para medir la actividad lipolítica, entre los que podemos mencionar : espectrofotométricos (Versaw *et al*, 1989; Smeltzer *et al*, 1992); variación de pH, síntesis de ésteres (Vorderwülbecke *et al*, 1992). De los mencionados anteriormente los más comúnmente usados son los que miden la variación de pH, ya que son más sencillos, requieren menos tiempo y trabajo y proporcionan resultados confiables. El llamado pH-stat (pH-constante) es muy utilizado, pero tiene el inconveniente de que se necesita un equipo automático para realizarse, el cual no se tenía en el laboratorio.

El método que se empleó en el presente trabajo fue el de caída de pH, porque es sencillo, rápido y confiable, pero principalmente porque se contaba con la experiencia, pues el grupo de trabajo había utilizado este método y la técnica estaba bien estabilizada (Espinosa *et al*, 1990; Rivera *et al*, 1991).

La reproducibilidad de los resultados fue bastante buena, pues se obtuvo un coeficiente de variación de 0-1%, para las réplicas por triplicado, además se obtuvo la ecuación de la recta que relaciona la disminución de pH con respecto a la actividad lipolítica, como se puede observar en la Figura 1, donde se obtuvo una correlación de 0.99386. Es importante señalar, que los resultados son válidos para el intervalo de concentración de ácido butírico de 0 a 218 μ M y utilizando como amortiguador Tris-maleatos 1.25mM, pues bajo estas condiciones y en el intervalo mencionado, la curva de valoración del amortiguador Tris-maleatos con ácido butírico tiene un comportamiento lineal según la validación hecha por Matute, (1992).

Se realizó también un análisis de varianza de una vía a las diferentes repeticiones calculadas, y se determinó que no existía diferencia significativa entre ellas ($p < 0.01$) (Tabla 1).

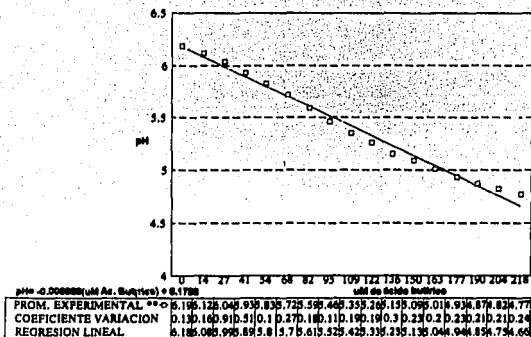


FIGURA 1. Diminución del pH de amortiguador Tris-maleato 2.5mM por la adición de ácido butírico al 0.5%.

** Es el promedio de tres repeticiones.

TABLA 1

Análisis de varianza y regresión lineal de la disminución de pH del amortiguador Tris-maleato 2.5mM por adición de ácido butírico al 0.5%

Replicas	Promedio de pH	Varianza	No. valores(n)	F
A	5.42	0.2281	17	0.01731NS
B	5.41	0.2311	17	
C	5.44	0.2434	17	

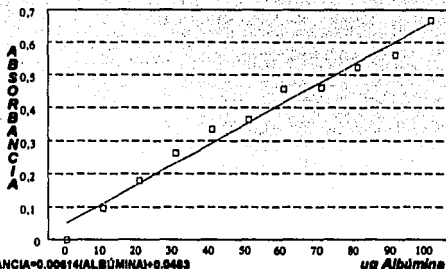
NS= no existe diferencia significativa entre las réplicas

Parámetros	Valores	Desviación estándar
Ordenada al origen	6.1789	0.0256
Pendiente	-0.0069	0.0002
Correlación	0.99386	0.0351

1.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR

La cuantificación de proteína se puede realizar por diferentes métodos, que pueden ser: espectrofotométricos, reacciones químicas medidas directamente, fijación de colorantes o marcas radioactivas (Delobette *et al.*, 1991). Éstos pueden tener ventajas o desventajas, de acuerdo a las necesidades de investigación que se tengan. Lo que se requería en el presente trabajo era un método sensible, rápido y con buena reproducibilidad y los requisitos anteriores se obtuvieron al utilizar el método propuesto por Bradford, (1976). Este método implica la unión del colorante Azul de Comassie G-250 (Bio-Rad) a la proteína, que provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm, y en esta última longitud de onda se monitorea. Tiene la ventaja que es más sensible y mucho más rápido que el propuesto por Lowry *et al.*, (1954) y que es ampliamente usado. Además la reacción del colorante con la proteína es muy estable, lo que ayuda a evitar el problema que se presenta al medir una gran cantidad de muestras.

Existen reportes de que con este método se tiene interferencia con algunos compuestos, entre ellos el EDTA, SDS, Tween-80 (Sedmak y Grossberg, 1977) y de que existe variabilidad en cuanto a su sensibilidad a diferentes proteínas (Pierce y Suelter, 1977; Van Kley y Hale, 1977). En las condiciones de trabajo no se tuvo problema, ya que no se utilizó ningún compuesto de los antes mencionados y la reproducibilidad que se obtuvo fue buena, como se puede observar en la (Figura 2), ya que el coeficiente de variación para las réplicas por triplicado fue de 0-6%, lo que nos indica que son confiables los resultados que se obtuvieron. La ecuación de una recta relaciona la cantidad de proteína en $\mu\text{g/ml}$ con absorbancia. Además se realizó un análisis de varianza de una vía, para las determinaciones de la curva patrón, y se observó que no existía diferencia significativa entre las réplicas, (Tabla 2).



	ABSORBANCIA = 0,00614(ALBUMINA) + 0,5463										
	ug Albumina										
PROM. EXPERIMENTAL	0	0,096	0,179	0,263	0,335	0,364	0,456	0,461	0,523	0,561	0,568
COEFICIENTE DE VARIACION	0	2,76	5,44	4,85	0,91	2,15	1,96	0,55	1,38	2,43	3,06
REGRESION LINEAL	0,048	0,109	0,171	0,232	0,294	0,355	0,416	0,478	0,539	0,601	0,662

FIGURA 2. Curva estándar de albumina para la determinación de proteína extracelular por el método de Bradford
 * Promedio de tres réplicas

TABLA 2

Análisis de varianza y regresión lineal de la curva patrón para la determinación de proteína por el método de Bradford.

Réplicas	Promedio de Absorbancia	Varianza	No. valores(n)	F
A	0,389	0,0433	11	0,00313NS
B	0,352	0,0420	11	
C	0,355	0,0419	11	

NS= no existe diferencia significativa entre las réplicas

Parámetros	Valores	Desviación estándar
Ordenada al origen	0,00088	0,0067
Pendiente	0,98734	0,0162
Correlación	0,99879	0,0107

ANEXO 2

2.1. CUESTIONARIO DE LA PRUEBA DE NIVEL DE AGRADO

CUESTIONARIO

QUESO

NOMBRE: _____ FECHA: _____

INSTRUCCIONES: Por favor, pruebe el queso e indique con una X en la escala, el lugar que describa mejor su agrado. En el espacio de abajo, explique brevemente porqué tomó esa decisión.

ESCALA

DISGUSTA
MUCHO

ES
INDIFERENTE

GUSTA
MUCHO

-5

0

5

POR QUÉ? _____

2.2. LISTA DE DESCRIPTORES DE ACEPTACIÓN DEL QUESO PROCESADO DE SABOR MODIFICADO EMITIDOS POR CONSUMIDORES

DESCRIPTORES	FRECUENCIA
Sabor fuerte, muy ácido	7
Sabor poco fuerte	6
Sabor no está salado	5
Sabor suave	5
Sabor a queso manchego	5
Sabor a queso holandes	3
Sabor a queso amarillo	3
Sabor moderadamente fuerte	3
Buena consistencia	3
No es amargo	3
Sabor diferente a lo que he probado	3
Sabor fresco	2
Olor poco fuerte	2
Sabor cremoso	2
Sabor no picante	1
Poco añejo	1
Sabor más o menos delicado	1
Sabor acidulado	1
Sabor amargo	1
Olor ligeramente picante	1
Duro por ser madurado	1
Sabor a queso cuajado	1
no deja resabio desagradable	1
Consistencia no rígida	1
Sabor a leche rúdo	1
Sabor a mantequilla	1
Textura de queso fresco	1

2.3. LISTA DE DESCRIPTORES DE RECHAZO DEL QUESO PROCESADO DE SABOR MODIFICADO EMITIDOS POR CONSUMIDORES

DESCRIPTORES	FRECUENCIA
Sabor grasoso	10
Un poco salado	9
Consistencia no muy agradable	8
Textura granulosa	7
Seco	7
características terrosas	6
Consistencia poco compactada	6
Muy salado	6
Poco duro	5
Sabor ácido	4
Sabor y apariencia a mantequilla	4
Apariencia mala	3
Mala presentación	2
Falta intensidad de sabor	2
Un poco agrio	2
Olor raro	2
Sabor y apariencia a jabón	2
Consistencia harinosa	1
Debe ser más fuerte	1
Aftejado	1
Astringente	1
Poco amargo	1
No puede untarse	1
Poco empalagoso	1
Color intenso	1
Falta suavidad	1
Olor muy fuerte	1

ANEXO 3
3.1. CUESTIONARIO DEL ANÁLISIS DESCRIPTIVO
CUANTITATIVO

NOMBRE: _____ **FECHA:** _____
CLAVE: _____

INSTRUCCIONES: Por favor prueba la muestra y responde las preguntas en secuencia, marca con una línea vertical sobre la línea horizontal, en el punto que mejor describa la propiedad en la muestra.

La escala es de cero a diez de izquierda a derecha.

COLOR

AMARILLO _____

OLOR

PUNGENTE _____

DIACETILO _____

BUTÍRICO _____

SABOR

RANCIO _____

LÁCTEO _____

GRASO _____

MOHOSO _____

TEXTURA

MASTICABLE _____

FIRME _____

GRUMOSA _____

UNTABLE _____

GRASOSA _____

HÚMEDA _____

SABORES BASICOS

ÁCIDO _____

AMARGO _____

SALADO _____

RESABIO

RANCIO _____

GRASO _____

3.2. ALGUNOS DE LOS DESCRIPTORES GENERADOS POR LOS JUECES EN EL ENTRENAMIENTO

QUESO MODIFICADO			15-MARZO-94
TEXTURA	SABOR	OLOR	COLOR
Duro	Acido	Picante	Amarillo intenso
Amarillento	Salado	Fuerte a Q. madurado	Amarillo cremoso
Seco	Rancio	Rancio	Amarillo Brilloso
Harinoso	Q. madurado	Muy butírico	
Fracccionable	Resabio grasoso	Como cetonas	
Grumosa	Resabio amargo	Como aldehidos	
No homogenea	Poco plástico		
Humeda	Resabio ácido		
Poco suave	Picor		
No untable	A Q. manchego		
Pastoso			
Grasosos			
De Q. madurado			

QUESO MODIFICADO			17-MARZO-94
TEXTURA	SABOR	OLOR	COLOR
Duro	Lacteo	Rancio	Amarillo intenso
Firme	Graso	Ligero a Lácteo	Amarillo opaco
Seco	Ligero ácido	Intenso a Q. madurado	Amarillo anaranjado
Arenoso	Salado	Rancio	Amarillo claro
Fracccionable	Resabio ácido	Diacetilo	
Grumosa	Poco rancio		
Desmoronable	Pcomo jabón		
Poco humeda	Ácido		
Opaca	Amargo		
Homogenea			
Masticable			
Fracturable			
No untable			

3.3. DISCUSIÓN DE LOS DESCRIPTORES Y DEFINICIONES CON LOS JUECES

COLOR

1. AMARILLO.- Color que se detecta en un muestrario de pinturas con diferentes tonos de amarillo

OLOR

1. PUNGENTE.- Sensación de irritación en la nariz.
2. DIACETILO.- Olor que se percibe en un queso con hongos.
3. BUTÍRICO.- Como a mantequilla.

SABOR

1. RANCIO.- Como aceite oxidado.
2. LÁCTEO.- Como la leche fresca.
3. GRASO.- Como aceite (en buenas condiciones).
4. MOHOSO.- Combinación de humedad y tierra.

TEXTURA

1. MASTICABLE.- Resistencia a desmenuzarse o fragmentarse en la boca (con los dientes).
2. FIRME.- Fuerza necesaria para fracturar o fraccionar (relacionado con dureza y desmoronable).
3. GRUMOSO.- Asociación de partículas apreciadas a simple vista y que forman una misma estructura.
4. UNTABLE.- Facilidad de desplazarse y adherirse a una superficie (no se va a considerar en la boca).
5. GRASOSA.- Sensación que te deja el aceite en la boca.
8. HÚMEDA.- En función de su contenido de agua.

SABORES BÁSICOS

1. ÁCIDO.- Sensación que se percibe en la parte lateral, de atrás de la lengua.
2. SALADO.- Sensación que se percibe en la parte lateral delantera de la lengua.
3. AMARGO.- Sensación que se percibe en la parte central, de atrás de la lengua.

RESABIO

1. GRASO.- Sensación que se siente como una película o capa de aceite (en buenas condiciones) en la boca, después de comer algo muy grasoso.
2. RANCIO.- Sensación en la parte posterior de la lengua y en la garganta como aceite, después de comer algo grasoso.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**3.4. LISTA DE QUESOS UTILIZADOS EN ENTRENAMIENTO DE
JUECES PARA LA PRUEBA DE ANÁLISIS DESCRIPTIVO
CUANTITATIVO**

NOMBRE DEL QUESO	MARCA
Manchego	Capucita
Brie	President
Gouda	Campiña
Roqueforti	Bleu D'Auvergne
Cottage	Los volcanes
Requesón	Bonanza
Procesado	Saner
Crema	Chambourcy
Panela	Nochebuena