

6

2ej-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

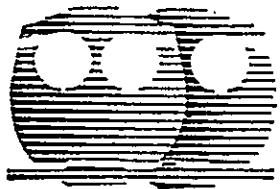
"ACELERACION EN LA MADURACION DE QUESOS MEDIANTE
LIPASAS DE Penicillium caseicolum ENCAPSULADAS
EN LIPOSOMAS"

T E S I S

Que para obtener el título de
QUIMICO DE ALIMENTOS

presenta

DEMIAN ARENAS BRIBIESCA



México, D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

260059



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

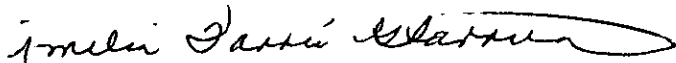
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Raúl Aguilar Caballero.
Vocal: Prof. Maria Elena Cañizo Suarez.
Secretario: Prof. Amelia Farrés González-Saravia.
1er. Suplente: Prof. Maria de Lourdes Escamilla Hurtado.
2do. Suplente: Prof. Marcos Baez Fernandez.

TRABAJO QUE SE DESARROLLÓ EN EL:
LAB. 312, CONJUNTO "E" DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA
UNAM

ASESOR.



Amelia Farrés González-Saravia.

SUSTENTANTE.



Demián Arenas Bribiesca.

**A mi padre por enamorarse una sola vez en la vida.
A mi madre por dejarse enamorar.
A Gigio y Gerardo por nuestros secretos, aunque no necesariamente.**

**A mi Abuelo y Abuela Clementina por heredarme el don de la terquedad.
A la Abuela Esperanza y mi pastel de Tortuga.**

Ursus, eres un personaje en la noche guiado por el rastro fosforescente de los caracoles. Te seguiré toda la vida.

Muy especialmente a la UNAM que me ha enseñado a andar en bici, a manejar, a amar y a ser un Químico de Alimentos.

AGRADACIMIENTOS

Al Ing. Pedro Vela del ITESM campus Querétaro, por su ayuda durante el proceso de elaboración de los quesos.

Al Ing. Abel Blancas de IIBM por su ayuda en el escalamiento de la fermentación.

A la Mtra. Yolanda Hornelas del ICMYL por su valioso conocimiento y apoyo en la Microscopía Electrónica.

Al Dr. Gilberto Díaz por su dedicación y ayuda en el análisis de Cromatografía de Gases.

Por supuesto a la Dra. Amelia Fárres por ser un ejemplo en todos sentidos. ¡Gracias por tú paciencia!

A todos los amigos del laboartorio 312 por su apoyo moral.

A mis mejores amigos que le dan sabor a la vida: Tavo, Juan Manuel (Manolo), Edgar, Fernando De la Fuente, Abraham (¡donde le firmo!).

Esta Tesis se desarrolló con apoyo del Subprograma 127 "Iniciación a la Investigación" de la Facultad de Química.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 GENERALIDADES DE MADURACIÓN DE QUESOS	3
2.2 GENERALIDADES DE MÉTODOS DE ACELERACIÓN EN LA MADURACIÓN DE QUESOS	5
2.3 GENERALIDADES DE LIPASAS	9
2.3.1 GENERALIDADES DE LA LIPASA DE <i>Penicillium caseicolum</i> .	10
2.4 GENERALIDADES DE LIPOSOMAS	11
2.4.1 ESTRUCTURA DE LOS LIPOSOMAS	13
2.4.2 COMPOSICIÓN DE LOS LIPOSOMAS	16
2.4.3 PROPIEDADES DE LOS LIPOSOMAS	20
2.5 USO DE LIPOSOMAS PARA LA ACELERACIÓN DE LA MADURACIÓN EN QUESOS	21
2.5.1 VESICULAS MULTILAMINARES (MLV)	21
2.5.2 VESICULAS UNILAMINARES PEQUEÑOS (SUV)	22
2.5.3 VESICULAS POR EVAPORACIÓN (REV)	22
2.5.4 VESICULAS POR DESHIDRATACIÓN-REHIDRATACIÓN (DRV)	23
2.5.5 RETENCIÓN DE LIPOSOMAS EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	25
3.2 ACTIVIDADES	26
4. METODOLOGÍA	27
4.1 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA	27
4.1.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	27
4.1.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.	28
4.1.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR	28

4.1.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	28
4.2 ENCAPSULAMIENTO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO EN LIPOSOMAS	29
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS.	30
4.4 CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA ELABORACIÓN DE QUESOS	30
4.5 ELABORACIÓN DEL QUESO TIPO MANCHEGO	31
4.6 MUESTREO DE QUESOS	34
4.7 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES	34
4.8 EVALUACIÓN SENSORIAL	35
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	37
5.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA EN LA ENZIMA COMERCIAL	38
5.3 PREPARACIÓN DE LOS LIPOSOMAS	39
5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS	40
5.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA ENCAPSULADA NECESARIA PARA LA MODIFICACIÓN DE LOS QUESOS	41
5.6 PROCESO DE ELABORACIÓN DE LOS QUESOS	47
5.6.1 CONTROL DE LA MATERIA PRIMA	47
5.6.2 ADICIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO A LOS QUESOS.	47
5.6.3 MADURACIÓN DE LOS QUESOS	48
5.7 CUANTIFICACIÓN DE ACIDOS GRASOS LIBRES	48
5.8 EVALUACIÓN SENSORIAL	55
5.8.1 ENTRENAMIENTO DE LOS JUECES	55
6.CONCLUSIONES	60
7.RECOMENDACIONES	61
8.BIBLIOGRAFÍA	62

ANEXO 1 Definiciones de los descriptores generados por los jueces	69
ANEXO 2 Escala de resabio y amplitud o impresión global del sabor o aroma, grado de intensidad de los descriptores.	70
ANEXO 3 Hoja de respuestas para el análisis de perfil de sabor.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Degradación de lípidos en la maduración.	4
Figura 1A.- Principales áreas de desarrollo de Industrias Biotecnológicas	5
Figura 2. Especificidad de las lipasas sobre los triacilglicerolos.	9
Figura 3. Corte transversal de un Liposoma.	12
Figura 4.-Representación esquemática de una molécula anfipática.	13
Figura 5.- Estructuras laminares y no laminares.	14
Figura 6.- Estructura del diacil-glicero-fosfato.	17
Figura 7.- Estructura de la esfingomiolina.	18
Figura 8.-Procedimiento para la preparación de liposomas por deshidratación - rehidratación.	23

ÍNDICE DE TABLAS

Antecedentes

Tabla 1 Patentes sobre el uso de lipasas en aplicaciones industriales.	7
Tabla 2 Composición porcentual de algunas lecitinas.	17
Tabla 3 Características de los liposomas utilizados en investigación de quesos.	21
Tabla 4 Composición del Medio "D" mejorado empleado en la obtención del extracto enzimático de <i>P.caseicola</i> .	27

Resultados

Tabla 1 Resultados de actividad del extracto enzimático de <i>P.caseicolum</i>	37
Tabla 2 Resultados de actividad de la lipasa comercial de origen animal.	38
Tabla 3 Resultados de los parámetros fisicoquímicos evaluados a la leche.	32
Tabla 4 Condiciones de manejo de los liposomas durante su adición a la leche.	47
Tabla 5 Rendimiento obtenido de los quesos elaborados.	49

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Composición porcentual de los ácidos grasos libres generados durante el proceso de maduración del queso testigo.	50
Gráfica 2 Composición porcentual de los ácidos grasos libres generados durante el proceso de maduración del queso con enzima comercial sin encapsular.	50
Gráfica 3 Composición porcentual de los ácidos grasos libres generados durante el proceso de maduración del queso con enzima comercial en liposomas.	51
Gráfica 4 Composición porcentual de los ácidos grasos libres generados durante el proceso de maduración del queso con extracto enzimático en liposomas.	51

Gráfica 5 Composición porcentual del ácido butírico libre en los quesos a lo largo del período de maduración.	52
Gráfica 6 Perfil de aroma generado en el análisis sensorial cualitativo.	56
Gráfica 7 Perfil de sabor generado en el análisis sensorial cualitativo.	57
Gráfica 8 Perfil de resabio generado en el análisis sensorial cualitativo.	59

1. INTRODUCCIÓN.

En un principio la elaboración de quesos era una labor doméstica realizada con el fin de preservar la excelente calidad nutricional de la leche en una forma segura en la que el tiempo en el cual el queso producía su sabor y aroma característico no era de importancia, comparado con su vida de anaquel como alimento. Hoy en día la producción de quesos es un proceso de gran inversión de capital, en el cuál uno de los objetivos es satisfacer las expectativas sensoriales del consumidor.

La liberación de ácidos grasos de los triacilgliceroles de la leche durante la maduración de los quesos tiene un papel importante en el caso de los quesos duros (tipo italiano), los madurados (Cheddar, Manchego) y de los quesos de pasta azul ya que los aromas y sabores generados por ellos o por sus productos metabólicos son una parte fácilmente identificable del perfil de sabor de los mismos. Es común que a este tipo de quesos se le adicionen lipasas exógenas para asegurar altos niveles de lipólisis. Sin embargo, el uso de las mismas para la aceleración de la maduración de los quesos aun tiene muchas consecuencias que se deben de resolver antes de poder aplicarlo eficazmente a nivel comercial, entre otras, gran pérdida de enzima en el suero.

En el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM, se ha trabajado en los últimos años en la selección de microorganismos con altas actividades lipolíticas, y en su mejoramiento tanto genético como de sus medios de cultivo. Para el presente trabajo se decidió trabajar con *Penicillium caseicola*, pues se ha estudiado que su actividad lipolítica es mayor a la de otros microorganismos, como *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Penicillium camemberti* y otros del género *Penicillium* y sólo semejante a *Rhizopus delemar*, aunque este último microorganismo tiene, además, una gran actividad proteolítica, la cual podría ser perjudicial para el proceso de maduración

al generar problemas con el manejo del extracto enzimático, producir sabores indeseables y afectar la textura del producto. Las condiciones de obtención del extracto enzimático de *Penicillium caseicolum* por fermentación sumergida están establecidas por el grupo de trabajo, pues se facilita el manejo del extracto enzimático en comparación con una fermentación en estado sólido. También se cuenta con un medio de cultivo mejorado para *Penicillium caseicolum*, en donde se probaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, elementos traza, inductores, etc. para la máxima producción de lipasa y mínima producción de proteasas (Cuervo 1995).

La actividad de la lipasa producida por *Penicillium caseicolum* es mas específica hacia los ácidos grasos de cadena corta (ácido butírico), y estos últimos son en parte los responsables del aroma y sabor característico de los quesos tipo Cheddar (Manchego), es decir tienen una alta nota butírica y un periodo de maduración prolongado, es por ésto que se decidió realizar para el presente experimento un queso tipo Cheddar. En trabajos experimentales previos dentro del área de trabajo (Martínez 1995) se había utilizado un queso tipo Manchego comercial para obtener un producto lácteo modificado con un extracto enzimático lipolítico, con el que se obtuvieron buenos resultados sensoriales.

Se decidió comparar dicha enzima fungal con una enzima comercial de origen animal (Christian Hansen, Lipase di Capretto), en cuanto a las notas sensoriales obtenidas en el queso así como en sus perfiles de ácidos grasos.

Como se señaló anteriormente, al utilizar enzimas para la aceleración de la maduración de quesos se ha observado que ocurre un gran pérdida de enzimas debido a que, por ser hidrolasas, se retienen en su mayor parte en la porción acuosa, es decir el suero, y en muy poca proporción en la cuajada. La tecnología de los liposomas ofrece grandes ventajas para resolver este problema por lo cual en este trabajo se intenta utilizar un sistema modelo de atrapamiento en estas estructuras para enzimas lipolíticas y evaluar su aplicación en la elaboración de quesos madurados.

2. ANTECEDENTES.

2.1 GENERALIDADES DE MADURACIÓN DE QUESOS.

La maduración de los quesos puede ser definida como la transformación lenta y paulatina de las grasas, proteínas y carbohidratos, mediada principalmente por las bacterias iniciadoras y la flora secundaria que se añaden deliberadamente a la leche.

Existen alrededor de 400 variedades de quesos madurados. Sin embargo muchos de éstos simplemente difieren en tamaño, forma, envase y nombre; por lo tanto dicha lista es mas lógica si se agrupan de acuerdo a su contenido de humedad y su flora secundaria. Los quesos con alto contenido de humedad (50-80%) son denominados suaves, algunos se consumen frescos (Ej. el queso Cottage), y otros desarrollan una flora de hongos y levaduras sobre la superficie (Ej. el queso Brie). Los quesos semiduros y semisuaves tienen humedades entre 45 y 50% e incluyen variedades como el queso Edam o el Manchego.

Aunque los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la maduración aun no se conocen con claridad, es generalmente aceptado que la gama de sabores y olores en un queso refleja la diversidad de las condiciones fisicoquímicas (debido a las diferencias en los métodos de salado, niveles de humedad, temperaturas de maduración y pH del queso.) y bioquímicas y propiedades enzimáticas de la flora secundaria (Law, 1984).

Los principales componentes de la leche realmente contribuyen muy poco en el perfil del sabor final del queso, son las modificaciones derivadas de las reacciones subsecuentes que suceden durante la lenta etapa de maduración las que dan el efecto significativo. Un gran número de ésteres se forman durante la maduración, además de

derivados del butanol, propanol, acroleínas, dicetonas, además de varios componentes azufrados. La mayoría de estos compuestos volátiles se sintetizan después de dos meses de maduración (Collin, 1993).

Por lo tanto las notas de los sabores y olores están dadas en gran medida por los ácidos grasos y sus principales derivados como las metil cetonas. Las metilcetonas que son formadas a partir de los ácidos grasos por una oxidación parcial via la β -oxidación de los ácidos grasos (Figura 1).

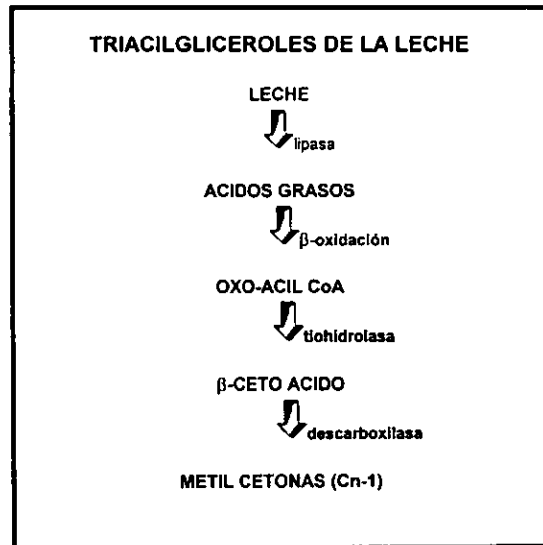


FIGURA 1.- Degradación de los lípidos durante la maduración de los quesos

Es necesario para la industria quesera un conocimiento fundamental sobre los cambios microbiológicos y bioquímicos que ocurren durante la maduración de los quesos si es que ésta desea seguir manteniendo las características tradicionales de los quesos así como sus estándares, en mira de las nuevas tecnologías de proceso, cuyo principal objetivo es el de la productividad.

2.2 GENERALIDADES DE MÉTODOS DE ACELERACIÓN EN LA MADURACIÓN DE QUESOS.

Cada año son procesados un millón de toneladas del queso tipo Cheddar en EUA, La mayoría de estos quesos son madurados durante 3 a 9 meses o más, para lograr desarrollar los sabores, olores y consistencia deseada. Los costos de maduración incrementan significativamente el costo del queso ya que derivan principalmente del almacenamiento en refrigeración y humedades controladas así como de la inversión monetaria que cubre el valor del material que se mantiene en el inventario. La maduración acelerada de quesos tiene el potencial de ahorrar a la industria cientos de millones de dólares al año, y por lo tanto su estudio ha sido de gran interés **(Arbige et al, 1984)**

Una amplia variedad de métodos han sido propuestos para reducir el tiempo de maduración de quesos los que han sido revisados y discutidos por un boletín comisionado por la IDF (International Dairy Federation) **(Law 1978)**. El método más estudiado es el de adición de enzimas. Otros métodos, como la forma del queso, contenido de humedad y de sal también han sido estudiados **(Furtado 1984)**.

Se han aplicado diversos tratamientos para la aceleración en la maduración de quesos bajos en grasa, principalmente incremento de 10-11 C en la temperatura de maduración y la adición de enzimas proteolíticas y lipolíticas a partir de *Aspergillus oryzae*. Se encontró que al elevar la temperatura se incrementaba la proteólisis y la

formación de cristales en la superficie e olores indeseables a partir del segundo mes de maduración. Al utilizar enzimas exógenas se incrementan significativamente los niveles de lipólisis y de proteólisis, sin embargo debido a la mala homogeneidad de las enzimas, estos presentan rancidez a partir del tercer mes de maduración (**Brandsma 1994**).

La adición de enzimas permite una acción más selectiva para la aceleración. Ciertas enzimas comerciales pueden ser utilizadas (**Law et al, 1984**). La utilización de proteasa neutra y de lipasa permite acelerar la maduración del queso Cheddar (**Arbige et al, 1984, Kwak 1990**). Un gran número de enzimas tienen aplicaciones potenciales en el área tecnológica de productos lácteos, sin embargo, la mayoría, no se encuentran comercialmente disponibles (**Fox, 1993**). Solamente el cinco por ciento de las actividades de la industria de la Biotecnología se realiza en el área de alimentos, Fig. 1A

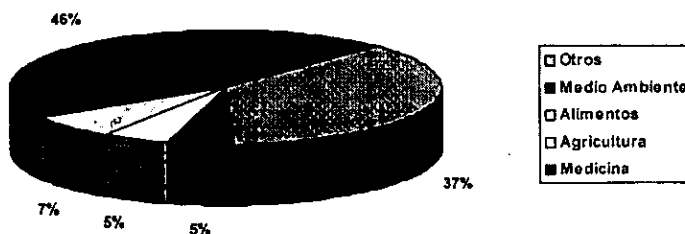


FIGURA 1A.- Principales áreas de desarrollo de 716 industrias de Biotecnología en Europa. Sus actividades varían desde el desarrollo de medicinas, pruebas de diagnóstico hasta elaboración de quesos vegetarianos. (Fuente, Aldridge, 1997)

Existe un gran número de patentes (**Tabla 1**) referentes al uso de lipasas para generar sabores, y dichos ingredientes lácteos modificados enzimáticamente pueden ser utilizados en un rango muy amplio de alimentos para impartir sabor, por ejemplo, en el área de confitería y panadería, en harina para hotcakes y pasteles, sustitutos de crema, dips, aderezos, aceites, margarinas, etc. (**Hagedron 1994, Dziezak 1986**).

TABLA 1

**PATENTES SOBRE EL USO DE LIPASAS EN
APLICACIONES INDUSTRIALES**

Patente	Resúmen	Año	Compañía	Autor
Proceso para la preparación de un sabor a "Blue Cheese".	En un medio acuoso contenido un agente emulsionador se disuelve cierta cantidad de queso azul y se incuba con lipasas y proteasas provenientes de <i>Penicillium roqueforti</i> .	1995	Nestec S.A	Groesbeck, Cheryl Kwen, Stevenl
Proceso para la manufactura de un queso crema sin grasa.	Se describe un método para la preparación de dicho producto, que aproxima el sabor y consistencia de un queso crema con grasa, mediante el uso de diversos microorganismos y extractos enzimáticos.	1995	Raskas Foods Inc.	Meilinger, John H. Brown, C. Gordon Bohan, Montgomery,
Método para la manufactura de un pre-queso y queso natural.	Se describe el método de preparación para un prequeso que puede ser convertido a un queso natural, mediante el uso de diversas operaciones unitarias, y el uso de cultivos, proteasas y lipasas a partir de micrococcos.	1993	KraftGeneral Foods, Inc.	Nauth, K. Rajinder Kostak, Barbara.
Composición de un detergente enzimático líquido.	Describe un método para mejorar la solubilidad de una lipasa dentro de una formulación de detergente, sin modificar su actividad.	1994	Novo Nordisk	Eriksen, Nina Pedersen, Gitte.
Retención de enzimas en la cuajada de queso.	Este es un método innovador que permite retener lipasas o proteasas dentro de la cuajada mediante un tratamiento de solubilidades.	1990	Gemenoor, Inc	Arbige, Michael. Silver, Scott.
Método para producir granulos con sabor a mantequilla.	Se describe el método para preparar granulos de grasa y mantequilla modificada enzimáticamente. Dichos granulos son muy bajos en calorías, tienen una gran intensidad de sabor a mantequilla y se disuelven al contacto con alimentos calientes.	1990	Cumberland Pack.	Bakal, Abraham. Eisenstadt. Marvin E.
Preparación de saborizantes a queso.	Los saborizantes de queso se preparan mezclando una crema lipolizada a partir de crema rica en grasa y queso lipolizado preparado a partir de un queso madurado. Se utiliza una lipasa específica para hidrolizar ácidos grasos de hasta 12 carbonos.	1993	Nestec S.A	Kraiky, Zdenek Vadehra, Dharam

La estrategia tradicional para acelerar la maduración de quesos ha sido el utilizar enzimas como peptidasas, proteasas, y lipasas. Sin embargo en estos estudios se ha encontrado que la adición de enzimas libres a la leche o queso genera una serie de reacciones bioquímicas incontrolables.

Los problemas asociados con esta tecnología son los de no poder obtener una distribución homogénea de las enzimas en el coágulo de la leche. La adición en la leche provoca pérdidas importantes de las enzimas en el suero, para las proteasas puede haber actividad precoz reduciendo los rendimientos. Las lipasas provocan liberación de ácidos grasos en el suero que lo vuelven inutilizable para ciertas aplicaciones en alimentos. La adición directa sobre el coágulo es compatible con ciertas tecnologías (Cheddar, Chihuahua) pero puede haber problemas de homogeneidad a causa de la baja difusividad de las enzimas (García Garibay et al 1993).

Una posibilidad para estas aplicaciones es utilizar enzimas microencapsuladas. La adición de enzimas encapsuladas en liposomas o bacterias lácticas modificadas genéticamente han demostrado algunas ventajas definitivas (El Soda, 1991). Los liposomas formados a partir de fosfolípidos son mas apropiados para la maduración de quesos, ya que dichos compuestos pueden ser degradados en el queso para permitir la liberación de la enzima (Law 1984).

En los últimos años los liposomas se han utilizado principalmente como medios para atrapar enzimas y acelerar el proceso de maduración en quesos, así como también encapsulando β -galactosidasa para la hidrólisis de la lactosa en la leche, y aspectos nutricionales, como la fortificación de la leche de soya con calcio atrapado en liposomas. (Leman 1994, Hirotsuka et al 1984, Picon 1994).

El estudio del uso de enzimas encapsuladas en liposomas para el aceleramiento en la maduración de productos lácteos, se ha dado principalmente al uso de proteasas, ya que en realidad se ha hecho poca investigación dedicada al papel de las lipasas en la maduración de los quesos (Law 1984, Habibi-Najafi 1996).

2.3 GENERALIDADES DE LIPASAS

Las lipasas son enzimas que hidrolizan la unión éster de los triacilgliceroles, en una interfase aceite/agua. Este tipo de enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas, animales o microorganismos. Existen cuatro tipos de especificidad asociados a las lipasas. Estas son de especificidad hacia el acilglicerol, posicionales hacia los ácidos grasos y las estereoespecíficas. La especificidad hacia el acilglicerol es caracterizado por una hidrólisis preferencial hacia los triacilgliceroles de bajo peso molecular. La especificidad posicional se refiere a hidrolizar solamente el enlace éster del ácido graso en la posición 1 ó 2. No se ha reportado a la fecha una lipasa que hidrolice solamente el enlace estérico secundario de un triacilglicerol (Figura 2).

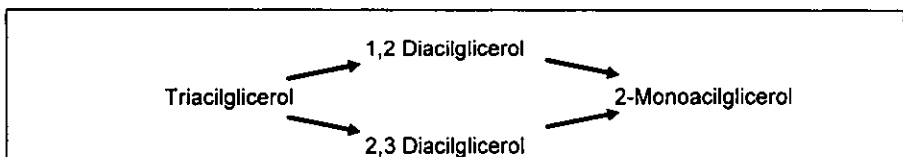


Figura 2. Especificidad de las lipasas sobre los triacilgliceroles.

La especificidad hacia los ácidos grasos ocurre cuando un tipo de ácido graso es hidrolizado más rápidamente que otro tipo, unido en la misma posición y en moléculas de triacilgliceroles parecidas. Por ejemplo, la especificidad que presenta *Geotrichum candidum* por el ácido oléico (Fenemma 1990).

En comparación con las proteasas y carbohidratasas, las lipasas han tenido poca importancia dentro del contexto industrial. Esto en parte es debido al hecho de que se han identificado pocas áreas de aplicación y su producción y rendimiento industrial ha sido tecnológicamente difícil. Sin embargo, esta situación ha cambiado pues se han encontrado áreas de aplicación como la oleoquímica, la síntesis orgánica, formulación de detergentes, y en el área de productos lácteos (Fogarty et al 1984).

2.3.1 GENERALIDADES DE LA LIPASA DE *Penicillium caseicolum*.

Las principales razones para utilizar microorganismos como fuentes de enzimas, sobre los organismos macroscópicos son las siguientes: son fácilmente manipulables, se requiere relativamente poco espacio para su cultivo, pueden optimizarse los medios de cultivo y aumentar la producción de metabolitos, obtención de producto en menor tiempo, ya que tienen ciclos de vida mucho más cortos, se puede mejorar la producción por ingeniería genética o mutagénesis, su extracción es más sencilla y requiere menos tiempo, pueden sobreproducir enzimas mediante el incremento del número de genes que codifican para su síntesis, las fermentaciones enzimáticas a gran escala son económicas debido a su corta duración y medios de cultivo económicos (Klibanov, 1998).

Penicillium caseicolum y *Penicillium camemberti* son los dos hongos comúnmente empleados para la manufactura de queso Camembert, Brie y otros quesos madurados. *P. caseicolum* presenta una especificidad hacia los ácidos grasos de menor peso molecular (Alhir et al, 1990).

Además de ser unos excelentes productores de enzimas lipolíticas, son considerados como importantes catalizadores en la generación de sabores suaves y cremados (principalmente producidos por metilcetonas, esterés, alcoholes primarios y secundarios y compuestos azufrados); además, presentan baja actividad proteolítica en cultivos sumergidos (la proteólisis es causante de sabores amargos); se ha estudiado y establecido un medio de cultivo para mejorar el rendimiento de enzimas lipolíticas a partir de *P. caseicolum* (Cuervo, 1995).

2.4 GENERALIDADES DE LIPOSOMAS

La industria de los cosméticos introdujo por primera vez a los liposomas dentro de sus formulaciones como acarreadores de compuestos para evitar el envejecimiento de la piel y desde entonces surgió un gran interés de utilizar los beneficios de los liposomas en otras aplicaciones.

La industria de los cosméticos es un consumidor comercial importante de los liposomas, y una gran cantidad de cremas y lociones en el mercado los contienen. El lípido por sí mismo es un agente activo para propósitos cosméticos y, por lo tanto, se pueden manufacturar liposomas sin ningún material encapsulado, ya que la bicapa de los liposomas penetra más fácilmente a la piel que suavizantes convencionales. Los liposomas pueden encapsular diferentes agentes cosméticos, como pueden ser humectantes, bloqueadores de sol, lociones, shampoo, etc (Egbaria y Weiner, 1991).

El nombre de "liposoma" se deriva de dos raíces griegas, "lipo": grasa y "soma": estructura, lo cual significa que son vesículas huecas rodeadas de una capa de grasa que encapsula una fase acuosa. Generalmente los fosfolípidos o esfingolípidos de alguna fuente natural forman la pared externa de los liposomas. Estas estructuras mimetizan la

membrana de una célula de cualquier ser viviente y de hecho han sido utilizados como modelos de membranas por los biólogos celulares (Arnaud 1993).

Los liposomas han sido encontrados dentro de antiguos meteoritos, y diversos investigadores creen que los liposomas estuvieron presentes en la tierra primitiva, es decir hace 4 billones de años. Por lo tanto se cree que los liposomas pudieron haber sido las protocélulas, de donde emergió la vida moderna. Entre otros estudios se ha demostrado que dentro de un liposoma se puede llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction) (Aldhous,1995) (Figura 3).

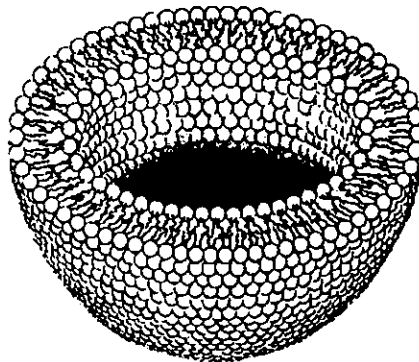


FIGURA 3.- Corte transversal de un liposoma. (Fuente: Arnaud 1993)

La principal propiedad de los liposomas radica en su capacidad para encapsular tanto compuestos polares como no polares. Este proceso ha sido descrito como una forma de microencapsulación, Se ha considerado que podrían tener un uso importante en la industria de alimentos, pues varios ingredientes, diferentes a los utilizados dentro de la industria de cosméticos, pueden ser encapsulados, tales como: sabores, colorantes, enzimas, etc., con el fin de modificar las propiedades físicas, para mejorar la estabilidad o

para controlar los tiempos de reacción. Se han utilizado para encapsular aminoácidos, con el fin de acelerar las reacciones de oscurecimiento de Maillard, pues el mismo fosfolípido del liposoma promueve dicha reacción (Haynes 1992).

2.4.1 ESTRUCTURA DE LOS LIPOSOMAS

La formación de los liposomas se debe a la propiedad de ciertas moléculas anfipáticas de formar agregados en un medio acuoso. Estas moléculas están constituidas por regiones polares y no polares que componen la cabeza hidrofílica y cola hidrofóbica, respectivamente, de los surfactantes (Figura 4).

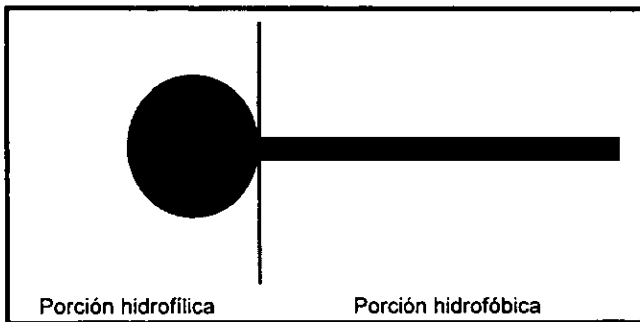


FIGURA 4.- Representación esquemática de una molécula anfipática.

Las partes hidrofóbicas, a niveles arriba de cierta concentración crítica de agua tienden a formar estructuras con mayor estabilidad en donde las partes hidrofóbicas tiene mimino contacto con el agua. Dependiendo de la naturaleza del compuesto anfipático, se pueden formar diversos agregados, estructuras laminares o no laminares (Figura 5).

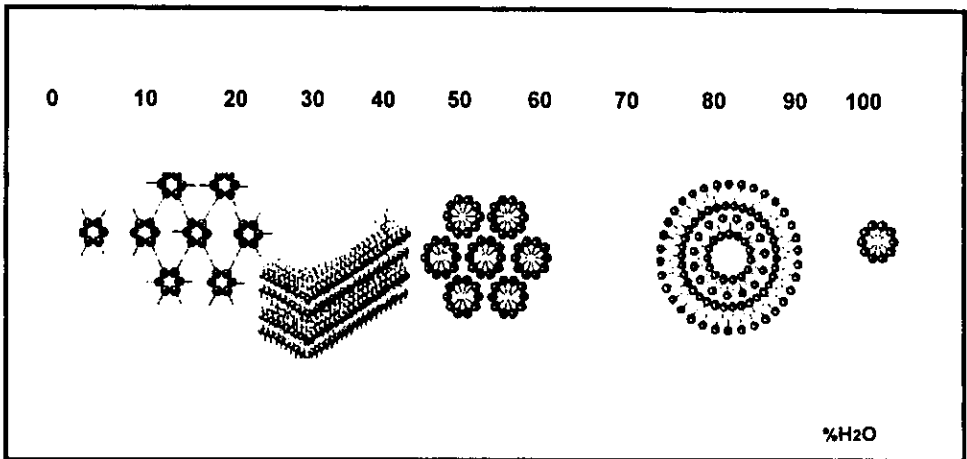


FIGURA 5: Estructuras laminares y no laminares (Fuente : Arnaud 1995)

Los fosfolípidos, debido a la presencia de sus colas hidrofóbicas (cadenas largas de ácidos grasos), no forman micelas arriba de cierta concentración límite. Preferentemente estos se organizan a sí mismos como bicapas: las cadenas de ácidos grasos frente a sí mismos forman una capa hidrofóbica y las cabezas hidrofílicas interactúan con el medio acuoso. Esto probablemente se deba a que las dobles cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos le dan una forma tubular a la molécula, lo cual la hace más adecuada para la agregación en bicapa que a los detergentes que, con una sola cadena de ácido graso, encajan mejor en una estructura micelar esférica.

En bajas concentraciones de agua estas bicapas apiladas se dividen en fragmentos más pequeños que a su vez se rearreglan para formar vesículas cerradas más estables, es decir, los liposomas. Su tamaño varía de 20 nanómetros a micrómetros y son clasificados en 4 principales categorías dependiendo de su tamaño y número de laminaciones.

- SUV: Vesículas unilaminares pequeños (15-25 nm)
- LUV: Vesículas unilaminares grandes. (150-500 nm)
- MLV: Vesículas multilaminares. (100-1000 nm)
- OLV: Vesículas oligo-laminares. (100-1000 nm)

Los SUV's, como su nombre lo indica, son los liposomas más pequeños que se pueden obtener. Consecuentemente, su población es relativamente homogénea en terminos de tamaño. Cada vesícula esta constituida por una sola capa. Entonces, el volumen atrapado varia conforme el cubo de su radio. Como la membrana exterior tiene cierto grosor (alrededor de 4 Angstroms) su volumen acuoso es reducido cuando los vesículas son más pequeños, llevando por lo tanto a una eficiencia de atrapamiento pobre. Mas aún, la presencia de una sola capa los hace permeables a ciertas moléculas solubles en agua. Sin embargo, éstos son de gran interés en el área médica, pues los liposomas pequeños pueden pasar a través del hígado o son menos detectados por los macrófagos en el torrente sanguíneo con el fin de acarrerar medicamentos.

Las LUV's tienen solamente una membrana exterior pero son capaces de encapsular grandes cantidades de fase acuosa. Sin embargo su debilidad mecánica puede fácilmente llevar a la ruptura de la membrana y a la pérdida del contenido. La retención de compuestos solubles en agua es baja.

Las MLV's generalmente incluyen una variedad más amplia de los tamaños de partículas y tienen hasta más de cinco laminaciones. Como sus anillos concéntricos son degradados lentamente, éstos liberan sus contenidos gradualmente. Debido a su mayor número de laminaciones, se logra una mejor retención de moléculas solubles en agua, sin embargo el volumen atrapado es menor que con los LUV's, ya que la cantidad de fosfolípidos requerida para formar bicapas múltiples es mayor.

Los liposomas oligolaminares son generalmente menores que los MLV's y tienen menos laminaciones. Estos combinan un volumen de encapsulación grande y una capacidad de retención alta, lo cual les da un interés muy particular en la microencapsulación (**Arnaud 1993**).

2.4.2 COMPOSICIÓN DE LOS LIPOSOMAS

Las moléculas naturales más comunes que puedan formar estructuras laminares son los fosfolípidos. Pertenecen a los lípidos polares (sustancias grasas insolubles en acetona) y contienen fósforo en su estructura. Por su estructura, se clasifican como glicerofosfolípidos (grupo del glicerol) y como esfingolipidos (grupo esfingosil). Todos los glicerofosfolípidos se derivan del glicerol-3-fosfato y por lo tanto tiene la siguiente estructura básica:

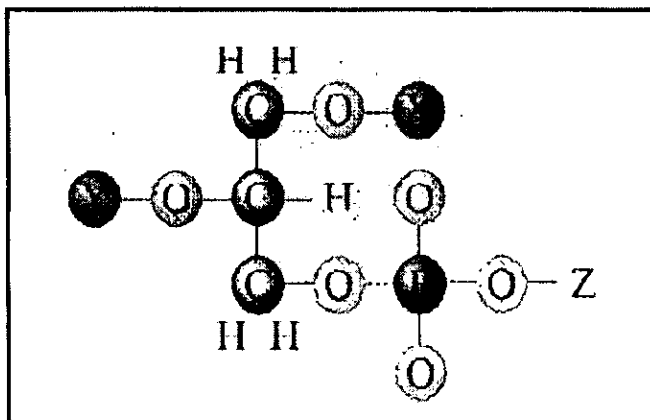


FIGURA 6.- diacil-glicero-3-fosfato.

"X" e "Y" son generalmente ácidos grasos que pueden variar en largo de la cadena y grado de insaturación, dependiendo de su origen, pero son raramente de la misma estructura química. (Tabla 1).

TABLA 2

Ácido Graso	Lecitina de Soya	Lecitina de Cacahuete	Lecitina de Huevo
Ácido Palmítico	18.4	7	37.7
Ácido Esteárico	4.0	2	9.2
Ácido Oléico	10.7	38-41	32.9
Ácido Linoléico	58.0	17-19	17
Ácido Linolénico	6.8	-----	-----
Ácido Araquídico	-----	20-22	-----
Ácido Araquidónico	-----	-----	4-6

Composición porcentual de ácidos grasos de algunas lecitinas

Los glicerofosfolípidos difieren entre sí dependiendo de la naturaleza de el alcohol "Z" esterificado a el fosfato (excepto para el ácido fosfatídico en donde "Z" es un átomo de hidrógeno.) Este alcohol puede ser un amino-alcohol (Ejemplo: Colina, Etanolamina), un alcohol polivalente (Ejemplo: Inositol, Glicerol.) o inclusive un ácido hidroxiamínico (Ejemplo: Serina).

El esfingolípido más común y mejor conocido es la esfingomielina, la cual solamente se encuentra en organismos animales. Éstos consisten de una molécula de ceramida, ácido fosfórico y colina (Figura 7).

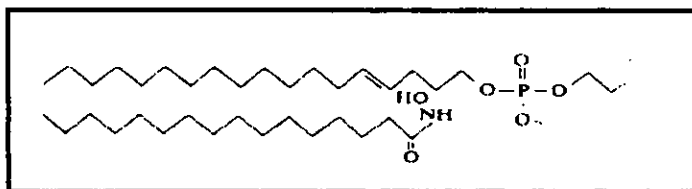


FIGURA 7.- Estructura de la esfingomielina

Los fosfolípidos son parte estructural importante de todas las membranas biológicas y éstas se encuentran en todos los animales, plantas y microorganismos. Hoy en día la principal fuente vegetal es el frijol de soya, seguido del girasol. La principal o única fuente de lecitina de origen animal es la yema de huevo, sin embargo los microorganismos son de una importancia considerable pues en un futuro la producción de fosfolípidos e inclusive la composición de los ácidos grasos podrán ser controlados mediante modificaciones a medios de cultivo o selección de cepas.

La fosfatidilcolina (PC), a partir de huevo o soya es el material ideal para elaborar liposomas. De hecho, el tipo de estructura geométrica es determinada por el tamaño relativo de las cabezas polares y las colas no polares. La PC con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica de igual tamaño tiende a formar bicapas que pueden cerrarse entre sí

para formar liposomas. Más aún, la PC puede ser producida fácilmente en gran escala a un precio competitivo en comparación con otros esfingolípidos (Lucas Meyer 1991).

Otros fosfolípidos que no forman vesículas por sí mismos pueden ser adicionados para modificar la carga neta de los vesículas. La fosfatidilserina, el fosfatidilglicerol, el fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico promueven la repulsión electrostática, previniendo así agregación o fusión entre sí.

Los esteroides son componentes importantes de las membranas naturales. Por lo tanto la incorporación de colesterol en la pared del liposoma les permite tener propiedades similares a las de las membranas celulares, en particular mayor estabilidad. El colesterol es incorporado entre las moléculas del fosfolípido. La pared por lo tanto es más gruesa, ya que el colesterol permite un mayor espacio para que los grupos acil no polares se extiendan.

Los fosfolípidos y el colesterol actualmente utilizados para el estudio de los liposomas en el queso no provienen de la leche. Sin embargo ambos son componentes naturales de la leche y pueden ser consideradas GRAS (New 1990) y sería interesante investigar si es posible aislarlos para la elaboración de liposomas (Skele 1994). La adición de colesterol a la leche puede ser criticada, sin embargo en realidad solamente se le está adicionando menos del 1% del colesterol total normalmente encontrado en la leche, lo cual es insignificante desde el punto de vista nutricional (Kirby et al. 1987). El colesterol incrementa la rigidez y reduce la permeabilidad de las bicapas. La composición de los ácidos grasos en los fosfolípidos afecta considerablemente las propiedades de membrana de los liposomas. Los liposomas formados con fosfolípidos que contienen ácidos grasos insaturados están principalmente en el estado cristal-líquido a temperatura ambiente, mientras que los liposomas formados con ácidos grasos saturados tienden a

formar membranas en estado gel. Esto resulta en bicapas más rígidas con mejores propiedades de retención.

Sin embargo, debido a que la formación de liposomas solamente ocurre en el estado cristal líquido, la mezcla de fosfolípidos saturados debe ser calentada hasta la temperatura de transición antes de la conversión a liposomas. Generalmente estos fosfolípidos saturados son obtenidos mediante la hidrogenación de lecitina poliinsaturada de soya. Adicionalmente a su mayor capacidad de retención, estos fosfolípidos son resistentes a la oxidación y producen suspensiones de liposomas perfectamente blancas e inodoras (Arnaud 1993).

2.4.3 PROPIEDADES DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas se comportan como partículas microscópicas que son capaces de encapsular grandes cantidades de medio acuoso. Uno de los principales intereses de los liposomas es debido a su capacidad de encapsular tanto compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos. Los liposomas pueden ser concentrados o retenidos dentro de diferentes tipos de matrices incluyendo filtros, tierra, o cuajos. Los liposomas retrasan la liberación del material encapsulado, el que es lentamente difundido hacia el exterior, conforme la concentración en la fase externa disminuye. Esta característica es útil cuando se necesita de una acción prolongada. Se ha reportado que sustancias encapsuladas, como la vitamina "C", pueden ser protegidas del medio ambiente (Kirby et al 1987).

2.5 USO DE LIPOSOMAS PARA LA ACELERACIÓN DE LA MADURACIÓN EN QUESOS

Se han utilizado cuatro tipos de liposomas para la investigación de su uso en la maduración acelerada de quesos (Tabla 3) (Skeie 1994).

TABLA 3

Tipo de Liposoma	Tamaño nm	Número de laminaciones
Vesiculos multilaminares (MLV)	100-1000	Cinco o más.
Vesiculos multilaminares pequeñas (SUV)	15-25	Una
Vesiculos por Evaporación (REV)	500	Una o más
Vesiculos por Deshidratación-Rehidratación (DRV)	200-1000	Cinco o más

Características de los Liposomas utilizados en investigación de Quesos.

2.5.1 VESICULAS MULTILAMINARES (MLV).

Las vesículas multilaminares consisten de cinco o más capas y tiene un amplio rango de tamaños. Estos pueden ser producidos al evaporar los solventes orgánicos de los lípidos disueltos en un matraz de fondo redondo. Los liposomas se forman creando una dispersión de los lípidos adheridos a la pared del matraz en un medio acuoso, mediante una agitación (Bangham et al 1965).

El material que va a ser encapsulado puede ser incluido en la capa lipídica o en la fase acuosa, dependiendo del carácter lipofílico/hidrofílico del material. La aplicación de éstos en la investigación en productos lácteos se ha enfocado a la encapsulación de enzimas que son solubles en agua, y que son por lo tanto encapsuladas en la fase acuosa. Las vesículas multilaminares son preparados fácilmente y por lo tanto los primeros experimentos que involucran el encapsulamiento de enzimas para la aceleración de la maduración en quesos utilizaban MLV. Sin embargo la eficiencia de encapsulación de éstos es muy pobre, entre rangos del 2 al 15% (Law y King 1984). Por lo tanto es necesario agregar grandes cantidades de liposomas para asegurar cantidades suficientes de enzima al elaborar el queso.

2.5.2 VESICULAS UNILAMINARES PEQUEÑAS (SUV).

La eficiencia de encapsulación de éstas es del 1 al 2% de la preparación enzimática original (Kirby et al 1987). Las vesículas unilaminares pequeñas pueden ser formados a partir de los MLV por medio de una homogenización. La sonicación es el método de laboratorio más comúnmente utilizado, sin embargo la capacidad del sonicador es una limitante para una mayor productividad de liposomas (New 1990). Para una producción a mayor escala se puede utilizar un microfluidizador (Mayhew et al 1984).

2.5.3 VESICULAS POR EVAPORACION (REV).

Las vesículas formadas por evaporación pueden ser unilaminares o multilaminares. Se preparan evaporando la fase orgánica de una solución sonicada de agua en aceite mediante un rotavapor. El material que va a ser encapsulado se disuelve en la fase acuosa. La emulsión forma un gel líquido cuando la fase orgánica es removida, y ésta finalmente se colapsa hasta formar una emulsión lechosa de liposomas.

Los REV tienen una mayor eficiencia de encapsulación que va del 10 al 20% (Alkhalaf et al 1989). El hecho de que el material que va a ser encapsulado esté en contacto con la fase orgánica limita la aplicación del método para su uso en alimentos.

2.5.4 VESICULAS POR DESHIDRATACIÓN-REHIDRATACIÓN (DRV).

Las vesículas formadas por deshidratación-rehidratación son elaboradas añadiendo el material que se va encapsular a liposomas SUV vacíos, y posteriormente liofilizando dicha suspensión. Al agregar una pequeña porción de agua o buffer a los liposomas SUV liofilizados, éstos se rehidratan, se fusionan y forman liposomas MLV con el material encapsulado entre sus paredes (Figura 8).

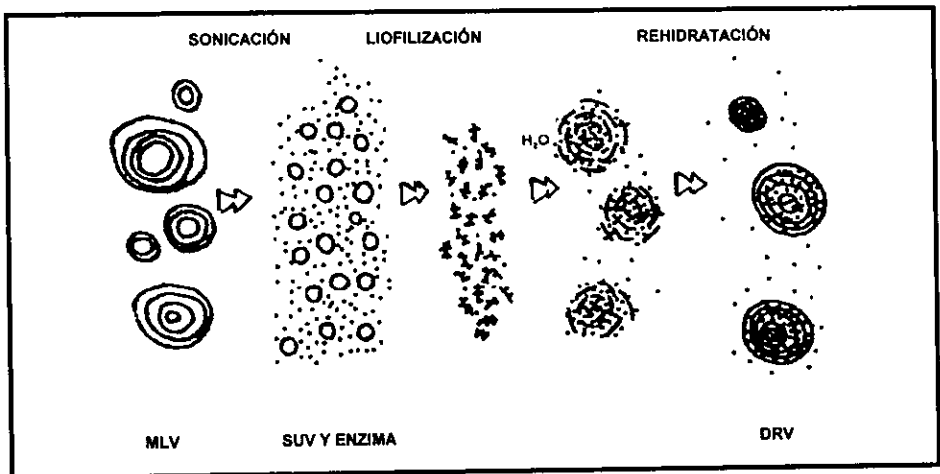


Figura 8.-Procedimiento para la preparación de liposomas por deshidratación - rehidratación.

Los liposomas DRV presentan una eficiencia de encapsulación del 20 al 30% para enzimas pero se han reportado eficiencias de encapsulación hasta del 50% (Kirby y Gregoriadis 1984).

2.2.5 RETENCIÓN DE LIPOSOMAS EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO.

Como se mencionó anteriormente las enzimas adicionadas a la leche, antes de la coagulación, tienen una muy baja retención dentro de la cuajada y por lo tanto la mayoría de la enzima se pierde en el suero. Asimismo Esto ocasiona una lipólisis o proteólisis prematura en la leche, lo que genera un bajo rendimiento y quesos anormales. Estos problemas probablemente se pueden evitar si la enzima es encapsulada en liposomas (Law and King 1985).

La retención de los liposomas en la cuajada aparentemente varía de acuerdo al tipo de liposoma utilizado, la composición de la pared del liposoma, y el procedimiento empleado durante la elaboración del queso. Los liposomas son normalmente adicionados junto con los cultivos iniciadores. Los quesos San Paulin, Cheddar y Gouda han sido estudiados adicionando enzimas encapsuladas en liposomas, son manufacturados utilizando procedimientos muy diferentes, sin embargo su proceso de elaboración es similar hasta el punto de adición de los cultivos iniciadores. Durante la coagulación, los liposomas son retenidos dentro de la cuajada, de una forma homogénea, parecida a la de una bacteria (Skeie 1994). La retención máxima reportada es del 90% para liposomas DRV en un queso tipo Cheddar (Kirby et al., 1987). Se puede asumir una retención similar para liposomas DRV en cualquier otra variedad de queso siempre y cuando éstos, como se mencionó anteriormente, sean adicionados antes de la coagulación.

3.OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Encapsular una lipasa de *Penicillium caseicolum*, obtenida en el laboratorio, en Liposomas del tipo DRV, y evaluar su capacidad de aceleración en la maduración de un queso tipo Manchego.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

Determinar el efecto, en un queso tipo Manchego, de encapsular en liposomas la enzima vs el agregar la enzima libre, mediante un seguimiento del perfil de ácidos grasos y un estudio sensorial.

Determinar si existe una diferencia entre el sistema lipolítico de *Penicillium caseicolum* y el de una enzima comercial de origen animal, mediante las técnicas mencionadas en el punto anterior.

ACTIVIDADES

A) Obtención del Sistema Lipolítico de *Penicillium caseicolum*.

- a-1) Producción a nivel de planta piloto.
- a-2) Evaluación/Optimización del medio de cultivo y condiciones de fermentación.
- a-3) Semipurificación de extracto obtenido.
- a-4) Comparación de actividad vs una lipasa comercial de origen animal.

B) Formación de Liposomas

- b-1) Determinación y estandarización de la técnica de formación de liposomas tipo DRV.
- b-2) Caracterización de los liposomas obtenidos por microscopía electrónica.
- b-3) Encapsulación de la enzima de *Penicillium caseicolum* obtenida en el laboratorio.

C) Incorporación de Liposomas a queso.

- c-1) Elaboración de quesos tipo Manchego.
- c-2) Incorporación de Liposomas al queso.

D) Caracterización del queso tipo Manchego.

- d-1) Mediante un estudio cromatográfico del perfil de ácidos grasos.
- d-2) Mediante una evaluación sensorial de perfil de sabor.

4. METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

4.1.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

Se inoculó una cepa de *Penicillium caseicola* proveniente del cepario de la Facultad de Química en cajas petri con medio de cultivo PDA (Bioxon) y se incubó (Incubadora Precisión System, USA) 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 (Spectronic 21-D, USA) de la solución de esporas, utilizando como blanco glicerol al 50% a una longitud de onda de 540nm (colocando 1 ml de muestra mas tres de agua.) En estas condiciones 1ml de dicha solución de esporas debe dar una absorbancia de 0.12 para inocular 25 ml de medio "D". Se determinó la relación para inocular 100ml de medio "D" mejorado (Cuervo 1995) y se incubó durante seis días (Incubadora con agitación orbital New Brunswick G25, USA) con agitación a 150 rpm y una temperatura de 29°C. Esta fermentación se utilizó como preinóculo para la fermentación en reactor. (Tabla 4).

TABLA 4

Compuesto	Concentración %
Dextrina	1.14
Peptona	1.26
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0.0385
K ₂ HPO ₄	0.1
Aceite de Olivo	1
Sol. de elem. traza*	0.1

Composición del Medio "D" mejorado empleado en la obtención del extracto enzimático de *P.caseicola* (Cuervo 1995)

*Los elementos traza utilizados son: ZnSO₄: 44 mg/ml, MnSO₄:222.30 mg/ml, CaCO₃:100mg/ml, NaCl: 2.92 mg/ml

La fermentación en reactor se llevó a cabo en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, utilizando un reactor de 10 litros con el medio de cultivo mejorado "D" previamente esterilizado, a 29°C con una agitación de 50 RPM y una aereación de 10 L/min, durante 6 días. Transcurrido dicho tiempo el extracto enzimático se centrifugó (5,000 rpm), posteriormente se ultrafiltró y se concentró en un vaporizador al alto vacío-baja temperatura. El extracto enzimático dializado se dializó contra agua destilada utilizando una membrana que retiene proteínas con peso molecular superior a 12,000 Daltons (SIGMA Seamless tubing D-0655). Finalmente se liofilizó (Division Serail RP2V Department Lyophilisateurs) y se almacenó en ultracongelación (-70°C). Posteriormente se le determinó actividad lipolítica, proteína extracelular y actividad proteolítica.

4.1.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD LIPOLÍTICA.

La actividad lipolítica se determinó por caída de pH provocado por la liberación de ácido butírico sobre tributirina homogenizada, al 5% (v/v) en agua desmineralizada a 4°C y 0.05% de Tween 80, en amortiguador Tris-base 5mM pH 9 (homogeneizado), bajo las condiciones de reacción propuestas por **Espinosa en 1990**, reportándose en micromoles de ácido butírico liberado por minuto.

4.1.3 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EXTRACELULAR.

La proteína extracelular se cuantificó utilizando el método de **Lowry 1951**

4.1.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

La determinación de la actividad proteolítica se realizó por el método **Fukamoto, 1967**. Una unidad de actividad proteolítica se define como la cantidad de enzima que libera 1µg de tirosina por minuto a 37°C.

4.2 ENCAPSULAMIENTO DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO EN LIPOSOMAS.

Se preparó una solución de enzima lipolítica de 5mg/ ml en un buffer Tris-base, 5mM, pH=9 (J.T Baker, México). Se prepararon liposomas por deshidratación-rehidratación (DRV) (Método autor). 20 $\mu\text{mol/ml}$ de lecitina (Sigma Chemical Co., San Luis, USA), 11.4 $\mu\text{mol/ml}$ de colesterol (Sigma Chemical Co. San Luis, USA) y 5.7 $\mu\text{mol/ml}$ de dicetilfosfato (Sigma Chemical, Co. San Luis, USA) se disolvieron en 150 ml de Cloroformo (Merck-México S.A.) dentro de un matraz de bola aforado de 50 ml (Quikfit). El solvente se removió en un rotavapor (BUCH, Switzerland) bajo presión reducida y 37°C hasta que se observó una capa fina y uniforme adherida a las paredes del matraz. El matraz se removió del rotavapor y se purgó con nitrógeno, para evitar la oxidación de las grasas. La película obtenida se rehidrató con 300 ml de agua destilada en una atmósfera de nitrógeno y se agitó manualmente hasta la formación de una suspensión. Esta suspensión (Liposomas MLV) se sonicó (Sonicador 550 Sonic Dismembrator, Fisher Scientific) por 10min bajo una cama de hielo, para evitar que subiera la temperatura. La solución sonicada se centrifugó a 24,000 RPM (BECKMAN L7-65 Rotor SW 28), por 1hr a 4°C, con el fin de eliminar las agregaciones mayores de lípidos, y posibles partículas de titanio que pudiesen desprenderse de la punta del sonicador. La suspensión resultante de liposomas pequeños y unilaminares se mezcló (1:1) con la suspensión enzimática previamente preparada. Esta mezcla se liofilizó (Division Serail RP2V Department Lyophilisateurs) hasta polvo, y se mantuvo en congelación (-15°C) hasta su uso. Para su rehidratación y obtención de liposomas DRV se mezcló vigorosamente con 30ml de buffer Tris, 5mM, pH=9 hasta la formación de una suspensión lechosa.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS.

Los liposomas fueron caracterizados en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-35 en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM. Se estableció una técnica empírica para observar los liposomas en un microscopio electrónico de barrido ya que no existe material bibliográfico que describa este método. Esta técnica consistió primero en lavar de 2 a 3 veces perfectamente los liposomas con agua destilada y desionizada mediante una centrifugación a 4000 RPM durante 5 min, dado que el buffer se cristalizaba al momento de observarlo al microscopio. La solución se mezcló con gotas de tetróxido de osmio con el fin de fijar a los fosfolípidos presentes en los liposomas. Posteriormente se tomó una muestra (0.3 ml aproximadamente) con una pipeta Pasteur y se depositó en un cubreobjetos para microscopio electrónico, y se dejó secar al medio ambiente, pues no se debe utilizar ninguna fuente calorífica para secar ya que la lecitina tiene un punto de fusión muy bajo, y por lo tanto los liposomas se desintegrarían. Una vez seca la muestra se procedió a darle un baño de oro (con duración de 5 min. máximo) y se observó en el microscopio electrónico.

4.4 CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA ELABORACIÓN DE QUESOS.

Los quesos se elaboraron en la planta piloto de productos lácteos, del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey, campus Querétaro. El tipo de queso que se realizó es el tipo Manchego (Cheddar) con las siguientes variables:

200 Litros de leche se dividieron en 4 lotes de 50 litros cada uno.

- Quesos con Cultivos iniciadores (de uso industrial) (quesos control)
- Quesos con Cultivos iniciadores y extracto enzimático de *P.caseicolum* encapsulado en liposomas DRV.

- Quesos con Cultivos iniciadores y Lipasa comercial libre*.
- Quesos con Cultivos iniciadores y Lipasa comercial encapsulada en liposomas DRV.

*Christian Hansen, Lipase di Capretto, Ingredientes: Lipasas comestibles provenientes de las glándulas de la garganta de cabrito, sal, leche sin grasa en polvo. Lote No. 21095F, Peso: 5.6 Oz.

4.5 ELABORACIÓN DEL QUESO TIPO MANCHEGO

La leche se obtuvo un día anterior a la elaboración de los quesos, del Rancho Experimental Campus Querétaro, durante la ordeña de la tarde (18:00 hrs), proveniente de vacas tipo Holstein, alimentadas con pastura, de una manera controlada.

La ordeña se llevó a cabo de una manera automatizada (Equipo Alfa-Laval), lavando primeramente la ubre de la vaca, posteriormente desinfectando la misma con solución de yodo, así como la boquilla succionadora. La leche se succionó, se cuantificó, se bombeó y finalmente se confinó en una tolva enchaquetada con agitación de espas interior a una temperatura de 4°C.

13 horas después de la ordeña (7:00 a.m. del día siguiente) en la planta procesadora se recibieron 200 Litros de leche en tambos de 40 L, refrigerada entre 4-6°C. Como control de calidad se le determinó porcentaje de grasa (por el método de Gerber), temperatura y acidez (por titulación con sosa 0.1M). Los 200L de leche se depositaron en una tina rectangular enchaquetada, con calentadores de gas interiores con una capacidad de 350L. Se procedió a la pasteurización subiendo paulatinamente y con agitación manual la temperatura de la leche hasta 63°C y manteniéndola por 30min.

Posteriormente, mediante la circulación del agua enchaquetada, se baja la temperatura hasta 40°C, etapa en la cual se adicionan los cultivos lácticos (Ezal Rhone-Poulenc®, MD099 Crema 30% y MM101), previamente diluidos en una misma porción de la leche). Se procedió a la separación de los lotes, separando la leche en 4 tinas previamente desinfectadas (Tabla 4).

Se agregó la solución de Cloruro de Calcio (CAL-SOL, CUAMEX, Solución de Cloruro de Calcio en agua al 50%) en proporción de 15ml/100 Litros de leche, asimismo se agregó el colorante natural de achiote en proporción de 3ml/100 Litros de leche. Se agitó brevemente y se trata de mantener la temperatura de la leche entre 35-40°C. En esta etapa se agregaron los 3 diferentes extractos enzimáticos liofilizados, previamente hidratados (Tabla 4), hasta formar la suspensión lechosa (Liposomas DRV), agregandose directamente a la leche y agitando esta durante cinco minutos.

TABLA 4

Lote 1 (50 L)	Extracto enzimático lipolítico encapsulado en liposomas	555 ml de la suspensión de Liposomas. (108UI)
Lote 2 (50L)	Enzima comercial encapsulada en Liposomas	555 ml de la suspensión de Liposomas (108UI)
Lote 3 (50L)	Enzima comercial libre	555 ml de solución enzimática.(108UI)
Lote 4 (50L)	Testigo	Sin adición de enzimas.

Condiciones de adición de los Liposomas durante su adición a la leche.

Se agregó el cuajo en proporción de 15ml cuajo/100 litros de leche (CUAMEX "CUAJO XXX" , "Cuajo líquido para la elaboración de quesos." Potencia 1:10,000, Lote No. 19195, Fecha de elaboración: 09-95. Ingredientes: Solución de Cloruro de sodio, Alcohol Etilico, Propilenglicol, Enzimas Coagulantes (Renina) de origen Bovino, 1.9% de propionato de sodio y 0.1% de benzoato de sodio como conservador). Se esperó de 30 a 40 min a que el cuajo actuara, la temperatura se mantuvo aproximadamente a 35-37°C. Posteriormente para conocer si la cuajada estaba lista se introdujo un cuchillo previamente desinfectado, y al retirarlo éste salió completamente limpio.

Se procedió al corte de la cuajada, primero con la lira horizontal y después con la lira vertical. Se formaron cubos de aproximadamente 1cm³. y finalmente se dejó reposar por cinco minutos. Se procedió a agitar muy lentamente con una pala, con el fin de inducir la separación de la cuajada, sin que ésta se desintegrara. Después de 10 min la cuajada tomó más consistencia y se agitó un poco más fuerte durante 15 min. Se desueró hasta la mitad del volumen total, y se agregó la sal en proporciones de 4 a 7 g/L de leche. La sal se disolvió en agua potable caliente en proporción de 20 L/Kg sal. La temperatura subió aproximadamente alrededor de 37°C, y ésta se mantuvo por espacio de 5 a 7 min. Se procedió a desuerar completamente y la cuajada se apiló en una esquina de la tina, se prepsó con un plafón de acero inoxidable de alrededor de 8Kg de peso, se dejó prensado por espacio de 30-45 min (con el fin de generar acidez y de que se produjera el fenómeno de cheddarización), o empíricamente hasta que la cuajada adquiriera consistencia de "pechuga de pollo".

En seguida se prensó la cuajada envuelta en manta de cielo mojada con agua caliente en moldes con capacidad de 1Kg. Estos se prensaron con una pesa de 25Kg durante 30 min, después se sacaron del molde se voltearon y se dejaron con la misma presión durante toda la noche (18 hrs). Al día siguiente se sacaron los quesos del molde, se les quitó la tela, se recortaron imperfecciones con un cuchillo y se sumergieron completamente en una salmuera (7Kg sal/30L agua, 19-20°Baumé, pH=5), dentro de la

sala de maduración (6-8°C) por un periodo de 5-8 hrs. Se sacaron los quesos de la salmuera y se acomodaron sobre maderas dentro de la sala de maduración por un periodo de dos días con el fin de que adquirieran mayor dureza, volteándolos de lado cada 12 horas. Los quesos se maduraron dentro de un refrigerador con una temperatura entre 5-6°C como último paso en el proceso de elaboración.

4.6 MUESTREO DE QUESOS

Se planeó un periodo de muestreo de cada lote de quesos cada 10 días durante tres meses, con el fin de seguir la evolución del perfil de ácidos grasos libres de cada lote mediante cromatografía de gases.

El muestreo se realizó del centro del queso mediante un monohorador, obteniendo 1.5 g de queso aprox. en forma de cilindro. Las muestras se mantuvieron en congelación hasta su análisis.

4.7 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES.

Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos libres (C:4, C:6, C:8, C:10, C:12, C:14, C:16, C:17, C:18, C:18:1), por cromatografía de gases se siguió la técnica propuesta por **Deeth 1983** y que consiste en lo siguiente:

A un gramo de queso finamente picado se le agregaron cinco mililitros de éter etílico, un ml de ácido sulfúrico 4N y 2.5g 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 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. 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 con los ácidos grasos se mantuvo en viales de 1.5 ml a 15°C hasta que se realizaron las determinaciones. La alúmina se mezcló con éter diisopropílico que contenía 6% (v/v) de ácido fórmico, se mezcló vigorosamente y se centrifugó en viales de 1.5ml en una microcentrífuga (Eppendorf 5415C, Brinkmann Instruments, Alemania) a 5000 rpm/5min. El sobrenadante se separó en viales y se inyectó 1µL al cromatógrafo. Las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de productos lácteos de la Unidad de Posgrado de la UAM Xochimilco, en un Cromatógrafo de gases Perkin Elmer XLS, con detector de ionización de flama y una columna capilar HP5 (Fenilmetilsilicon al 5%) de 30 M, 0.32mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor de capa bajo las siguientes condiciones: Rampa: 80°C/1min e incremento de 10°C/min hasta llegar a 250°C y se mantuvo por 4min. Temperatura del inyector: 250°C, Temperatura del detector: 250°C. El modo de inyección fue "splitless".

4.8 EVALUACIÓN SENSORIAL

La evaluación sensorial se llevó a cabo con jueces previamente entrenados en evaluación de quesos por un grupo de trabajo de la Facultad de Química. Estos jueces fueron anteriormente seleccionados en base a sus habilidades sensoriales y pasaron por un período normal de selección (Pedrero 1989), es decir reclutamiento, pruebas de umbral de gustos básicos, pruebas de diferenciación, prueba triangular, y por último pruebas de perfil de sabor tras lo que fueron seleccionados 15 jueces.

Dichos jueces estaban familiarizados con la notas normalmente encontradas en quesos madurados, por lo que solamente fueron necesarias dos reuniones para generar descriptores encontrados en uno de los quesos elaborados, escogido al azar (se supuso que los descriptores sólo variarían de intensidad entre los quesos elaborados bajo diferentes condiciones). Se llegó a un lenguaje común y se elaboró el perfil de sabor en

base a los descriptores definidos de cada uno de los lotes de queso elaborados. El objetivo de la prueba de perfil de sabor es el de analizar el sabor integral de un producto, así como sus atributos individuales y la relación que guarden entre ellos. La prueba se ejecutó de tal manera que se genera el mayor contenido de información posible acerca de un producto (Pedrero 1989).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO.

Se logró llevar a cabo la fermentación sumergida de *Penicillium caseicolum* a nivel de reactor (10L), y la posterior semipurificación (especificada en la metodología pág 28, sección 4.1.1) de la lipasa con buenos resultados de actividad, no obstante que *Penicillium caseicolum* es un microorganismo que se contamina fácilmente durante las fermentaciones, principalmente por levaduras, lo cual se ha observado en diversos estudios dentro del equipo de trabajo (De Los Ríos 1995, Martínez 1995)

El extracto enzimático obtenido de el reactor tuvo las siguientes características, antes y despues de encapsular (Tabla 1)

TABLA 1

Tipo de extracto	pH final	Proteina Extracelular µg/mL	Actividad Proteolítica µmol tir/mL	Actividad Lipolítica µmol de ac. but./min/ml
Extracto Enzimatico Libre	3.88	3514.68	689.87	68.32
Extracto Enzimático en Liposomas	5.17	-----	-----	27.601

Resultados de actividad del extracto enzimático de *P.caseicolum* (Promedio de tres réplicas)

Los valores reportados en la tabla anterior se encuentran en el rango de los valores reportados en otros trabajos (Cuervo 1995, De los Rios, 1995, Martinez, 1995). La actividad proteolítica no es lo suficientemente alta como para tener problemas de estabilidad o riesgo de generar sabores amargos.

5.2 DETERMINACION DE ACTIVIDAD LIPOLITICA EN LA ENZIMA COMERCIAL.

Al extracto enzimático comercial en polvo (Christian Hansen, Lipase di Capretto, Ingredientes: Lipasas comestibles provenientes de las glándulas de la garganta de cabrito, sal, leche sin grasa en polvo. Lote No. 21095F, Peso: 5.6 Oz.) se le determinó actividad lipolítica bajo diferentes condiciones de pH. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

pH=6	pH=7	pH=9
15.65	12.73	10.12

Actividad Lipolítica de la enzima comercial Chr. Hansen en micromol de ac. Butírico/min/mL a diferentes valores de pH. Resultados de actividad de la lipasa comercial de origen animal (Promedio de tres replicas)

Como se puede observar en la tabla 2 la actividad lipolítica de dicha enzima comercial es muy baja, al menos por el método de determinación utilizado el cual consiste en determinar actividad lipolítica por caída de pH (Espinosa 1990). Esto probablemente se deba al uso de gran cantidad de extendedores dentro de la formulación de la enzima comercial. El pH al cual se obtuvo la mayor actividad lipolítica de la enzima comercial fue de 6, cabe señalar que el fabricante no indica más detalle de como aplicar o determinar actividad enzimática. Por lo tanto con el fin de homologar y poder comparar con la lipasa de *P.caseicolum* se ajustó la actividad de la enzima comercial, como se menciona en el punto 5.5.

5.3 PREPARACION DE LOS LIPOSOMAS

Para la preparación de los liposomas se decidió utilizar los mismos componentes y en las proporciones sugeridas en trabajos anteriores dentro del equipo de trabajo (De los Ríos, 1995) en base a la siguiente argumentación:

El fosfolípido principal es de suma importancia pues de este va depender las características finales del liposoma. La Fosfatidilcolina o Lecitina con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica de igual tamaño, tiende a formar bicapas que pueden cerrarse entre sí para formar liposomas de gran resistencia debido a la fuerzas de atracción entre las cabezas de los fosfolípidos con diferentes cargas, más aún, la lecitina puede ser producida fácilmente en gran escala a un precio competitivo en comparación con otros esfingolípidos. El colesterol fue utilizado ya que diversas fuentes reportan que este esteroide incrementa la rigidez y reduce la permeabilidad de las bicapas. El dicetilfosfato se seleccionó pues debido a que por su naturaleza química promueve la repulsión electrostática, previniendo así agregación o fusión entre los liposomas.

Se decidió producir liposomas del tipo DRV (Dehydration-rehydration vesicles), pues se ha encontrado que, a diferencia de los demás métodos de preparación de liposomas, la enzima que va ser encapsulada no es expuesta directamente a la fase orgánica (Cloroformo) durante su preparación. Además, este tipo de liposoma es el que mayor retención teórica de la enzima presenta (30%), así como mayor retención teórica en la cuajada durante el proceso de la elaboración de los quesos (en promedio 60%). Debido a que los liposomas DRV tienen una gran eficiencia de encapsulación, estos pueden ser utilizados para manufacturar queso a una escala de planta piloto (Skeie, 1994).

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

Según la técnica anteriormente descrita, se obtuvieron algunas fotografías a diferentes aumentos. (Fotografías 1-9).

Como se puede observar en las mismas, el tamaño promedio de los liposomas es de 3-7 μm . La fotografía 1 y 2 permiten observar la morfología perfectamente cilíndrica del liposoma elaborado por el método de deshidratación-rehidratación (DRV) con un tamaño promedio de 3 a 6 micras. Mientras que en las fotografías 3 y 4, se observa un fenómeno de fusión de un liposoma DRV con liposomas unilaminares pequeños (SUV), esto probablemente es debido a que durante la formación de los liposomas DRV el exceso de fosfolípido tiende a formar liposomas SUV y a su vez éstos para una mayor estabilidad en el medio tienden a fusionarse con los Liposomas DRV, los cuales contienen colesterol en su estructura lo cual les da mayor estabilidad.

En las fotografías 5 y 7 se observa un fenómeno de fusión entre liposomas DRV y de liposomas SUV. En la fotografía 6 se muestra un acercamiento al punto de fusión entre los dos liposomas DRV de la fotografía 5.

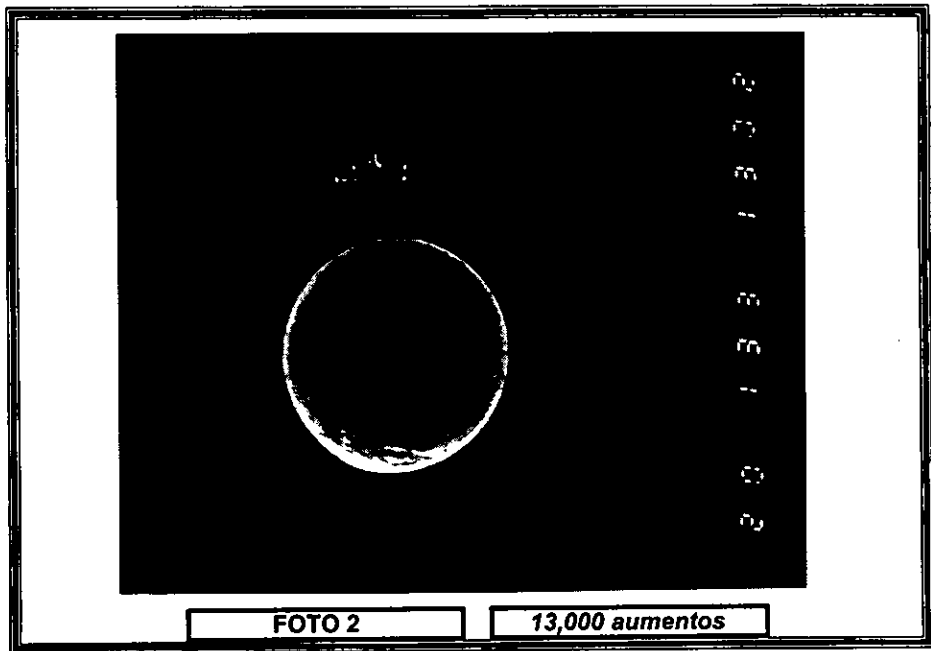
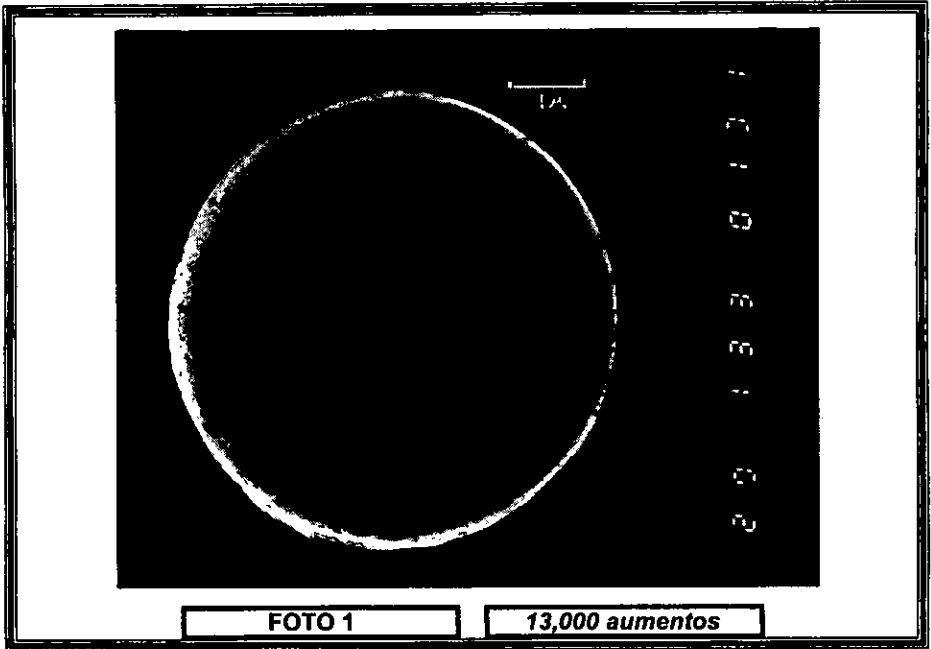
En las fotografías 8 y 9 se observan liposomas DRV, y detrás de estos una masa amorfa, que probablemente sea un exceso de extracto enzimático. Es importante mencionar que el hecho de encontrar fusiones entre liposomas DRV y lo que probablemente podría ser un exceso de extracto enzimático, nos indica que se podría mejorar la formulación de los liposomas en cuanto a la proporción de sus ingredientes respecto a la enzima a encapsular. Así mismo se recomienda realizar un estudio microscópico electrónico de transmisión bajo las condiciones establecidas para la

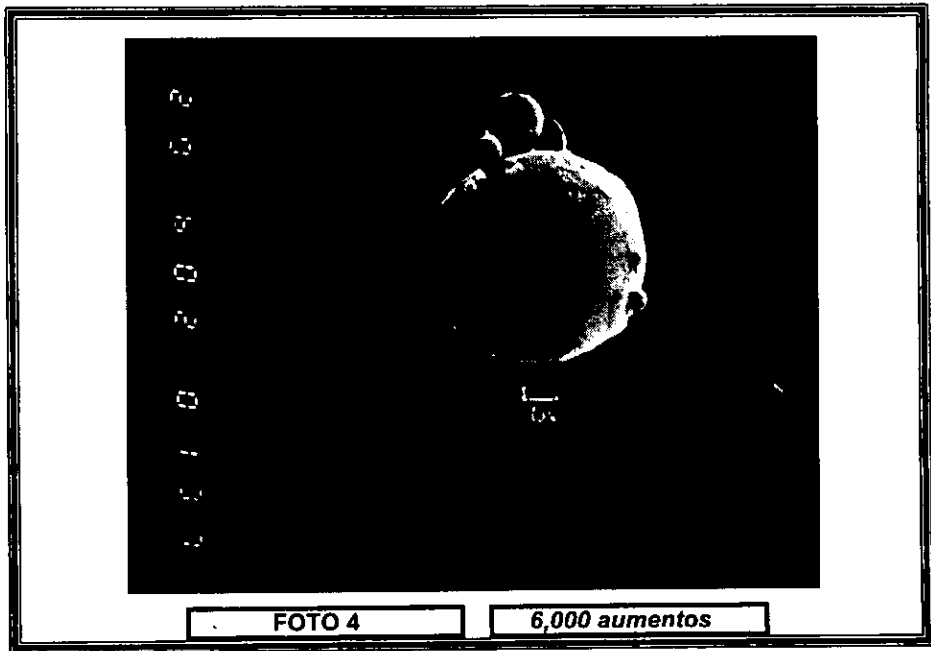
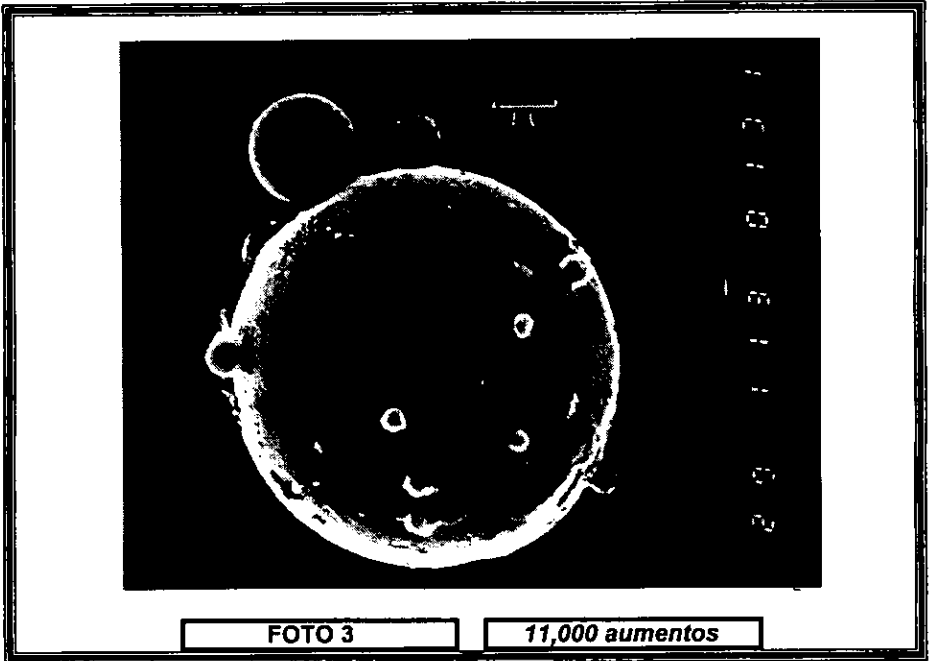
preparación de muestras para éste, con el fin de cuantificar el número de capas laminares y espesores de las paredes liposomales.

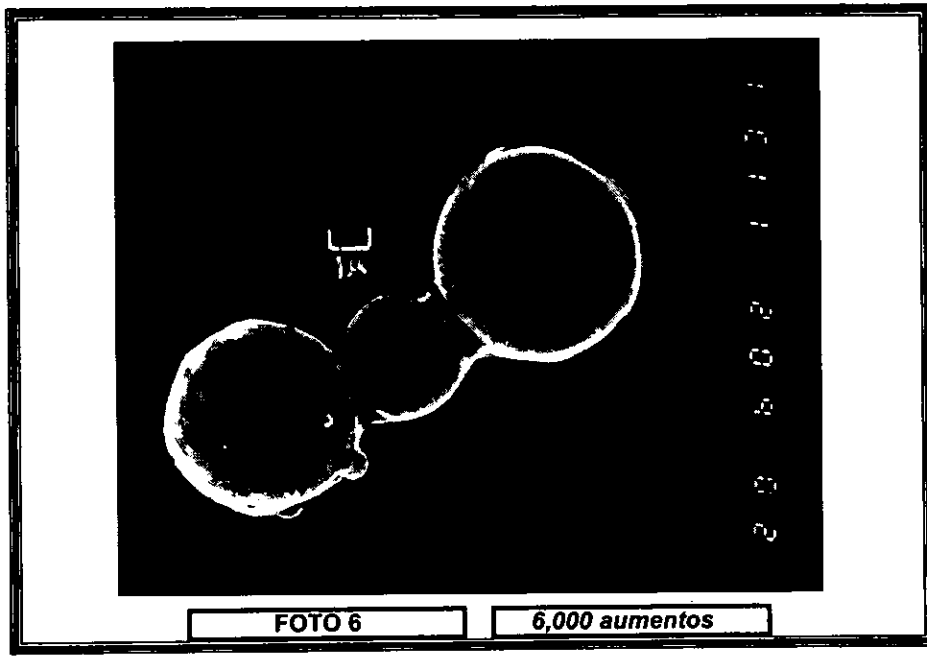
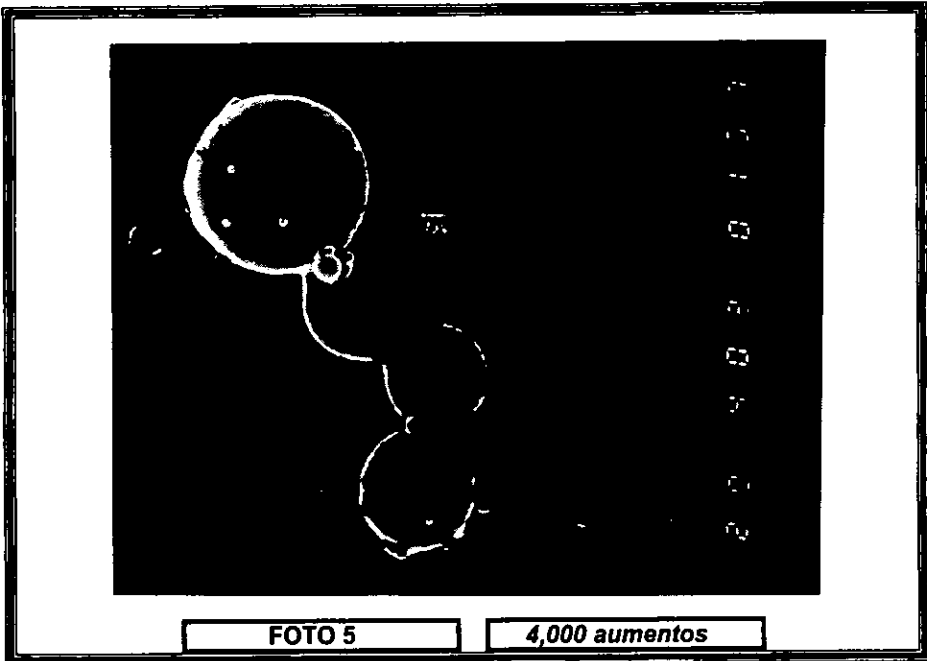
5.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA ENCAPSULADA NECESARIA PARA LA MODIFICACIÓN DE LOS QUESOS

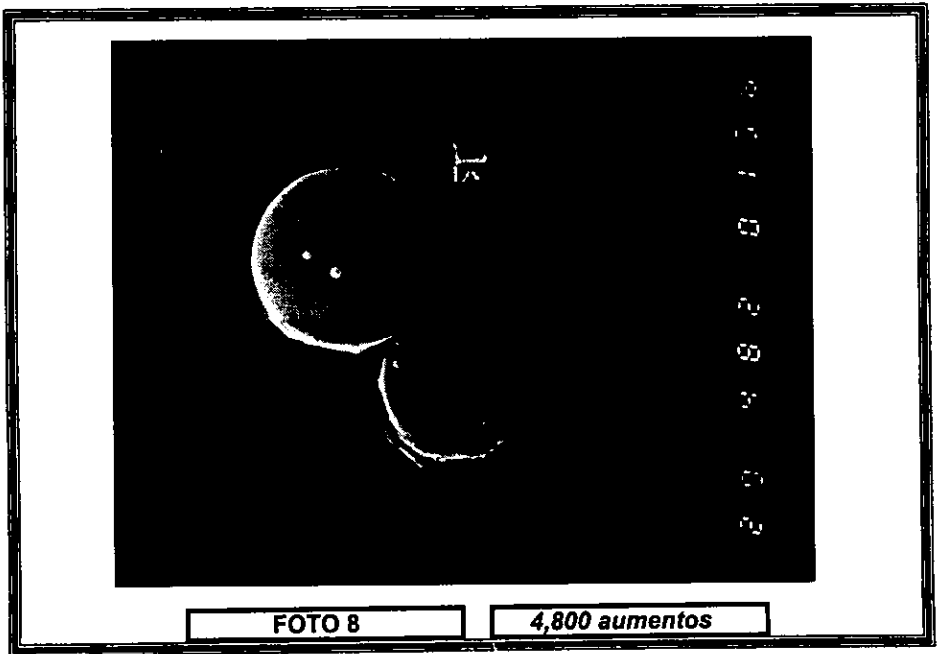
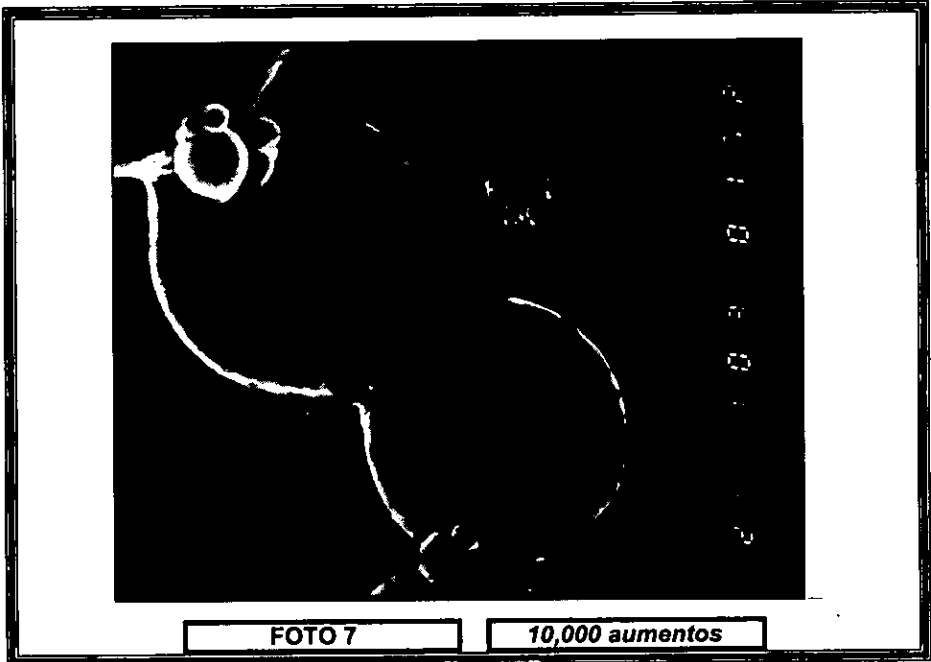
Con el fin de cuantificar la concentración de enzima encapsulada necesaria para modificar significativamente la maduración de los quesos, en el grupo de trabajo se habían realizado anteriormente investigaciones en las que se modificó un producto lácteo con extracto enzimático de *Penicillium caseicolum*, encontrándose que mínimo se requería una actividad de la lipasa de 108UI / ml por cada 50g de queso para lograr modificar el perfil de ácidos grasos libres y consecuentemente el sabor del queso (Matute 1993).

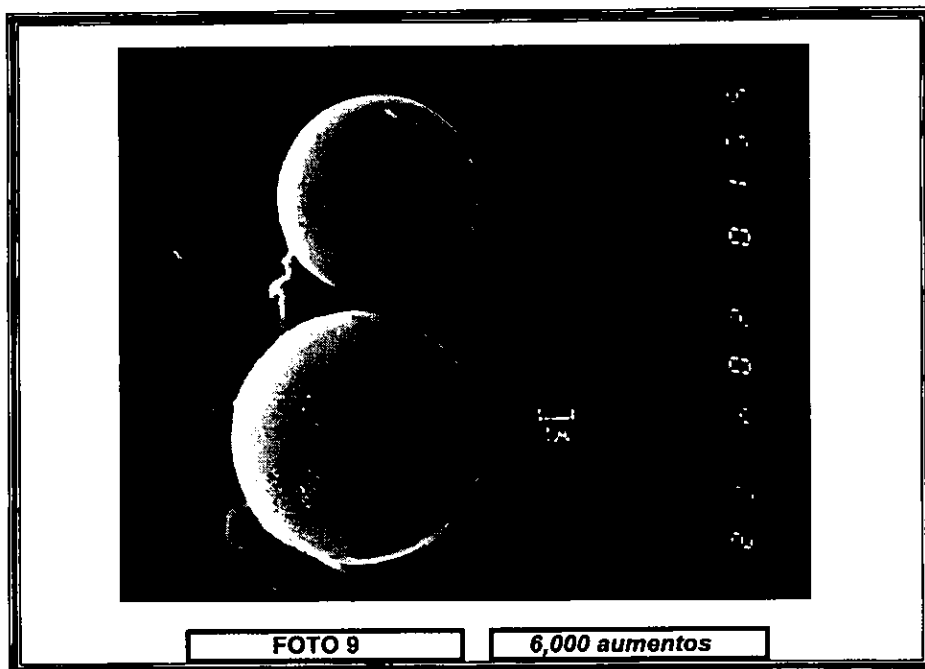
Tomando lo anterior como antecedente, y ya que cada lote de leche a procesar sería de 50 L , y que el rendimiento teórico durante la elaboración de un queso es del 10% (5 Kg de queso) se necesitarían 100 ml de extracto enzimático (108 UI) por cada lote. Pero si tomamos en cuenta que la eficiencia teórica de encapsulación de la enzima por los liposomas DRV es del 30%, y la capacidad teórica de retención de lo liposomas en la cuajada es del 60%, se necesitan 555.30 ml de una solución de liposomas con extracto enzimático de 108 UI. Por lo tanto la actividad del extracto enzimático obtenido se ajustó a 108 UI.











5.6 PROCESO DE ELABORACION DE LOS QUESOS

5.6.1 CONTROL DE LA MATERIA PRIMA

La leche utilizada para la elaboración de los quesos, previamente ordeñada bajo buenas prácticas de manufactura, tuvo las siguientes características fisicoquímicas (Tabla 3).

TABLA 3

% Grasa	3.3
% Acidez	1.5
Temperatura (°C)	10

Calidad de la leche empleada.

Como se puede observar dichos porcentajes se encuentran dentro de las normas de especificación (NOM-F-307-S-1980).

5.6.2 RENDIMIENTO DE LOS QUESOS.

TABLA 5

LOTES	Tipo de Enzima utilizada	%	Número de Quesos obtenidos (Peso Promedio 1Kg)
1	Extracto enzimático lipolítico encapsulado en liposomas	10.7	11
2	Enzima comercial encapsulada en Liposomas	10.5	10
3	Enzima comercial libre	10.0	10
4	Testigo	11.5	11

Rendimiento obtenido de los quesos elaborados.

Como se puede observar en la tabla 5 como era esperado por la baja actividad proteolítica del extracto enzimático, los rendimientos de los cuatro lotes de queso son muy parecidos entre sí y comunes para el tipo de queso elaborado. El rendimiento se puede ver afectado por la cantidad de proteasas presentes en el extracto enzimático que provocan una coagulación prematura e inespecífica, por lo tanto es interesante observar que el rendimiento de los lotes que contenían al extracto enzimático encapsulado es ligeramente mayor que el de el lote con la enzima sin encapsular. Esto probablemente se deba al beneficio de contener a la enzima en un sistema encapsulado y así evitar el contacto prematuro con las proteínas presentes en la leche y con ello evitar un rendimiento pobre. Sin embargo el mayor rendimiento lo obtuvo el lote testigo, aunque la diferencia con los demás lotes no es significativa.

5.6.3 MADURACIÓN DE LOS QUESOS

Los quesos, una vez prensados y bañados por 18 hrs en una salmuera (de entre 19 y 20°Be), se dejaron reposar por dos días, con el fin de reafirmar su textura, sobre tablas en una sala de maduración con condiciones de temperatura y humedad controladas: 8-12°C y 70-80%HR respectivamente.

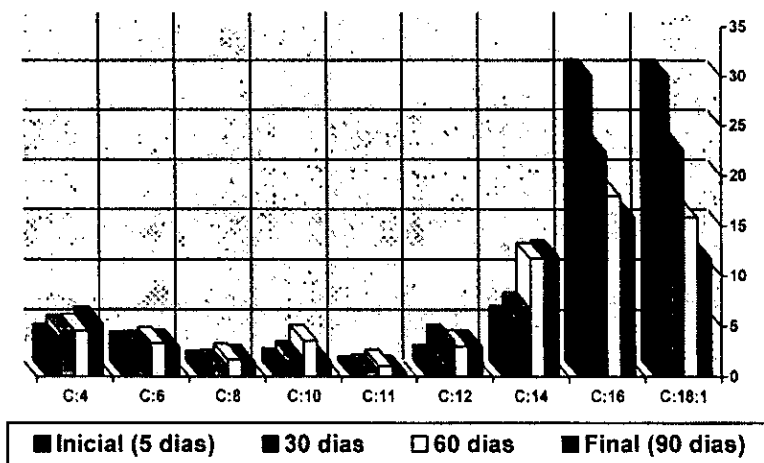
Diversas fuentes sugieren que la maduración de este tipo de quesos se lleve a cabo con temperaturas entre 7-15°C a humedades relativas entre 80-90%. Sin embargo, por cuestiones prácticas la maduración de los quesos se llevó a cabo en un Refrigerador (Kelvin) durante tres meses, a una temperatura promedio de 5 a 7°C, con una humedad relativa entre 50 y 60%.

5.6.4 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES.

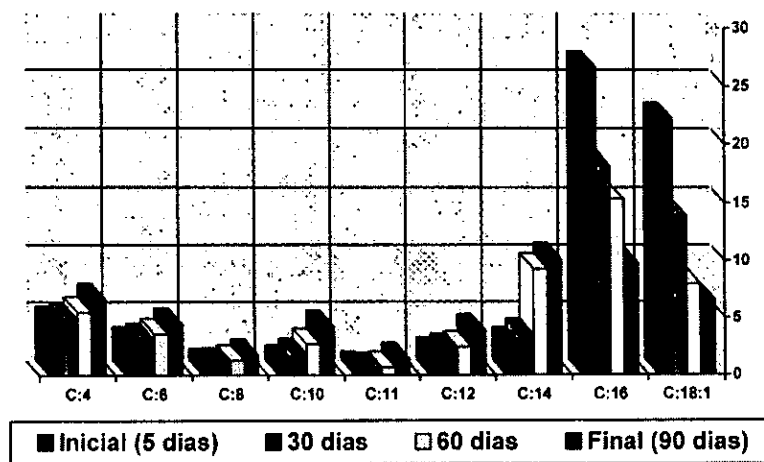
Diversos autores (Law, 1984; Moskowitz, 1987) señalan la importancia de los ácidos grasos libres en el sabor de los quesos madurados, así como el de otros productos, principalmente los derivados de la degradación de proteínas. Estos ácidos, a su vez, son importantes porque son el principio de la cadena 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. Conocer el contenido de AGL de un queso no explica en su totalidad los aspectos de la composición de su sabor y olor.

Un queso de cada uno de los cuatro lotes se muestreó durante tres meses, con tomas de muestra cada diez días, con el fin de determinar el cambio en el perfil de los ácidos grasos liberados (AGL) mediante un estudio de cromatografía de gases.

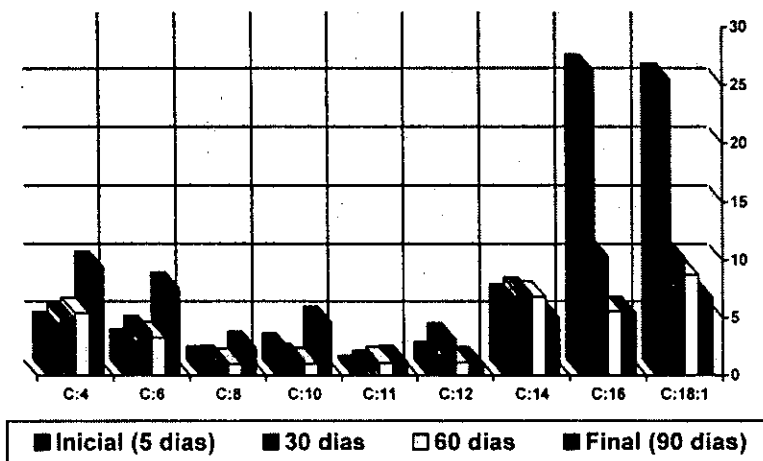
El perfil de ácidos grasos libres (AGL) generado durante el proceso de maduración en las condiciones anteriormente mencionadas sufrió un cambio paulatino y progresivo en cada uno de los lotes de queso por el extracto enzimático utilizado. El testigo liberó ácidos grasos más despacio que los demás lotes. Los resultados obtenidos se pueden observar en las gráficas 1,2,3,4 y 5. Se debe señalar que existió una disminución en el contenido de ácidos mirístico, palmítico, y oleico de los 30 días a los 60 días de maduración principalmente en todos los quesos. Esto se le puede atribuir al hecho de que estos ácidos están siendo degradados y transformados en otros compuestos, como metil-cetonas, por la flora bacteriana presente, como se ha demostrado en otros trabajos en los que inicialmente se encontraron concentraciones altas de ácidos grasos libres, pero rápidamente decrecieron en comparación con el incremento de la concentración de metilcetonas principalmente la 2-Nonanona (Pannell, 1991). Se ha observado que el ácido oléico es el más susceptible a sufrir reacciones de oxidación (Margalith, 1981).



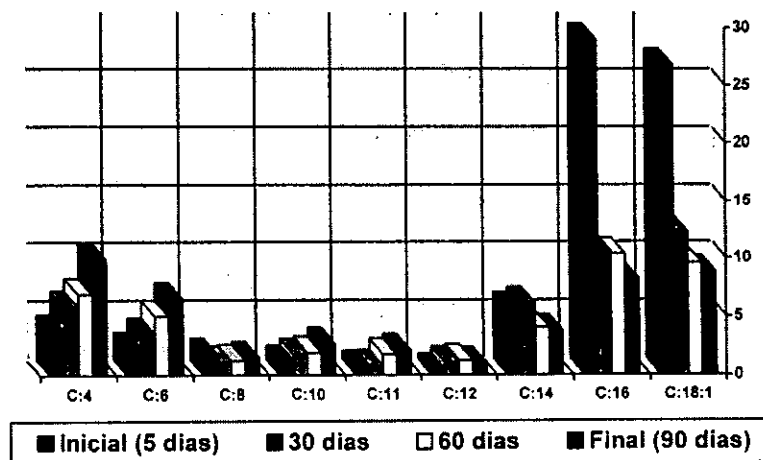
Grafica 1.- Composición Porcentual de los Ácidos Grasos Libres Generados durante el proceso de maduración del queso testigo.



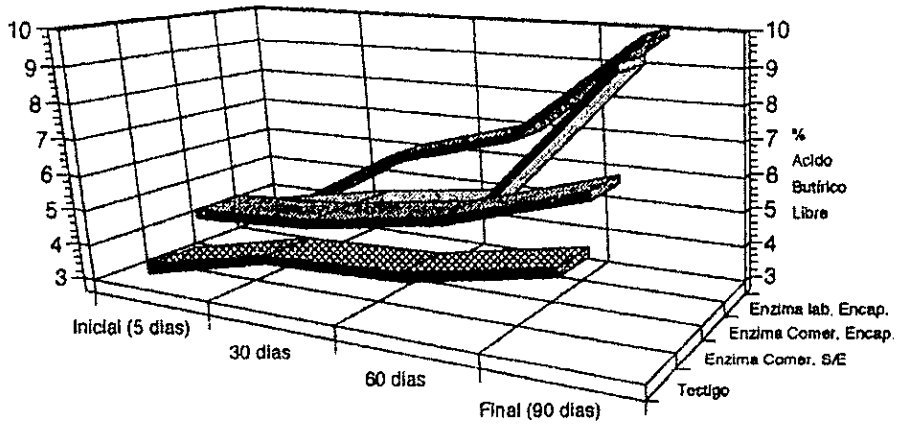
Grafica 2.- Composición Porcentual de los Ácidos Grasos Libres Generados durante el proceso de maduración del queso con enzima comercial sin encapsular.



Grafica 3.- Composición Porcentual de los Ácidos Grasos Libres Generados durante el proceso de maduración del queso con enzima comercial en Liposomas.



Grafica 4.- Composición Porcentual de los Ácidos Grasos Libres Generados durante el proceso de maduración del queso con extracto enzimático de *P.caseicolum* encapsulado en Liposomas.



Grafica 5. - Composición porcentual del Ácido Butírico libre en los quesos a lo largo del período de maduración.

La mayor degradación de los ácidos grasos de cadena larga (mirístico, palmítico, y oleico) se observó en los quesos con las enzimas encapsuladas, y en mayor medida en el queso con la enzima comercial encapsulada, pues en este último el porcentaje presente se redujo a menos de la mitad de la concentración original durante el periodo de maduración. El queso testigo y el queso con enzima comercial sin encapsular mostraron una degradación más lenta de dichos ácidos grasos.

Es importante analizar por separado el perfil del ácido butírico libre de cada una de las condiciones establecidas, pues éste es una de las características del queso tipo Manchego, además de que la lipasa de *P.caseicolum* tiene mayor especificidad hacia los ácidos grasos de cadena corta en especial el butírico. El contenido de ácido butírico en las cuatro muestras fue similar al inicio de la maduración, sin embargo al finalizar el periodo de maduración (90 días), el queso con lipasa de *Penicillium caseicolum* presentó más del doble de la concentración de dicho ácido que el presente en el queso testigo. El perfil de ácidos grasos a los 30 días de maduración de dicho queso es similar al perfil de ácidos grasos en el testigo a los 90 días de maduración. Este comportamiento fué similar para el queso con lipasa comercial encapsulada mas no para la misma lipasa sin encapsular. Lo anterior nos indica la afinidad de la lipasa comercial por los ácidos grasos de cadena corta y su similitud con la lipasa de *Penicillium caseicolum*. Además, indica que con el uso de los liposomas como medio de adición del extracto enzimático a la leche sugiere, la enzima se pierde menos en el suero y se distribuye homogéneamente dentro de la cuajada, en la que queda en mayor concentración, como lo mencionan diversas fuentes (Skeie, 1994).

Esto parece contradecir a diversos estudios en donde los liposomas se utilizan como matrices de liberación paulatina. Sin embargo el comportamiento de los liposomas dentro del queso es muy complejo, pues desde su incorporación a la leche empieza a

interaccionar con los componentes del mismo, principalmente durante el prensado del mismo.

Del análisis anterior podemos concluir que:

Existe una diferencia entre el utilizar la enzima libre y la enzima encapsulada en la elaboración de quesos en cuanto a el desarrollo de su perfil de ácidos grasos libres en cantidad y calidad.

No existe una diferencia significativa entre el utilizar la lipasa de origen fungal proveniente de *Penicillium caseicolum* y la lipasa comercial de origen gástrico en la elaboración de quesos en cuanto a el desarrollo de su perfil de ácidos grasos libres.

Existe una diferencia entre el utilizar una lipasa, sin importar su origen ó adición, en la elaboración de quesos entre el queso testigo, es decir aquel sin adición de lipasas, en cuanto a la cantidad de ácidos grasos libres generados en el periodo de maduración.

Es importante aclarar que dichas diferencias se mantienen en el tiempo del periodo de maduración, aunque la concentración de los ácidos grasos de cadena larga tiende a disminuir con respecto a la concentración original.

5.8 EVALUACIÓN SENSORIAL

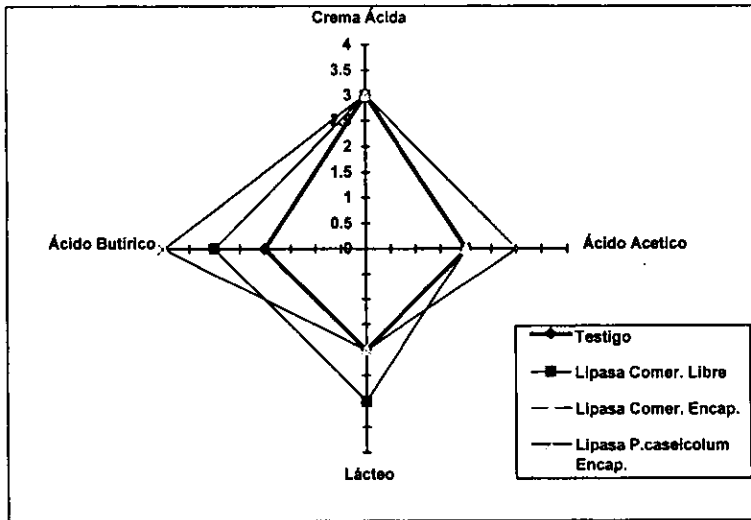
5.8.1 ENTRENAMIENTO DE LOS JUECES

Con el fin de de realizar el perfil de sabor de los quesos elaborados, se realizó el entrenamiento de los jueces sensoriales como se mencionó en la metodología. El objetivo de esta evaluación sensorial, como se mencionó anteriormente es el de analizar el sabor integral de los quesos, así como sus atributos individuales y la relación que guarda con el perfil de ácidos grasos, así como la relación de cada uno de los atributos que guarda el queso testigo contra los demás quesos modificados. Jueces altamente entrenados han logrado identificar hasta 30 diferentes atributos de sabor en quesos elaborados con diferentes tipos de leche y de diversos países. Dichos atributos pueden ser descritos principalmente como de origen lácteo (mantequilla, leche hervida, grasa láctea, dulzor lácteo), ácidos grasos (butírico, pescado fresco, aceite de pescado, jabonoso, ceroso, etc.), fúngico (mohoso, champiñón). Algunos de estos atributos de sabor como butírico o mantequilla son comunes en la mayoría de los quesos (Heisserer, 1993).

En el Anexo I se presenta la hoja de respuestas utilizada por los jueces incluyendo la lista de términos descriptivos así como la intensidad de cada descriptor y amplitud, la cual fue diseñada durante una sesión abierta de entrenamiento. También se incluyen las definiciones de los descriptores finales generados por los jueces para esta prueba.

Se evaluaron los quesos al final de la maduración (90 días), y se analizaron aspectos del sabor, aroma y resabio de todas las condiciones. En lo que se refiere a la evaluación del aroma se puede observar que tanto el queso con la lipasa de laboratorio encapsulada y el queso con la lipasa comercial encapsulada presentan un perfil semejante, difieren solamente en el aroma a ácido acético, siendo éste mayor en el último queso (Figura 6). Estos dos quesos presentan gran diferencia en relación al testigo

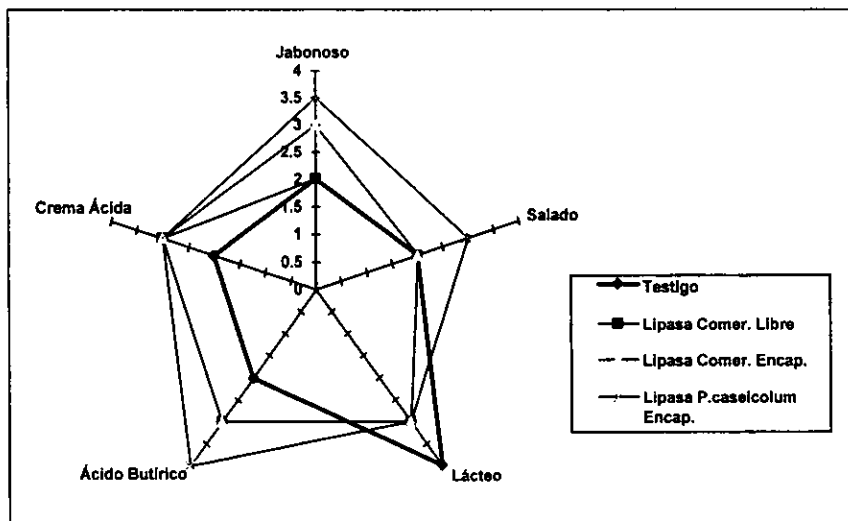
(queso sin lipasa adicionada), principalmente en el aroma de ácido butírico, siendo este calificado como consenso general entre los jueces con más del doble de intensidad que el testigo, mientras que el testigo presentó mayor intensidad en el aroma a lácteo.



Grafica 6.- Perfil de Aroma generado en el análisis sensorial cualitativo.

En cuanto a el sabor, el queso elaborado con lipasa de laboratorio encapsulada es diferente al resto de los quesos, principalmente en la nota a ácido butírico, en donde se percibe con mayor intensidad con respecto a el testigo, y en la nota a jabonoso en donde también se percibe en mayor intensidad que el testigo. La nota a sabor lácteo se percibió por con mayor intensidad en el queso testigo. Por lo tanto el sabor y aroma de los quesos modificados enzimáticamente son diferentes al del queso testigo. Esta aseveración se pudo confirmar al observar los perfiles de sabor lácteo, el cual es un atributo característico de los quesos poco madurados. También en el sabor rancio, nota

característica de los quesos madurados, provocado principalmente por una alta concentración de ácido butírico (Woo et al 1984).



Gráfica 6.- Perfil de Sabor generado en el análisis sensorial cualitativo.

En cuanto a el resabio es interesante observar que los quesos con lipasa adicionada presentaron una nota más amarga que el testigo, lo cual probablemente se deba a una mayor presencia de ácidos grasos libres de cadena larga y mediana al principio de la maduración, como se puede observar en las Gráficas 3 y 4.

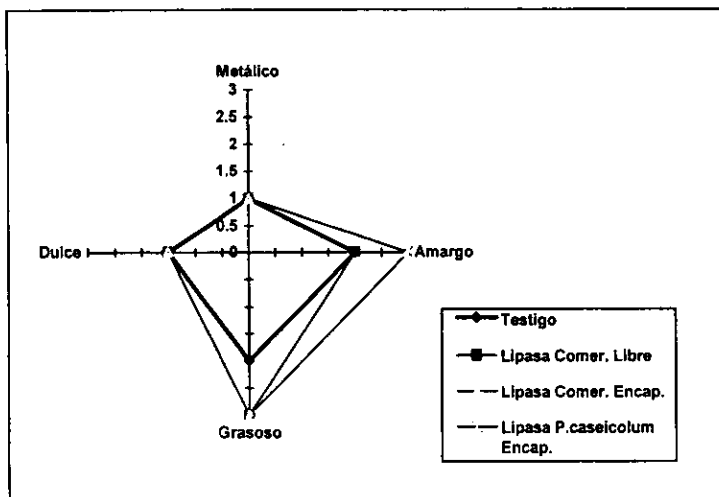
Por lo mencionado anteriormente se puede afirmar que el queso con el extracto enzimático de *P.caseicolum* encapsulado en liposomas se modificó en su perfil de sabor, aroma y resabio en comparación con el queso testigo.

Al comparar el perfil de ácidos grasos libres contra el perfil de sabor y aroma, resulta evidente el papel de éstos en la generación de sabor y aroma, ya que concordaron con los perfiles de sabor y aroma obtenidos.

El queso con extracto enzimático de *P.caseicolum* encapsulado en liposomas presenta en general una mayor intensidad en sus atributos globales de sabor que el resto de los quesos así como mayor porcentaje de ácidos grasos libres. Se observa que a mayor porcentaje de ácido butírico libre se percibe una mayor nota de sabor a ácido butírico, asimismo a mayor porcentaje de ácidos grasos de cadena larga (Palmítico y Óléico principalmente) se percibe con mayor intensidad el sabor a jabonoso, sin embargo en menor intensidad que en el caso del ácido Butírico.

Es interesante mencionar que anteriormente a la evaluación sensorial final de los quesos, estos fueron evaluados en sesiones abiertas durante el entrenamiento de los jueces con el fin de establecer los descriptores. En dichas sesiones la nota jabonosa en los quesos tratados con el extracto enzimático se percibió en mayor intensidad en comparación a la sesión definitiva. Esto se puede atribuir al hecho de que los ácidos grasos libres de cadena larga, los cuales son responsables de la nota jabonosa, están siendo degradados y transformados en otros compuestos, como metil-cetonas, por la flora bacteriana presente.

En cuanto a la intensidad global percibida del aroma se puede observar que existe una diferencia en cuanto al queso con enzima sin encapsular en liposomas y los quesos con enzima en liposomas, y esto se corrobora al comparar dichos perfiles de aroma contra los perfiles de ácidos grasos libres, en donde se observa un mayor porcentaje de estos últimos en los quesos con el extracto enzimático encapsulado. Esto nos indica el beneficio de utilizar a los liposomas como una matriz de retención del extracto enzimático.



Grafica 6.- Perfil de Resabio generado en el análisis sensorial cualitativo

Del análisis anterior podemos concluir que:

En cuanto al perfil sensorial global de los quesos no existe diferencia significativa en los atributos utilizando la lipasa de *Penicillium caseicolum* o la lipasa comercial. Ambos quesos presentaron mayor intensidad en el atributo de ácido butírico. Asimismo existe diferencia entre el queso con enzima libre y el queso con la enzima encapsulada, presentando este último una mayor nota principalmente de ácido butírico. Extrapolando los resultados obtenidos de los perfiles de ácidos grasos, en donde se observa un compartamiento similar.

6-CONCLUSIONES.

- Las condiciones de obtención del extracto enzimático a nivel de reactor fueron adecuadas pues se obtuvo una actividad lipolítica suficiente para lograr la modificación del sabor del queso procesado.
- Se estableció una técnica para observar liposomas en un microscopio electrónico de barrido y se encontró que los liposomas elaborados bajo la técnica de deshidratación-hidratación tienen un rango de tamaño entre 4-8 μm , y que estos presentan fenómenos de fusión entre sí.
- El uso de la lipasa encapsulada en liposomas de *Penicillium caseicolum* con una actividad de 108 UI en un queso tipo Manchego permite obtener un perfil de ácidos grasos a los 30 días de maduración similar al perfil de ácidos grasos en el testigo a los 90 días de maduración.
- La lipasa de *Penicillium caseicolum* empleada presenta especificidad por los ácidos grasos de cadena larga, Mirístico, Palmítico, y Oléico, pero presenta una gran especificidad por el ácido butírico, que es de cadena corta.
- El sabor y aroma obtenidos en los quesos adicionados con extracto lipolítico comercial o de laboratorio encapsulado en liposomas fueron más intensos que los del testigo, principalmente en notas butíricas.
- Los niveles de ácido butírico (como referencia) son mayores a los 90 días cuando la preparación enzimática está encapsulada, lo que se atribuye a mayor retención de enzima en la cuajada

- No existe una diferencia significativa en cuanto al perfil de ácidos grasos libres generados durante la maduración del queso entre el uso de la lipasa comercial de origen animal encapsulada y la lipasa encapsulada obtenida de *Penicillium caseicolum*.

7-RECOMENDACIONES.

Se recomienda realizar:

- a) un estudio del comportamiento estructural de los liposomas durante su adición al queso y su posterior maduración.
- b) un estudio práctico de retención de liposomas en la cuajada durante la elaboración de quesos, así como una evaluación sensorial a todo lo largo del período de maduración.
- c) un análisis de factibilidad económica, incluyéndolos costos preliminares de cada una de las etapas así como la verificación de la relación costo-beneficio de la técnica sugerida.

- No existe una diferencia significativa en cuanto al perfil de ácidos grasos libres generados durante la maduración del queso entre el uso de la lipasa comercial de origen animal encapsulada y la lipasa encapsulada obtenida de *Penicillium caseicolum*.

7-RECOMENDACIONES.

Se recomienda realizar:

- a) un estudio del comportamiento estructural de los liposomas durante su adición al queso y su posterior maduración.
- b) un estudio práctico de retención de liposomas en la cuajada durante la elaboración de quesos, así como una evaluación sensorial a todo lo largo del periodo de maduración.
- c) un análisis de factibilidad económica, incluyéndo costos preliminares de cada una de las etapas así como la verificación de la relación costo-beneficio de la técnica sugerida.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aldhous, P.; **"Genetic message in a bubble tells how cells began"**. NewScientist, No.2005: 18. 25 Nov 1995.

Aldridge, S.; **"Growth Industry"** New Scientist, No. 2108:156. 15 Nov 1997.

Alhir, S, et al.; **"Lipase of Penicillium caseicolum"**. J. Agric. Food Chem. 38: 598-60. 1990.

Alkhalaf, W., et al. ; **"Liposomes as proteinase carriers for the accelerated ripening of Saint-Paulin type cheese."** J. Food Sci. 53 (69): 1674-1679. 1988.

Arbige, *et al.*; **"Novel Lipase for Cheddar Cheese Flavor Development."** Food Technol.,40 (4): 91-98. 1986.

Arbige. *et al.*; **"Lipolytic enzyme derived from an Aspergillus microorganism having an accelerating effect on cheese flavor development."** Patent US 4 726 954 (US4726954)

Arnaud, J.P. ; **"The Pro-Liposome Approach."** Lucas Meyer, Publication No.14. 1993.

Brandsma, R.L.; **"Reduced fat Cheddar cheese from condensed milk."** J. Dairy Sci., 77(4), 897-906. 1994.

Braun S.D.; "Microencapsulation of cell free extracts to demonstrate the feasibility of heterogeneous enzyme systems and cofactor recycling for development of flavor in cheese." J. Dairy Sci., 69(5), 1202-1208, 1986.

Chanj P.S. *et al.*; "Continuous Glycerolysis of Olive Oil by Chromobacterium Viscosum Lipase Immobilized on Liposome in Reversed Micelles." Biotech. & Bioengin, 38 (10) :1159-1165.1991.

Collin, S. *et al.*; "Investigation of volatile flavor compounds in fresh and ripened Domiat cheeses." J. Agric. Food. Chem, 41 (10): 1659-1663. 1993.

Cuervo, R.; "Obtención de enzimas lipolíticas de *Penicillium caseicolum* en fermentación sumergida." Tesis, F.Q UNAM, México D.F, 1995.

Deeth, H.C, Fitz-Gerald C.H y Snow, A.J.; "A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products." New Z.J. Dairy Sci. Tech., 18:13-20, 1983.

De los Ríos, R.; "Sistemas de atrapamiento para enzimas lipolíticas." Tesis F.Q UNAM, México, D.F, 1995.

Dziezak; "Enzyme modification of dairy products." Food Tech., 40 (4) : 114-120.1986.

Egbaria, K.; "Topical applications of liposomal preparations." Cosmetics & Toiletries, 106: 79-93. 1991.

El-Soda, M.; "Recent developments in accelerated cheese ripening", J. Dairy Sci. 74(7), 2317-2335. 1991.

Espinoza, E.; "Mejoramiento de las condiciones de producción de lipasa de *Rhizopus delemar* destinadas a la modificación de un sustrato lácteo." Tesis, U.A.C.P. y P. del C.C.H. U.N.A.M, México D.F. 1990.

Fox, P.F.; "Exogenous enzymes in dairy technology- a review." J. Food. Biochem, 17(3), 173-199, 1993.

Furtado, M., et al.; "Characterization of cheese curd ripened with *Penicillium casicolum* for producing a flavor concentrate." J. Dairy Sci. 67:2850-2855, 1984.

Fenemma, O. R.; "Enzymes.", Food Chemistry, Editorial Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. 2nd Edition, p.p 371-477. 1990.

Fogarty, K.; "Microbial Lipases." Microbial Enzymes and Biotechnology, Elsevier-Applied Science. 2nd Edition, Chapter 7, p.p. 255-274.1990.

Fukumoto, J.; Tsuru, D. y Tamamoto, "Studies on Mold Protease and Purification, Crystallization and some Enzyme Properties of Acid Protease of *Rhizopus chinensis*." Agric. Biol. Chem. 37, 710-717.1967.

García Garibay M., López-Munguía A., Quintero R. ;" Biotecnología Alimentaria." Edit. Limusa, México D.F, pp.186-196. 1993.

Habibi-Najafi MB.; **"Bitterness in cheese: a review."**, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 36, 397-411. 1996.

Haynes, L.C.; **"Microwave browning composition."** United States Patent, Nabisco Brands Inc., US 5 089 278.

Heisserer D.M., Chambers E.; **"Determination of the sensory flavor attributes of aged natural cheese"**, J. Sensory Studies, 8 (2) 121-132. 1993.

Hirotsuka M. *et al.*; **"Calcium Fortification of Soy Milk With Calcium Lecithin Liposome System."** J. of Food Sci., 49 (4):1111-1112. 1984.

Jolly and F.V Kosikowski.; J. Agric. Food Chem., 23 : 1175-1176. 1975

Kirby, C.J. & Gregoradis, G.; **"Dehydration rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes."** Biotechnol., 2:979-984. 1984.

Kirby, C.J., *et al.*; **"Recent developments in cheese flavour technology: application of enzyme microencapsulation."** Dairy Industries Int., 2:19-21. 1987.

Kwak, H.S.; **"Implication of lipase specificity on aged Cheddar flavor development."** J. Dairy Sci., 12 (1), 68-81.1990.

Law, B.A. ; Int. Dairy Fed. Bull., 108 : 40-48. 1978.

Law, B.A. ; **" The Accelerated Ripening of Cheese."**, Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk, London, Elsevier, 207-228.1984.

Law, B.A. ; "Microorganisms and their Enzymes in the Maturation of Cheeses.",
Prog. Ind.Microbiol.,Vol 19: 245-283.1984.

Law B.A.; " Microencapsulated Enzymes for Cheese Technology ." North. Europ.
Food and Dairy J., 53 (6): 194-199. 1987.

Lawrence, M., *et al.* ; Nature, 213:1264.1967.

Leman J.; "Liposomes : Examples of their Application in Food Technology.",
Przemysl-Spozywczy, 48 (6): 168-171.1994.

Lowry, O., *et al.*; " Protein Mesurment with the folin phenol reagent." J. Biol. Chem.
193: 265-275. 1954.

Margalith, P.; "Flavor Microbiology." Charles C. Thomas Publisher. U.S.A., Cap. 3. p.p
32-118. 1981.

Martinez, E.; "Obtención de un producto lácteo modificado con extracto enzimático
de *Penicillium caseicolum*." Tesis Maestria F.Q UNAM, México D.F. 1995.

Matute, P.; "Producción y Evaluación de Sistemas Lipolíticos...", Tesis Universidad
Iberoamericana." 19-20, México, D.F. 1992.

Mayhew, E., *et al.*; "Characterization of liposomes prepared using a
microemulsifier." Biochim. Biophys. Acta. 775:169-174. 1984.

Moskowitz, G. et al. ; "**Enzyme- modified cheese technology.**" J. Dairy sci. 70: 1761-1769.1987.

New, R.R.C. ; "**Liposomes a Practical Approach**", Oxford University Press, New York, USA, pp. 1-32.1990.

NOM-F-307-S-1980. Norma Oficial Mexicana. Método de Gerber para la determinación de grasa en leche. SECOFI.

Ostro M. J.; "**Liposomes.**" Sci. Am. 7: 91-99. 1986

Pedrero, F.D.; Pangborn, R.M.; "**Evaluación sensorial de los alimentos. Métodos analíticos.**" Alhambra, México, D.F. Primera Edición. pp 87-90. 1989.

Pannell, L.K.; "**Methyl ketone production in milk-fat-coated microcapsules.2. Methyl ketones from controlled concentrations of free fatty acids.**", J. Dairy-Sci., 74(7), 2054-2059, 1991.

Picon, A., et al.; "**The effect of liposome encapsulation of chymosin derived by fermentation on Manchego cheese ripening**". J. of Dairy Sci., 77(1): 16-23.1994.

Szoka F., Papahadjopoulos D.; "**Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)**". Ann. Rev. Biophys Bioeng, 9: 467-508.1980.

Skeie, S.; "**Developments in Microencapsulation Science Applicable to Cheese Research and Development. A Review.**" Int. Dairy J., 4 (7): 573-595. 1994.

Vandeweghe, P.; **"Comparison of flavor isolation techniques applied to Cheddar cheese."** J. Agri. Food. Chem., 38(7) 1549-1552.1990.

Woo, A. and Lindsay, R.; **"Rapid method for quantitative analysis of individual free fatty acids in Cheddar cheese."** J. Dairy Sci. 65: 1102-1109.1982.

Woo, A. and Lindsay, R.; **"Concentration of major free fatty acids and flavor development in italian cheese varieties."** J. Dairy Sci. 67: 960-968.1984.

ANEXO 1

DEFINICIONES DE LOS DESCRIPTORES GENERADOS POR LOS JUECES

AROMA

Crema Ácida: Olor a leche agria.

Lácteo: Olor a leche fresca.

Ácido Butírico: Olor a Mantequilla.

Ácido Acético: Olor a Vinagre y que causa pungencia en la nariz.

SABOR

Ácido Butírico: Como Aceite Oxidado

Lácteo: Sabor a Leche Fresca.

Salado: Sensación que se percibe en la parte lateral delantera de la lengua.

Jabonoso: Sabor a Jabón.

Crema Ácida: Sabor a leche agria

RESABIO

Amargo: Sensación que se percibe en la parte central, de atras de la lengua.

Metálico: Sensación astringente que se percibe en toda la boca.

Grasoso: Sensación que se siente como una película o capa de aceite (en buenas condiciones) en la boca, despues de comer algo muy grasoso.

Dulce: Sensación que se percibe en la punta de la lengua.

ANEXO 2

SIMBOLOGÍA PARA IDENTIFICACIÓN DEL GRADO DE INTENSIDAD DE CADA
DESCRIPTOR.

0	No presente
) (Umbral o inicio de identificación
+	Ligero
++	Moderado
+++	Intenso

SIMBOLOGÍA PARA IDENTIFICACIÓN DE LA ESCALA DE RESABIO Y AMPLITUD O
IMPRESION GLOBAL DEL SABOR U AROMA

) (Muy Bajo
1	Bajo
2	Medio
3	Alto

ANEXO 3

HOJA DE RESPUESTAS PARA EL ANALISIS DE PERFIL DE SABOR

Nombre _____ Fecha _____ Juez _____

Queso _____

AROMA: _____ Amplitud _____

Intensidad

Crema Ácida _____

Lácteo _____

Ácido Butírico _____

Ácido Acético _____

Intensidad

SABOR: _____ Amplitud _____

Ácido Butírico _____

Lácteo _____

Salado _____

Jabonoso _____

Crema Ácida _____

Intensidad

RESABIO _____ Amplitud _____

Amargo _____

Metálico _____

Grasoso _____