

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)**
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y EVALUACIÓN SENSORIAL
DE QUESO TIPO PANELA INCORPORADO CON *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺
COMO CULTIVO PROTECTOR

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IQ en A Ma. Dolores Adriana Piña Suárez

Dirigido por:

Dra. Blanca E. García Almendárez

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
México
Noviembre 2012



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Producción de compuestos volátiles y evaluación sensorial de queso tipo
panela incorporado con *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ como cultivo protector**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IQ en A Ma. Dolores Adriana Piña Suárez

Dirigido por:

Dra. Blanca E. García Almendárez

SINODALES

Dra. Blanca E. García Almendárez
Presidente



Firma

Dr. Carlos Regalado González
Secretario



Firma

Dr. Pedro A. Vázquez Landaverde
Vocal



Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente



Firma


Dra. Silvia Amaya Llano
Suplente



Firma



MSP Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química



Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México
Noviembre 2012

RESUMEN

El queso panela es un producto fresco que por su composición puede sostener el desarrollo de microorganismos patógenos o deterioradores. Existe cierta preferencia del consumidor por queso fresco elaborado con leche no pasteurizada, dadas sus características específicas de sabor y aroma. La bioconservación es el uso de bacterias o sus metabolitos como las bacteriocinas, como agentes naturales de conservación de alimentos. La nisina es una bacteriocina con estatus GRAS que es sintetizada por ciertas cepas de *L. lactis*. *L. lactis* UQ2 rif L⁺, es una cepa modificada por conjugación que tiene la habilidad de crecer bien en un medio complejo, como la leche, y que se puede incorporar en una matriz de queso para favorecer la síntesis de compuestos de sabor característicos. En el presente trabajo se elaboró queso panela adicionando la cepa *L. lactis* UQ2 rif L⁺ como medio de bioconservación. Para verificar las propiedades benéficas de la cepa en el producto se utilizó un diseño estadístico 2² donde los factores evaluados fueron el nivel de grasa inicial de la leche y la población inicial de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ en el queso, ambos con dos niveles. Se consideraron como variables respuesta la actividad de nisina, la aceptación del producto por el consumidor y el perfil de compuestos volátiles durante 28 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración. *L. lactis* UQ2 rif L⁺ mostró una máxima población de 9.2 ± 0.1 log UFC/g de queso y una actividad de nisina de 1.53 ± 0.4 mg/kg de queso después de 21 días de almacenamiento para queso con alto nivel de inóculo = 10^7 UFC/mL y 3.5% de grasa. El análisis estadístico mostró que la textura y el sabor obtuvieron mejores ponderaciones para quesos que fueron elaborados con alto nivel de grasa (3.5%). Se identificaron 37 compuestos volátiles, de los cuales 3-metil-1-butanol, hexanal, 3-metil-butanol y 2-metil propanol son compuestos producidos por cepas de *Lactococcus*. Estos resultados sugieren que la adición del cultivo protector favorece la estabilidad microbiológica del queso tipo panela, mejora el sabor y la aceptación sensorial está altamente influida por el contenido de grasa en la leche.

(**Palabras clave:** queso panela, *L. lactis* UQ2 rif L⁺, nisina, evaluación sensorial, compuestos volátiles).



SUMMARY

Panela cheese is a traditional fresh product which can support the development of pathogenic or spoilage microorganisms due to its composition. There is some consumer preference for panela cheese made from unpasteurized milk because of its specific flavor and aroma characteristics. Biopreservation is defined as the use of bacteria or their metabolites such as bacteriocins, as natural agents for food preservation. Nisin is a bacteriocin with GRAS status, which is synthesized by certain strains of *L. lactis*. *L. lactis* UQ2 rif L⁺, is a modified strain that has the ability to grow in a complex medium such as milk and promotes the synthesis of nisin and volatile flavor compounds when incorporated in panela cheese. In this study, panela cheese was added with *L. lactis* UQ2 rif L⁺ as biopreservation method. To verify beneficial properties of the strain a 2² experimental design was conducted, where population of *L. lactis* UQ2 rif L⁺ and the initial level of fat in milk were included as factors. Response variables were nisin activity, consumer acceptance and the volatile compounds profile during a 28 day storage period at refrigeration temperature. *L. lactis* UQ2 rif L⁺ showed a maximum population of 9.2 ± 0.1 log CFU/g of cheese and a nisin activity of 1.53 ± 0.4 mg/kg of cheese after 21 days of storage for cheese with a high level of inoculum = 10^7 CFU/mL and 3.5% of milk fat. Statistical analysis showed that texture and flavor were best rated for cheeses that were made with high fat level (3.5%). 37 volatile compounds were identified, of which 3-methyl-1-butanol, hexanal, 3-methyl-butanol and 2-methyl propanol are compounds produced by *Lactococcus* strains. These results suggest that the addition of protective culture to panela cheese promotes microbiological stability and flavor improvement and sensory acceptance is highly influenced by the fat content in milk.

(Key words: Panela cheese, *L. lactis* UQ2 rif L⁺, nisin, sensory evaluation, volatile compounds).



Dedicatoria

*Uno vuelve siempre a los viejos sitios donde amó la vida
Y entonces comprende como están de ausentes las cosas queridas.*

*Por eso muchacha no partas ahora soñando el regreso,
que el amor es simple y a las cosas simples las devora el tiempo.*

C. Isella

Porque este reto lo empezamos juntas, sé que lo estas terminando a mi lado...

A mi madre... Esther Suárez Rendón[†]

A Dios, gracias... porque me has dado la lección más grande de mi vida, porque he tenido la fortaleza para sobrellevarla y para culminar esta etapa.

A los hombres de mi vida. Gracias papá (Benjamin Piña Perrusquia) porque me has enseñado nobleza, fortaleza y amor de familia, porque por ti vivo y para ti un logro más en nuestras vidas. Eres un hombre ejemplar, sé que la vida nos ha puesto muchas pruebas últimamente, pero sé también que juntos somos muy fuertes... A mis hermanos... Benjamin, gracias por tu seguridad y abrigo, sé que siempre estarás aquí y nos tendremos siempre para apoyarnos. Juan Pa, eres un ejemplo para mí, tu sabiduría me sigue sorprendiendo... El camino es duro, pero si la familia está unida, todo se puede lograr... Estoy terminando ésta meta gracias a ustedes... los amo!

A todos los que han sido un apoyo y a todos aquellos que nos brindaron un abrazo, una palabra de aliento o una oración... familia, amigos... mi agradecimiento más sincero...

A mis amigos...

Pau, eres una personita muy importante y en gran medida has contribuido a éste logro, gracias por compartir conmigo las cosas más importantes de tu vida, hasta por permitirme formar parte en tu familia. Nancy, por tus consejos, que siempre han sido útiles y por todo tu apoyo. A la familia Rodríguez Velázquez, por compartirme de su vida, gracias...

Paco, Carina, Benja, Marc, Wendy, Edith, Areli, Zaira, Eder... chicos que nuestra amistad siga y siga por muchos años más!

A los que formaron parte de ésta etapa, que más que amigos, formamos una pequeña familia y que compartimos tantos momentos divertidos y uno que otro complicado; por que hicimos un gran equipo, nos divertimos y nos apoyamos, estamos terminando una etapa, pero espero que nuestra amistad perdure... Rodrigo, eres un ser de una nobleza incalculable, no es fácil encontrar en la vida personas como tu amiguito... Tere, tu sonrisota siempre alegrando el día por tus consejos y tu dedicación, tengo que aprenderte amiga... Raquelito, en verdad siempre creí que eras la más sensata de todos, me siento muy orgullosa de ser parte de tu vida y tener tu amistad... Martha, una etapa más que comparto contigo, siempre con peculiar alegría, gracias otra vez... Flor, gracias por tu cariño y sensibilidad... y Victor, gracias por tus detalles, tus consejos y todos los buenos momentos.

Los quiero mucho!

Agradecimientos

A la Dra. Blanca E. García y al Dr. Carlos Regalado, por brindarme su apoyo y confianza, por ser un ejemplo de perseverancia y dedicación y por compartir conmigo su amplia experiencia profesional a través de éstos años.

A la institución que me ha formado, la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Química.

Al Dr. Pedro Vázquez, por sus valiosas aportaciones en la presente investigación y a CICATA, Qro., por las facilidades otorgadas para llevar a cabo experimentos de éste trabajo.

A la Dra. Silvia Amaya y al Dr. Eduardo Castaño por sus observaciones y aportaciones al presente trabajo.

A CONACYT por la beca otorgada.

A todos los que colaboraron en la parte técnica de éste proyecto, en la elaboración de queso y en otras fases del trabajo experimental, especialmente a Diana Abarca, muchas gracias por todo tu apoyo.

INDICE

Contenido	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Productos lácteos	3
2.2 Bacterias ácido lácticas	4
2.2.1 <i>Lactococcus lactis</i> UQ2	5
2.2.2 Conjugación bacteriana	5
2.3 Efecto protector de las BAL	6
2.4 Queso	7
2.5 Bioconservación	8
2.6 Bacteriocinas	9
2.6.1 Nisina	10
2.6.2 Síntesis y modo de acción	11
2.6.3 Usos de la nisina en productos lácteos	12
2.7 Proteólisis en queso	13
2.8 Formación de compuestos de sabor y aroma	15
2.9 Análisis sensorial y técnicas de detección	19
2.9.1 Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (SPME)	21
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23

V. HIPÓTESIS	24
VI. METODOLOGÍA	25
6.1 Materiales	25
6.1.1 Cepas Microbianas	25
6.1.2 Enzima coagulante	25
6.1.3 Antimicrobianos	25
6.1.4 Soluciones y medios de cultivo	25
6.1.4.1 Agua peptonada 0.1%	25
6.1.4.2 Agar lactosa purpura de bromocresol (PBC)	25
6.1.4.3 Agar Assay	25
6.1.4.4 Solución Ringer	26
6.1.4.5 Agar métodos estándar	26
6.1.4.6 Agar papa dextrosa	26
6.1.4.7 Estándar 2-metilpirazina	26
6.2 Diseño experimental	26
6.3 Métodos	27
6.3.1 Activación de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ para su incorporación como inóculo en queso panela	27
6.3.2 Incorporación de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ en la elaboración de queso panela como cultivo protector	28
6.3.3 Determinación de la actividad de nisina	29
6.3.3.1 Activación de <i>Micrococcus luteus</i>	29
6.3.3.2 Curva estándar de actividad de nisina	30
6.3.3.3 Tratamiento de la muestras	30
6.3.3.4 Método de difusión en agar	31
6.3.4 Determinación de la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ en queso	31
6.3.5 Análisis microbiológico	32
6.3.5.1 Determinación de la cuenta bacteriana total	32
6.3.5.2 Conteo de Hongos y Levaduras	32
6.3.6 Evaluación sensorial	32

6.3.7	Análisis de compuestos volátiles	33
6.3.7.1	Preparación de la muestra	33
6.3.7.2	Extracción e identificación de compuestos volátiles	33
6.3.8	Análisis fisicoquímico	34
6.3.8.1	Determinación de Acidez	34
6.3.8.1.1	Determinación de acidez titulable en leche	34
6.3.8.1.2	Determinación de acidez titulable en queso	34
6.3.8.2	Determinación de proteína	35
6.3.8.3	Determinación de grasa	36
6.3.8.3.1	Determinación de grasa en leche	36
6.3.8.3.2	Determinación de grasa en queso	36
6.3.9	Determinación del perfil de proteolisis	36
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1	Cinética de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> UQ2 rif L ⁺ durante su activación en leche suplementada	39
7.2	Efecto del tiempo de preincubación	40
7.3	Pruebas de la leche utilizada como materia prima	42
7.4	Población de <i>Lactococcus lactis</i> UQ2 rif L ⁺	45
7.5	Determinación de la actividad de nisina	48
7.6	Parámetros microbiológicos	51
7.7	Acidez	54
7.8	Contenido de proteína y grasa	56
7.9	Evaluación sensorial	57
7.10	Determinación de compuestos volátiles	63
7.11	Determinación del perfil proteolítico	72
VIII.	CONCLUSIONES	77
IX.	LITERATURA CITADA	80
X.	ANEXOS	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Diseño experimental para la elaboración de queso tipo panela	26
2. Diseño experimental aleatorizado para la elaboración de queso tipo panela	27
3. Preparación de las mezclas de gel separador y gel concentrador en electroforesis desnaturizante Tris-glicina	37
4. Preparación de las mezclas de gel separador y gel concentrador en electroforesis desnaturizante Tris-trisina	37
5. Acidez, contenido de grasa y prueba de antibiótico de la leche utilizada como materia prima en la elaboración de queso tipo panela en cada uno de los tratamientos del diseño experimental y su réplica.	43
6. Cuenta de hongos y levaduras y cuenta microbiana total de la leche utilizada como materia prima en la elaboración de queso tipo panela en cada uno de los tratamientos del diseño experimental y su réplica.	44
7. Actividad de nisina y población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ en leche suplementada (3 ^a activación) que se utilizó como inóculo en queso tipo panela para cada tratamiento y su réplica.	44
8. Análisis estadístico ANOVA para la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ a los 0 días de almacenamiento a 4°C	46
9. Análisis estadístico ANOVA para la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ a los 7 días de almacenamiento a 4°C	47
10. Análisis estadístico ANOVA para la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ a los 14 días de almacenamiento a 4°C	48
11. Análisis estadístico ANOVA para la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ a los 21 días de almacenamiento a 4°C	48

12.	Análisis estadístico ANOVA para la actividad de nisina a los 0 días de almacenamiento a 4°C	50
13.	Análisis estadístico ANOVA para la actividad de nisina a los 7 días de almacenamiento a 4°C	50
14.	Análisis estadístico ANOVA para la actividad de nisina a los 14 días de almacenamiento a 4°C	50
15.	Análisis estadístico ANOVA para la actividad de nisina a los 21 días de almacenamiento a 4°C	50
16.	Análisis estadístico ANOVA para la cuenta bacteriana total a los 0 días de almacenamiento a 4°C	52
17.	Análisis estadístico ANOVA para la cuenta bacteriana total a los 7 días de almacenamiento a 4°C	53
18.	Análisis estadístico ANOVA para la cuenta bacteriana total a los 14 días de almacenamiento a 4°C	53
19.	Análisis estadístico ANOVA para la cuenta bacteriana total a los 21 días de almacenamiento a 4°C	53
20.	Cuenta de hongos y levaduras para los quesos almacenados a 4°C a través del tiempo	53
21.	Análisis estadístico ANOVA para la acidez a los 0 días de almacenamiento a 4°C	55
22.	Análisis estadístico ANOVA para la acidez a los 7 días de almacenamiento a 4°C	55
23.	Análisis estadístico ANOVA para la acidez a los 14 días de almacenamiento a 4°C	55
24.	Análisis estadístico ANOVA para la acidez a los 21 días de almacenamiento a 4°C	56
25.	Contenido de proteína y grasa en cada tratamiento	57
26.	Análisis estadístico ANOVA para el atributo sabor a los 7 días de almacenamiento a 4°C	59
27.	Análisis estadístico ANOVA para el atributo sabor a los 14 días de almacenamiento a 4°C	59

28.	Análisis estadístico ANOVA para el atributo sabor a los 21 días de almacenamiento a 4°C	60
29.	Análisis estadístico ANOVA para el atributo textura a los 7 días de almacenamiento a 4°C	62
30.	Análisis estadístico ANOVA para el atributo textura a los 14 días de almacenamiento a 4°C	62
31.	Análisis estadístico ANOVA para el atributo textura a los 21 días de almacenamiento a 4°C	62
32.	Compuestos volátiles identificados en el queso, no. de CAS y sus notas de aroma correspondientes	63
32.	Compuestos volátiles identificados en el queso, no. de CAS y sus notas de aroma correspondientes (Continuación).	64
33.	Población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ para los quesos inoculados de los diferentes tratamientos del diseño experimental	86
34.	Actividad de nisina para los quesos inoculados de los diferentes tratamientos del diseño experimental	86
35.	Cuenta bacteriana total para los quesos de los diferentes tratamientos del diseño experimental	86
36.	Acidez de los quesos de los diferentes tratamientos del diseño experimental	86
37.	Mediana de las calificaciones para el atributo sabor en los quesos de los diferentes tratamientos del diseño experimental	87
38.	Mediana de las calificaciones para el atributo textura en los quesos de los diferentes tratamientos del diseño experimental	87
39.	Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 0 (ppb).	88
40.	Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 7 (ppb).	92
41.	Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 14 (ppb).	96

42. Concentración de los 37 compuestos volátiles en los 100
diferentes tratamientos al día 21(ppb).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la nisina (Chatterjee <i>et. al.</i> , 2005)	11
2. Patrón de electroforesis que se obtiene con las proteínas lácteas procedentes de la especie bovina (carril 2). El carril 1 muestra las proteínas de referencia para los pesos moleculares y la flecha indica el sentido de migración de las proteínas.	14
3. Rutas metabólicas de las fermentaciones de la lactosa y el citrato (Badui, 2006).	20
4. Diagrama de la elaboración de queso panela adicionado del cultivo protector.	28
5. Hoja de encuesta de la evaluación sensorial con consumidores.	32
6. Activaciones de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ para realizar la curva de desarrollo en leche pasteurizada suplementada.	39
7. Curva de desarrollo de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ durante la tercera activación en leche pasteurizada suplementada.	40
8. Cinética de desarrollo de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ en queso tipo panela evaluado con y sin tiempo de preincubación.	41
9. Comportamiento de la acidez en queso tipo panela evaluado con y sin tiempo de preincubación.	42
10. Comportamiento de la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ en quesos inoculados almacenados a 4°C a través del tiempo.	46
11. Gráfico de interacción para la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ a los 0 días de almacenamiento a 4°C	47
12. Gráfico de interacción para la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ a los 7 días de almacenamiento a 4°C	47
13. Comportamiento de la actividad de nisina en quesos inoculados almacenados a 4°C a través del tiempo.	49

14. Cuenta bacteriana total en quesos almacenados a 4°C a través del tiempo.	52
15. Acidez titulable en quesos almacenados a 4°C a través del tiempo.	54
16. Calificaciones para el atributo sabor en los quesos almacenados a 4°C	58
17. Gráfico de interacción para el atributo sabor a los 7 días de almacenamiento a 4°C	59
18. Gráfico de interacción para el atributo sabor a los 14 días de almacenamiento a 4°C	60
19. Gráfico de interacción para el atributo sabor a los 21 días de almacenamiento a 4°C	60
20. Calificaciones para el atributo textura en los quesos almacenados a 4°C a través del tiempo.	61
21. Análisis de componentes principales (APC), tendencia de los 37 compuestos identificados al día 0 para los diferentes tratamientos (donde A y B corresponden a la identificación de la réplica de los tratamientos).	68
22. Análisis de componentes principales (APC), tendencia de los 37 compuestos identificados al día 7 para los diferentes tratamientos (donde A y B corresponden a la identificación de la réplica de los tratamientos).	69
23. Análisis de componentes principales (APC), tendencia de los 37 compuestos identificados al día 14 para los diferentes tratamientos (donde A y B corresponden a la identificación de la réplica de los tratamientos).	71
24. Análisis de componentes principales (APC), tendencia de los 37 compuestos identificados al día 21 para los diferentes tratamientos (donde A y B corresponden a la identificación de la réplica de los tratamientos).	72

25. Gel de electroforesis Tris-glicina para muestras de queso tipo panela. 1. Tratamiento 2, día 0 (sin inóculo, 3.5% grasa) 2. Tratamiento 2, día 21 (sin inóculo, 3.5% grasa). 3. Tratamiento 5, día 0 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 1 % grasa). 4. Tratamiento 5, día 21 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 1 % grasa). 5. Tratamiento 6, día 0 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 3.5 % grasa). 6. Tratamiento 6, día 21 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 3.5 % grasa). 7. Marcador de bajo peso molecular (GE) 74
26. Electroforesis en gel Tris-trisina para las muestras de queso tipo panela. 1= Tratamiento 1 (sin inóculo, 1.0 % grasa), día 0; 2= Tratamiento 1 (sin inóculo, 1.0% grasa), día 21; 3 = Tratamiento 2 (sin inóculo, 3.5% grasa), día 0; 4= Tratamiento 2 (sin inóculo, 3.5% grasa), día 21; 5= Tratamiento 5 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 1 % grasa), día 0; 6= Tratamiento 5 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 1 % grasa), día 21; 7= Tratamiento 6 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 3.5 % grasa), día 0; 8= Tratamiento 6 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 3.5 % grasa), día 21; 9=Marcador de PM (Biorad). 76
27. Curva estándar de actividad de nisina 85

I. INTRODUCCIÓN

El queso fresco es un producto de alta demanda, en nuestro país el más consumido es el queso panela, cuyo atributo más importante evaluado por el consumidor es su sabor y aroma.

Además de las características sensoriales, los consumidores demandan productos seguros, libres de aditivos químicos, es por ello que hay un creciente interés por el uso de conservadores de origen natural. Los productos lácteos tienen sabores característicos que han sido asociados a la actividad metabólica de la flora nativa de la leche.

Las características sensoriales de los productos lácteos se modifican por el proceso de pasteurización, ya que el proceso térmico afecta compuestos de sabor además de reducir considerablemente la flora nativa. El incorporar cultivos protectores del mismo origen lácteo, puede favorecer la síntesis de nuevos compuestos de sabor que asemejen perfiles sensoriales de productos no pasteurizados.

La bioconservación es una alternativa de conservación de alimentos frescos, implica una serie de métodos en los cuales se usan bacterias y/o sus metabolitos como medio de protección de la inocuidad de diversos alimentos. Las bacterias más utilizadas e investigadas recientemente son aquellas que pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), que se caracterizan por fermentar azúcares hasta transformarlos en ácido láctico y otros metabolitos. Resulta de interés la habilidad de estas bacterias en la síntesis de bacteriocinas, que son polipéptidos de bajo peso molecular capaces de inhibir el desarrollo de diversos microorganismos patógenos o deterioradores de alimentos.

Lactococcus lactis es una bacteria ácido láctica ampliamente utilizada en la fermentación de productos lácteos, es capaz de fermentar la lactosa con producción de ácido láctico, pero además tiene la habilidad de sintetizar nisina, una bacteriocina de amplio uso en la industria de alimentos lácteos.

En el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química se aisló una cepa de *Lactococcus lactis*, identificada como *L. lactis* UQ2, esta cepa fue posteriormente modificada por conjugación para favorecer su desarrollo en leche, la cepa resultante *L. Lactis* UQ2 rif L⁺ muestra un buen crecimiento en leche, y sintetiza la bacteriocina genéticamente identificada como nisina A.

En el presente trabajo, la cepa modificada *L. lactis* UQ2 rif L⁺ se incorporó como cultivo bioprotector en queso panela y se evaluó su habilidad para sintetizar la nisina en este medio complejo a través del tiempo como medio de bioconservación, así como su efecto en el perfil sensorial del producto mediante evaluaciones sensoriales con consumidores y mediante técnicas instrumentales de extracción de compuestos volátiles.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Productos lácteos

Actualmente, la demanda del consumidor se enfoca en productos naturales, con apariencia y sabor fresco, fácil de consumir y seguros. Los compuestos antimicrobianos naturales han sido explotados por años dado su efecto contra microorganismos deterioradores y patógenos (Sobrino-López *et al.*, 2008).

La producción de alimentos fermentados está basada en el uso de cultivos iniciadores principalmente bacterias ácido lácticas (BAL) que inician una rápida fermentación del material crudo (Leroy y De Vuyst, 2004).

Los productos lácteos fermentados producidos con bacterias ácido lácticas (BAL) forman parte importante de nuestra dieta (van Hylckama Vlieg y Hungenholtz, 2007). En 2005 se estimó que el consumo anual global de productos lácteos fermentados es mayor a 17.8 millones de toneladas (IDF, 2005).

En la manufactura de productos lácteos fermentados, las bacterias ácido lácticas han sido tradicionalmente seleccionadas por su capacidad de acidificar la leche y producir compuestos de aroma (Grattepanche *et al.*, 2007). En la microflora natural presente en productos lácteos fermentados se han podido encontrar algunas cepas con la habilidad de producir nuevos compuestos de aroma, diferentes a los producidos por cultivos iniciadores comerciales. De hecho, algunas características de sabor solo se llegan a observar en productos lácteos artesanales y se detectan en muy bajas cantidades en quesos procesados industrialmente (Centeno *et al.*, 2002). En los productos lácteos, la lactosa, citratos, grasa y proteínas de la leche son convertidos en un amplio rango de compuestos volátiles y no-volátiles de sabor y aroma (van Hylckama Vlieg y Hungenholtz, 2007).

Además de la calidad, hay un incremento en la demanda del consumidor por una mayor diversidad en el sabor de quesos y otros productos fermentados. La manufactura de nuevos productos requiere el uso de cepas con características nuevas y excepcionales (Centeno *et al.*, 2002).

2.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo que comparten características comunes. Deben su asignación a su capacidad de fermentar azúcares mediante un metabolismo homo o heterofermentativo. Se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, catalasa negativas, y facultativas anaerobias (Settanni y Moschetti, 2010).

El grupo de las BAL ocupan un rol central en las fermentaciones alimentarias. Causan rápida acidificación del material mediante la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Además de la producción de ácido láctico generan ácido acético, etanol, compuestos de aroma y sabor, bacteriocinas, exopolisacáridos y diferentes enzimas de importancia. Esto contribuye a alargar la vida de anaquel y a mejorar la seguridad microbiológica (Leroy y De Vuyst, 2004). La transformación química de los componentes en el alimento fermentable y la liberación de metabolitos microbianos contribuyen al sabor, aroma y textura y al perfil sensorial del producto final (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007).

El uso de BAL como cultivos adjuntos juega un papel muy importante en la formación de compuestos de sabor dado que tienen una alta capacidad biosintética y producen interesantes compuestos de aroma (Leroy y De Vuyst, 2004).

La principal función de las BAL en la elaboración de productos lácteos fermentados es la descomposición de la lactosa a ácido láctico, generación de sabor, y en el caso del queso, la modificación de la textura (Morales *et al.*, 2003).

La adición de BAL como cultivos adjuntos en la manufactura de queso incrementa el nivel de aminoácidos libres, péptidos, y ácidos grasos libres,

asociados a la intensidad de sabor y compuestos de aroma (Leroy y De Vuyst, 2004).

Existen reportes del aislamiento de BAL de diferentes quesos artesanales con el objetivo de seleccionar cepas específicas para la elaboración de queso industrializado de leche pasteurizada para garantizar un sabor semejante al del queso artesanal elaborado con leche cruda (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008).

2.2.1 *Lactococcus lactis* UQ2

Lactococcus lactis es una bacteria ácido láctica Gram-positiva, mesófila, que fermenta la lactosa con producción de ácido láctico. Es ampliamente utilizada en fermentaciones alimentarias, como en la producción de queso y mantequilla, pero en los últimos años se ha estudiado la fisiología y genética de esta bacteria debido a que se han encontrado diversas aplicaciones de los metabolitos que produce (Mireau *et al.*, 2005).

Las cepas de *L. lactis* son las principales BAL que constituyen los cultivos iniciadores utilizados en la industria láctea para la manufactura y maduración de quesos y otros productos lácteos fermentados (Alegría *et al.*, 2010).

Lactococcus lactis UQ2, es una cepa aislada de un queso mexicano, productora de la bacteriocina genéticamente identificada como Nisina A (García-Almendárez *et al.*, 2008).

2.2.2 Conjugación bacteriana

Los niveles máximos de nisina en un medio de cultivo (aprox. 3800 UI/mL) están limitados por la sensibilidad de las cepas productoras y por el nivel de expresión de los genes que codifican las enzimas modificadoras (García-Parra *et al.*, 2009). La obtención de mutantes más resistentes o la introducción en un plásmido de los genes implicados en la inmunidad, aumentan la cantidad de nisina producida con respecto a las cepas parentales (Kim *et al.*, 1998).

La diseminación de la información genética por transferencia horizontal de genes en bacterias va acompañada de una gran variedad de mecanismos naturales (Frost, 1992).

La conjugación bacteriana es el mecanismo más utilizado en microorganismos y, por lo tanto, el que más contribuye a la evolución y supervivencia de especies bacterianas. Es el único aceptado para mejoramiento genético en bacterias utilizadas en la industria de los alimentos en la Unión Europea (de la Cruz y Davies, 2000). La conjugación es una técnica natural que ha sido aceptada para producir cepas genéticamente mejoradas a fin de ser utilizadas en la industria alimentaria. Organismos genéticamente mejorados por la conjugación son autorizados con mayor facilidad para su aplicación comercial respecto a aquellos que contienen moléculas de DNA recombinante (Fallico *et al.*, 2009).

La cepa *Lc. lactis* NCDO 712 cuenta con el plásmido pLP712 (peso molecular: 33MDa, tamaño: 56.5 kpb) el cual codifica genes que proporcionan la habilidad de utilizar las proteínas de la leche, así como de llevar a cabo el catabolismo de la lactosa. Cuenta con un sistema de alta frecuencia de conjugación para transmitir el plásmido pLP712, 0.6 % por colonia de acuerdo a Gasson (1983), éste ha sido transmitido mediante conjugación a cepas de *Lc. lactis* incapaces de fermentar la lactosa ni de utilizar la proteína en fermentaciones en leche. Este plásmido fue transferido por conjugación a la cepa nativa *L. lactis* UQ2 y al cepa modificada se denominó *L. lactis* UQ2 rif L⁺ (García-Parra *et al.*, 2009).

2.3 Efecto protector de las BAL

Se considera cultivos protectores a los microorganismos que confieren factores de seguridad adicionales que resultan en la estabilidad microbiológica del alimento, reduciendo el riesgo de desarrollo de microorganismos patógenos o deterioradores. El desarrollo de BAL por sí mismas determina la inhibición de microorganismos indeseables, sin embargo, su habilidad de producir bacteriocinas es de importancia básica en las estrategias de conservación biológica de alimentos (Settanni y Moschetti, 2010).

Actualmente, el desarrollo de nuevos productos está enfocado al uso de diferentes componentes que brinden atributos de sabor o algún beneficio a la salud. En muchos casos se requiere del desarrollo de cultivos iniciadores especiales que desarrollen sabores específicos o compuestos saludables en el producto seleccionado (van Hylckama Vlieg y Hungenholtz, 2007).

La incorporación de bacterias productoras de bacteriocinas en la manufactura de alimentos fermentados provee una económica y atractiva alternativa a la adición de bacteriocinas purificadas (Alegría *et al.*, 2010).

2.4 Queso

Se define al queso como un producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin la adición de crema, obtenida por coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos por su proceso pueden ser; fresco, madurado o procesado. Los quesos frescos son aquellos que se caracterizan por ser productos con alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no agregarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración (NOM-121-SSA1-1994).

El queso fresco generalmente se elabora con una mezcla de bacterias ácido lácticas que contienen cepas de *Lactococcus lactis*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *L. lactis* spp. *lactis* o *Leuconostoc mesenteroides* para el aroma ácido o la textura. La acidificación de la leche por el cultivo iniciador es un paso determinante en el queso fresco (Grattepanche *et al.*, 2007).

La calidad del queso está determinada por su sabor, aroma, propiedades reológicas y su apariencia visual (Garde *et al.*, 2007). El sabor es el más

importante parámetro para el consumidor de aceptación y comercialización (Carunchia *et al.*, 2005).

Algunas cepas de *L. lactis* productoras de bacteriocinas han sido evaluadas en la manufactura de diferentes variedades de queso. Seguido de su adición el microorganismo comienza su actividad peptidolítica y de transaminación, que son factores clave en la formación de compuestos de aroma y sabor (Alegría *et al.*, 2010).

En una amplia variedad de quesos, las bacterias ácido lácticas contribuyen al sabor mediante la acción de las células vivas y, cuando ocurre lisis, mediante la liberación de material intracelular que incluye enzimas como peptidasas y enzimas catalíticas a la matriz del queso (Garde *et al.*, 2007).

2.5 Bioconservación

Entre las alternativas de las tecnologías de conservación de alimentos, se ha puesto particular atención a la bioconservación para extender la vida de anaquel y para mejorar la calidad microbiológica, minimizando el impacto en las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos (García *et al.*, 2010).

La bioconservación se refiere a la extensión de la vida de anaquel y el mejoramiento de la seguridad alimentaria usando microorganismos y/o sus metabolitos (Settanni y Moschetti, 2010). La bioconservación explota racionalmente el potencial antimicrobiano de los microorganismos naturalmente presentes en el alimentos y/o sus metabolitos con un largo historial de uso seguro (García *et al.*, 2010).

El interés en la bioconservación de alimentos requiere el desarrollo de compuestos antimicrobianos naturales de diferentes orígenes (García *et al.*, 2010). En este sentido, la producción de bacteriocinas juega el papel más importante (Settanni y Moschetti, 2010). Fundamentalmente, el éxito de cualquier estrategia de bioconservación basada en bacteriocinas depende de su eficiencia antimicrobiana *in situ* (Settanni y Corsetti, 2008). Esta característica tiene

consecuencias sustanciales en la eficacia de las BAL utilizadas como cultivos protectores (Settanni y Moschetti, 2010).

Nuevas técnicas de detección se han adaptado a la industria láctea, las cuales permiten la explotación de la biodiversidad natural de los cultivos iniciadores (van Hylckama Vlieg y Hungenholtz, 2007).

La actividad antimicrobiana generada por las BAL ayuda a controlar la flora microbiana presente en el alimento. Las BAL producen diferentes sustancias antimicrobianas incluidos ácidos orgánicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol y bacteriocinas. La producción de bacteriocinas por BAL se puede aplicar en la conservación de alimentos debido a sus ventajas tecnológicas. La producción *in situ* de bacteriocinas incrementa la competitividad de la cepa productora en la matriz del alimento y contribuye a la prevención del deterioro (Leroy y De Vuyst, 2004).

Algunos estudios han demostrado que el uso de BAL como cultivos iniciadores permite la producción de bacteriocinas en la matriz del alimento y consecuentemente genera actividad inhibidora en contra de microorganismos sensibles deterioradores y patógenos (Leroy y De Vuyst, 2004).

2.6 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos o proteínas sintetizados ribosomalmente por las bacterias con actividad antimicrobiana. Fueron inicialmente descritas en *Escherichia coli* como colicinas (García *et al.*, 2010).

Así como los péptidos que se sintetizan ribosomalmente, las bacteriocinas son codificadas por un plásmido o un cromosoma de un gen estructural que está agrupados en genes codificantes de proteínas que le confieren inmunidad al microorganismo productor (García *et al.*, 2010).

Las BAL han sido tradicionalmente asociadas con alimentos y se consideran seguras, la conservación de alimentos se ha enfocado principalmente en las

bacteriocinas producidas por las BAL ya que se pueden utilizar en alimentos como agentes de conservación, por considerarse de origen natural, como una alternativa al uso de aditivos químicos (García *et al.*, 2010).

Las bacteriocinas derivadas de BAL tienen el estatus GRAS (Generalmente reconocido como seguro) y son atractivas para la industria de alimentos debido a su actividad contra bacterias Gram-positivas involucradas en enfermedades transmitidas por alimentos como *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus* (Sobrino-López *et al.*, 2008).

Estos compuestos pueden ser utilizados de tres formas; como aditivos antimicrobianos purificados o semipurificados, como ingredientes en alimentos fermentados o mediante la incorporación del microorganismo productor como cultivo iniciador (Sobrino-López *et al.*, 2008).

2.6.1 Nisina

La primera bacteriocina aislada de *L. lactis* fue la nisina, un lantibiótico compuesto de 34 aminoácidos, tiene una masa molar de 3.4 kDa (Figura 1). Actualmente está aprobada y utilizada en cerca de cincuenta países como aditivo alimentario. A la fecha, se ha identificado cinco variantes naturales de la nisina; A, Z, Q, U y F (Alegría *et al.*, 2010).

La nisina es un péptido antimicrobiano que muestra actividad antibacteriana contra deterioradores y patógenos de alimentos principalmente bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. (Pongtharangkul y Demirici, 2006), es sintetizada por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* durante la fase exponencial de crecimiento, por lo que se considera un metabolito primario (de Arauz *et al.*, 2008).

Esta bacteriocina es comercialmente usada como un agente natural de bioconservación de alimentos y es considerada segura por la FDA (Food and Drug Administration) y recibió la designación GRAS en 1988, dado que es no tóxica y

sus aminoácidos constituyentes se metabolizan junto con los procedentes de otras proteínas (García-Parra *et al.*, 2009).

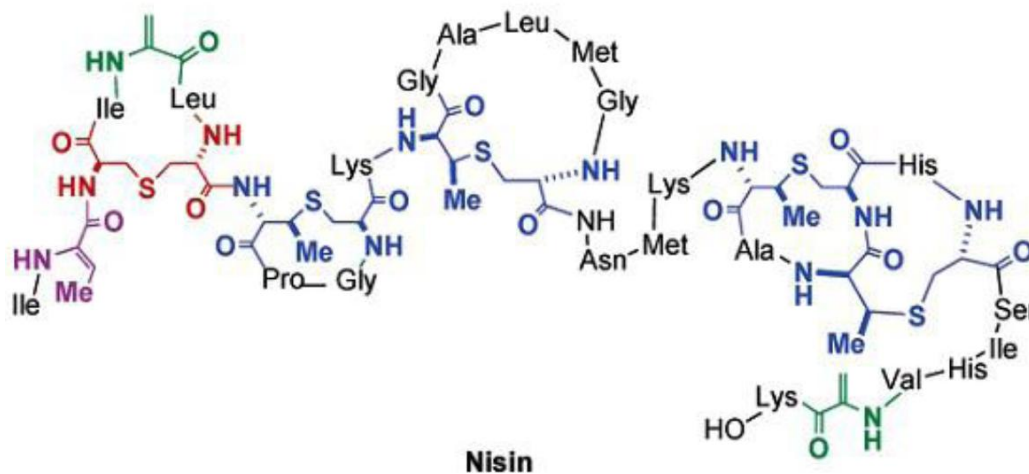


Figura 1. Estructura de la nisina (Chatterjee *et al.*, 2005).

2.6.2 Síntesis y modo de acción

La producción de nisina por *Lactococcus lactis* spp. *lactis* está regulada por el mecanismo de percepción en quórum (*Quorum sensing*) a nivel transcripcional en el que la nisina actúa como una molécula inductora (Pongtharangkul y Demirci, 2006). En bacterias Gram-positivas, este proceso involucra moléculas específicas que actúan como señales para la inducción de la expresión de genes sólo cuando una cierta concentración de estas moléculas es alcanzada en el medio ambiente en el cual se encuentran; e implica una comunicación célula a célula (García-Parra *et al.*, 2009). Toda la maquinaria biosintética para la producción de nisina se encuentra localizada en un transposón de 70 kb que también contiene los determinantes de la utilización de sacarosa (Horn *et al.*, 1991).

Se ha demostrado que en bacterias Gram-positivas la nisina actúa a nivel de la membrana perturbando la movilidad iónica, inhibiendo la captación de aminoácidos y causando liberación de aminoácidos acumulados (Gujarathi *et al.*, 2008). La acumulación de nisina en la monocapa externa de lípidos de la membrana, conduce a la agregación de nisina en monómeros, seguido de la

formación de estructuras porosas de corta duración. La relajación de dichas estructuras permite la traslocación de los péptidos a través de la bicapa lipídica (Breukink y de Kruijff, 2006).

Otro mecanismo de más eficiente depende del enlazamiento del precursor del peptidoglucano, el Lípido II, y la consecuente formación de poros. El lípido II y la nisina forman un poro híbrido, compuesto de ocho moléculas de nisina y cuatro moléculas de lípido II lo cual causa pérdida de pequeños componentes citoplasmáticos como aminoácidos y ATP. Además, se colapsa el gradiente de iones, lo cual causa un desbalance del gradiente de pH y de la fuerza protón motriz (Lubelski *et al.*, 2007).

2.6.3 Usos de la nisina en productos lácteos

La incorporación de cepas productoras de bacteriocinas con cultivos adjuntos en la manufactura de alimentos provee una atractiva y económica alternativa a la adición de bacteriocinas purificadas, ya que los metabolitos producidos durante una fermentación no se consideran como aditivos (Alegría *et al.*, 2010).

La nisina es producida por cepas de *Lactococos* que se encuentran de modo natural en la leche y, por lo tanto ha sido consumida por el hombre inadvertidamente, lo cual es un indicativo de la inocuidad de esta sustancia. Estudios toxicológicos han calculado una DL₅₀ de 7 g/kg, similar al de la sal común (Delves-Broughton *et al.*, 1998).

La nisina se usa comercialmente en una forma parcialmente purificada, en forma de ingrediente cultivando la cepa productora en diversos medios de cultivos, o bien el uso de la cepa productora como cultivo en alimentos fermentados (Leroy y De Vuyst, 2004). Ha sido aprobada y es utilizada en más de 50 países como aditivo alimentario. A la fecha, se han identificado 5 variantes naturales de nisina, A, Z, Q, U y F (Alegría *et al.*, 2010).

Los posibles usos de bacteriocinas como la nisina están en estudio para una amplia variedad de productos alimenticios, ya que por su origen lácteo también

sugiere la posibilidad de mejorar y aumentar las características de los productos lácteos de los que han sido aislados (Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008).

La nisina ha demostrado ser un agente efectivo en el control microbiano de numerosos productos lácteos y su uso ha sido ampliamente ensayado en la manufactura de queso a bajo pH. El uso de bacterias productoras y resistentes a nisina como cultivos iniciadores parece ser un medio viable de incorporar y mantener la actividad de esta bacteriocina, a través del proceso de fabricación de queso y para controlar deterioradores y patógenos transmitidos por los alimentos (Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008).

Ochoa (2011), realizó un estudio en queso tipo panela, en el cual, adicionó *L. lactis* UQ2 rif L⁺ como cultivo protector en queso tipo panela observando títulos de actividad de nisina de 1836.8 UI/g, se observó que la nisina producida en el queso, tuvo un efecto positivo en la calidad microbiológica del producto obteniendo menores poblaciones de microorganismos indicadores en queso inoculado con el cultivo protector que en productos no inoculados. Sin embargo, se observó que la rápida acidificación del producto asociada al desarrollo de la cepa protectora condujo a problemas de aceptación sensorial en los parámetros de textura y sabor.

2.7 Proteolisis en queso

La coagulación de la leche es un paso común a la manufactura de cualquier clase de quesos. Se trata de la transformación de la leche fluida en un gel por desestabilización de la suspensión coloidal constituida por la fracción caseínica de las proteínas lácteas. Este gel incluye a las grasas y a la fase líquida de la leche. En más del 70% del total de los diferentes quesos producidos, la coagulación se logra por una proteólisis parcial (catalizada por quimosina) de la k-caseína, principal responsable de la estabilidad de las micelas de caseína en suspensión, generándose las micelas de paracaseína, que así desestabilizadas se agregan espontáneamente (Walstra *et. al.*, 1990).

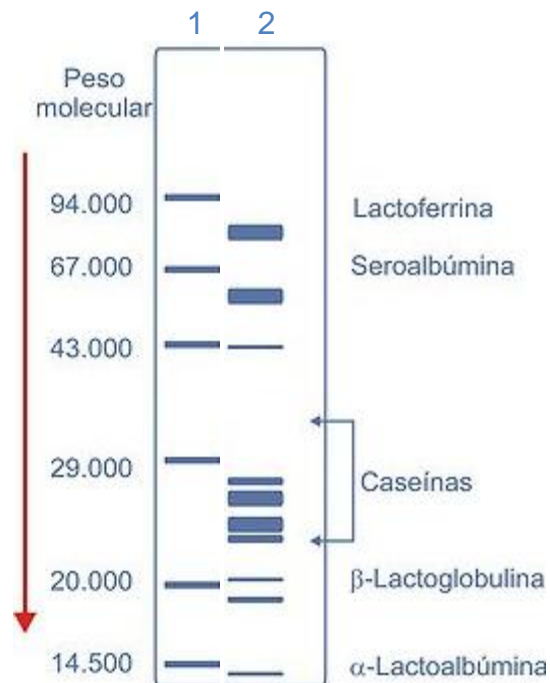


Figura 2. Patrón de electroforesis que se obtiene con las proteínas lácteas procedentes de la especie bovina (carril 2). El carril 1 muestra las proteínas de referencia para los pesos moleculares y la flecha indica el sentido de migración de las proteínas.

Una vez constituido, el gel desarrolla un proceso espontáneo de afirmado o contracción, con expulsión de la fase líquida (sinéresis), la que es separada del coágulo caseínico. Dicho suero, llamado suero dulce, contiene las proteínas lácteas solubles, lactosa y los componentes minerales solubles, así como diversos componentes menores. También se encuentran en esta fracción líquida la grasa y las caseínas no retenidas por el coágulo (Walstra *et. al.*, 1990).

La adición de un cultivo adjunto provee enzimas proteolíticas que completan la acción del cuajo, liberando péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos libres (Desmazeaud y Gripon, 1977); las peptidasas son las responsables de la degradación de los péptidos hidrofóbicos amargos, influyendo positivamente en la calidad organoléptica del queso. Los compuestos así formados son, además, el origen de compuestos que intervienen directamente en el sabor del queso o

constituyen precursores de los compuestos aromáticos (Law *et al.*, 1993). En particular las cepas de *lactococcus* están dotadas de un sistema proteolítico complejo y por ello son los principales agentes proteolíticos en los quesos de pasta prensada. Debido a esto las cepas de *lactococcus* intervienen en la degradación de las caseínas, principalmente por sus proteasas de pared y por sus diferentes peptidasas intracelulares o unidas a la envoltura. La proteólisis en el queso se produce por la acción de las enzimas presentes: las proteasas de la leche, las enzimas coagulantes, los cultivos iniciadores y otros microorganismos que se desarrollan en el queso (Sánchez-Ponte, 2003). Dentro de la proteólisis se distinguen la proteólisis primaria, que es la responsable de la textura blanda característica al principio de la obtención de la cuajada, y la proteólisis secundaria, en la que se generan péptidos de pequeño tamaño y alta hidrofobicidad que detectados por los receptores del sabor producen la sensación de amargor. Estos péptidos sirven como substratos precursores para las proteinasas y peptidasas bacterianas que los transforman en péptidos más pequeños y aminoácidos libres (Panizzolo *et al.*, 2006).

2.8 Formación de compuestos de sabor y aroma

El sabor en productos lácteos está asociado en cierto grado con la hidrólisis de lípidos y proteínas, con la generación de ácidos grasos de cadena corta, ésteres, aldehídos (Badui, 2006).

El desarrollo de sabor en productos lácteos es esencialmente un proceso enzimático que se lleva a cabo principalmente por microorganismos iniciadores (Ayad *et al.*, 2001). Los cultivos iniciadores y no iniciadores de BAL, son la principal fuente de enzimas involucradas en éstos mecanismos (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008).

El aroma típico de un producto lácteo resulta de un balance de una mezcla compleja de compuestos volátiles como ácidos, cetonas, metilcetonas, alcoholes, compuestos sulfurados; presentes en la proporción correcta en el espacio de

cabeza alrededor del queso. Sin embargo, durante la vida de anaquel este balance cambia y, consecuentemente también el aroma (Lecanu *et al.*, 2002).

Todas las transformaciones se deben a la acción de enzimas propias de la leche, a los microorganismos propios y añadidos, así como a las enzimas añadidas para acelerar la maduración. Durante la primera etapa, la lactosa se transforma en ácido láctico, los lípidos se hidrolizan y generan glicerol y ácidos grasos libres de cuatro a diez átomos de carbono y los de cadena mayor se convierten mediante β -oxidación en metilcetonas, los insaturados en ésteres metílicos y aldehídos, y finalmente los ácidos grasos hidroxilados se ciclan y forman lactonas (Figura 3). Por otra parte, las caseínas sufren proteólisis, descarboxilación y desaminación; la metionina genera anhídrido sulfuroso, metanotiol y sulfuro de dimetilo (Badui 2006).

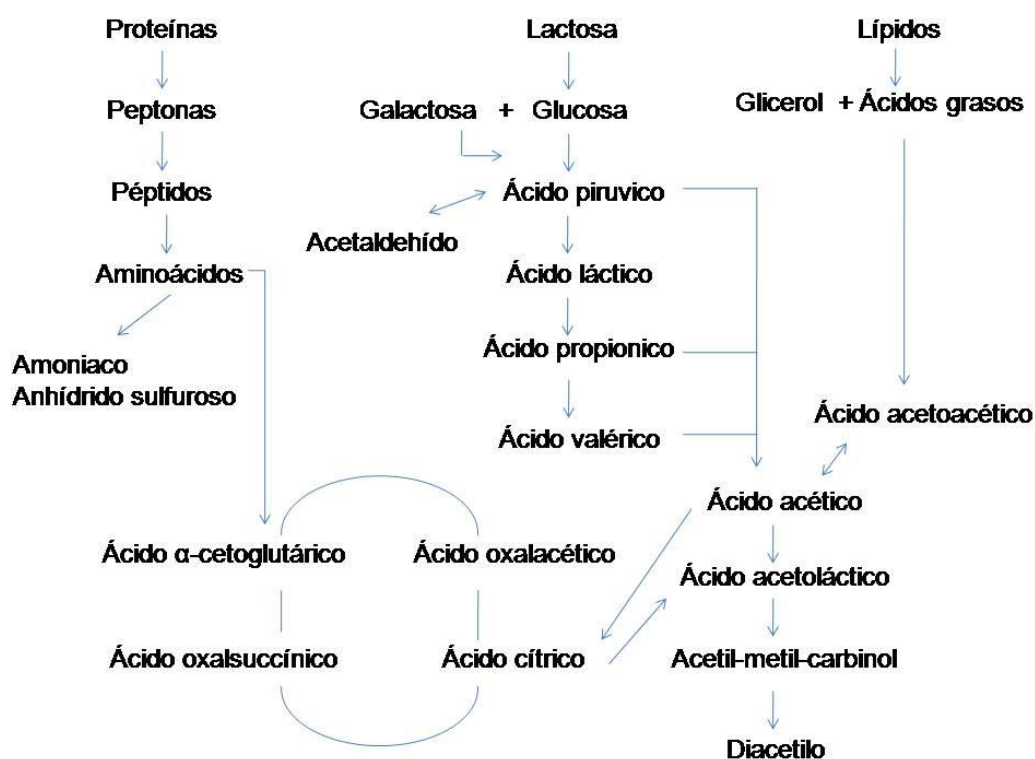


Figura 3. Rutas metabólicas de la lactosa y el citrato (Badui, 2006).

Se han identificado más de 600 compuestos volátiles en diferentes variedades de queso y muchos han sido particularmente relacionados con notas específicas

de sabor y aroma. Generalmente se acepta que la fracción volátil da una imagen aproximada del sabor y aroma de un queso (Garde *et al.*, 2007). El sabor del queso es el resultado del metabolismo de las proteínas, grasas, lactosa y citrato de la leche. Los compuestos de sabor se pueden sintetizar durante el desarrollo de bacterias ácido lácticas y otros microorganismos mediante biosíntesis o bioconversión (Morales *et al.*, 2003).

Los cultivos adjuntos son los principales responsables de la producción de ácido láctico en queso. La autólisis de los cultivos iniciadores, libera proteasas y lipasas que catalizan la degradación de proteínas y lípidos y conducen al desarrollo de sabor en queso. La actividad de éstos cultivos puede atenuarse mediante métodos químicos o físicos, para reducir la producción de ácido por las células (Brubank *et al.*, 2007).

Las tres principales vías involucradas en la formación de compuestos de sabor son la glicólisis, lipólisis y proteólisis. Los dos últimos resultan en la formación de ácidos grasos y aminoácidos. La subsecuente conversión de los ácidos grasos y aminoácidos mediante procesos enzimáticos es de particular importancia para la formación de los compuestos volátiles de sabor como aldehídos, cetonas y ésteres. En la mayoría de los productos lácteos, las BAL, pero también algunos microorganismos no iniciadores juegan un papel crucial en éste proceso (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007).

Aunque las BAL son bajas en la cuajada fresca, su población incrementa durante el almacenamiento. Además de contribuir la actividad de proteasas y lipasas, las BAL están involucradas en la formación de compuestos volátiles durante la maduración del queso (Brubank *et al.*, 2007).

Muchas BAL producen una serie de peptidasas que degradan las proteínas en péptidos pequeños y aminoácidos y brindan un sabor deseable. Los péptidos que brindan sabores indeseables se acumulan y son generalmente degradados por otras peptidasas. Normalmente, aun cuando se utilizan cepas muy semejantes, se pueden observar diferentes actividades de formación de sabor y existen tres

diferentes mecanismos que pueden causar este efecto. La primera razón es que los genes que codifican las enzimas clave para la formación de sabor solo son producidos por una fracción de cepas. El segundo mecanismo que causa estas diferencias en la capacidad de formación de compuestos de sabor depende de la ocurrencia de diferentes variantes de enzimas formadoras de sabor entre las cepas. Finalmente, la expresión de muchas enzimas involucradas en la producción de sabor está fuertemente sometida a regulación. Por ejemplo, los niveles de expresión de enzimas proteolíticas por *L. lactis* está fuertemente regulada por la composición de péptidos y aminoácidos en el medio de cultivo (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007).

El uso de cultivos adjuntos productores de bacteriocinas ha demostrado un desarrollo más rápido de la intensidad de sabor (Garde *et al.*, 2007).

Durante la elaboración de queso, *L. lactis* se enfrenta a varias condiciones de estrés que afectan su actividad metabólica y por lo tanto, la formación de textura y sabor (Yvon *et al.*, 2011). *L. lactis* posee un complejo sistema proteolítico que junto con otras enzimas convierten la caseína en péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos son los precursores clave de la formación de compuestos volátiles de sabor, una vez que son metabolizados en aldehídos, cetonas, amidas, alcoholes y compuestos sulfurados (Gutierrez-Méndez *et al.*, 2008).

L. lactis es capaz de producir compuestos volátiles de cadena ramificada, derivados del catabolismo de aminoácidos de la leche (Centeno *et al.*, 2002). Se ha visto que los principales mecanismos de adaptación en el ambiente de un queso está mediado por la acidificación del medio y el requerimiento de aminoácidos (Yvon *et al.*, 2011).

El balance de los compuestos de sabor determina la calidad sensorial de los productos lácteos y un ligero incremento en los compuestos volátiles puede producir un desequilibrio (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008).

Ochoa (2011), identificó 38 compuestos volátiles en queso tipo panela adicionado con *L. lactis* UQ2 rif L⁺, entre los cuales los principales grupos químicos correspondieron a los alcoholes, cetonas, ácidos, aldehídos y ésteres. El desarrollo de éstos compuestos fue específico para cada tipo de queso. Observó que la adición del cultivo protector favoreció la síntesis de compuestos reportados como producidos por cepas de *Lactococcus* como hexanal y 3-metil butanol que además asemejaron características sensoriales de productos tradicionales no pasteurizados. La adición del cultivo protector tuvo un efecto bifuncional, por un lado favoreció la síntesis de compuestos específicos de sabor y por otro, se brindó protección microbiológica mediante el antimicrobiano natural nisina, sintetizado en la matriz del producto durante su almacenamiento.

2.9 Análisis sensorial y técnicas de detección

Las características sensoriales son el factor más importante que determina la elección del consumidor por un producto (Issanchou *et al.*, 1997). El sabor es la característica más importante que determina la calidad del queso (Hwan *et al.*, 2003).

El análisis sensorial descriptivo es una de las técnicas más utilizadas en el arte de las ciencias sensoriales. Los aspectos cualitativos de un producto incluyen el aroma, apariencia, sabor, textura, resabio, crujencia y otras características que distinguen un producto de otros. Los jueces sensoriales evalúan estos aspectos para facilitar la descripción de los atributos percibidos en un producto. Los análisis descriptivos también se utilizan con fines de control de calidad, para comparación de prototipos de producto y para entender las respuestas del consumidor a los atributos de cierto producto y su mapeo sensorial (Murray *et al.*, 2001).

Una noción como “saber bien” o “saber mal” se evalúa dividiendo en diferentes características (atributos) que son evaluados por paneles de jueces expertos o de consumidores. Esto permite la identificación de los compuestos de aroma que dan el mayor poder olfativo en el producto (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007).

La investigación de la formación de los compuestos de sabor por cultivos iniciadores se basa principalmente en tecnologías analíticas y de análisis sensorial. Normalmente, un paso esencial es identificar los compuestos de aroma clave responsables del efecto sensorial asignado (van Hylckama Vlieg y Hugenholtz, 2007). Las determinaciones instrumentales pueden utilizarse cuando han sido validadas por algún experimento donde muestran fuerte correlación entre los datos de una evaluación sensorial (Issanchou *et al.*, 1997).

El factor más importante del análisis sensorial es la elección del panel de jueces. Se deben tener en cuenta criterios como el estado de salud, habilidad para entender la prueba y de seguir correctamente las instrucciones. Para tener criterios suficientes para determinar la veracidad de cada prueba es necesario emplear un elevado número de candidatos, al menos cien. El tamaño del panel se puede reducir si se utilizan jueces entrenados. Sin embargo, aún con jueces entrenados, se sabe que si el panel es muy pequeño, los resultados serán muy dependientes de la sensibilidad individual. Desde un punto de vista estadístico, a menor número de panelistas, es más difícil poder detectar diferencias significativas (Issanchou *et al.*, 1997).

Es necesario distinguir diferentes pasos cuando se va a llevar a cabo el estudio. El primer paso se refiere a la recolección de los descriptores y la elección de las escalas de respuesta, el segundo paso concierne a las mediciones. En un procedimiento de libre-elección no es necesario el entrenamiento de los panelistas para que utilicen los descriptores del mismo modo. Este método se usa principalmente cuando se usan jueces no entrenados (Issanchou *et al.*, 1997).

El conocimiento de la composición esperada permite la optimización del producto y la validación de modelos entre una descripción sensorial y los datos relevantes de un análisis instrumental (Murray *et al.*, 2001).

Para estudiar compuestos volátiles en queso, se han utilizado técnicas como la destilación, extracción-destilación simultánea, espacio de cabeza estático y dinámico. La destilación por vapor puede causar pérdida de compuestos volátiles

sensibles al calor y el uso de solventes puede generar artefactos indeseables durante el análisis (Hwan *et al.*, 2003). Los análisis de espacio de cabeza son útiles para estudiar los efectos de los cultivos lácticos en las características químicas y sensoriales y su relación en el queso (Garde *et al.*, 2007). Estos análisis incluyen técnicas estáticas y dinámicas, como la microextracción en fase sólida (Lecanu *et al.*, 2002).

2.9.1 Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (SPME)

La microextracción en fase sólida de espacio de cabeza, SPME, es una técnica analítica para el aislamiento y concentración de compuestos volátiles y no volátiles en alimentos. Integra muestreo, extracción, concentración e introducción de la muestra en cromatografía de gases, CG, o cromatografía de líquidos de alta resolución, HPLC. El principio de la SPME es un equilibrio de partición de los analitos entre el recubrimiento de la fase sólida o fibra, matriz de la muestra y/o el espacio de cabeza (Hwan *et al.*, 2003). Esta técnica ha sido aplicada a numerosos estudios de compuestos de aroma y sabor en alimentos y bebidas (Lecanu *et al.*, 2002, Burbank *et al.*, 2008, Centeno *et al.*, 2002, Garde *et al.*, 2007).

Los estudios de optimización de la SPME en compuestos volátiles de queso se han enfocado en la selección de la fase adecuada, tiempo de exposición, influencia de la temperatura de absorción y el volumen del espacio de cabeza. Pocos estudios han reportado el desarrollo de condiciones sensibles y reproducibles en la SPME debido a la concentración relativamente baja y a la distribución desigual de los compuestos volátiles durante el almacenamiento o maduración (Hwan *et al.*, 2003).

Comparada con la destilación, SPME, proporciona una evaluación satisfactoria de la mayoría de los compuestos volátiles que juegan un papel principal en la percepción del aroma. La SPME permite generar una huella digital de los compuestos responsables de la percepción del aroma por el consumidor (Lecanu *et al.*, 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

El queso panela es un producto que debido a su composición puede resultar un buen sustrato para el crecimiento de microorganismos patógenos o deterioradores de alimentos, es por ello que se deben establecer mecanismos de protección para favorecer la conservación e inocuidad de éste producto.

La bioconservación permite el uso de metabolitos microbianos en alimentos como medio de conservación. La incorporación de bacterias ácido lácticas en alimentos como el queso brinda un mecanismo de protección natural mediante la síntesis de bacteriocinas como la nisina en la matriz del alimento y durante su maduración.

El sabor es el atributo de mayor importancia en la aceptación por los consumidores. Existe una tendencia de los consumidores de queso por preferir productos derivados de leche no pasteurizada, dado que se ha observado que durante la pasteurización se originan o se pierden sabores característicos que marcan una notable diferencia con respecto a un queso fabricado con leche no pasteurizada.

L. lactis UQ2 rif L⁺ es una cepa modificada por conjugación que al incorporarse en queso es capaz de sintetizar nisina, que es una bacteriocina con buena actividad inhibitoria de microorganismos patógenos y deterioradores. Esta cepa también metaboliza los compuestos complejos del queso y genera diferentes compuestos de sabor y aroma que permiten caracterizar al producto sensorialmente.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la producción de compuestos volátiles, así como de nisina y determinar la aceptación sensorial de queso tipo panela adicionado con *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ como cultivo protector.

4.2 Objetivos Específicos

- Mediante un diseño experimental evaluar el efecto de los niveles de grasa, y cantidad de inóculo de *L. lactis* UQ2 rif L⁺, en la concentración de nisina y la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ durante la vida de anaquel del queso.
- Determinar los compuestos volátiles de sabor del queso en los tratamientos del diseño experimental.
- Determinar la aceptación sensorial del queso en los diferentes tratamientos del diseño experimental.
- Comparar los parámetros sensoriales con la producción de compuestos volátiles del queso resultante de los diferentes tratamientos del diseño experimental.

V. HIPÓTESIS

Mediante la adición del cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L⁺ durante la elaboración de queso panela, se puede obtener un producto en el cual la cepa adicionada favorezca la síntesis de nisina a lo largo de la vida de anaquel y produzca compuestos de sabor que permitan una buena aceptación por el consumidor.

VI. METODOLOGIA

6.1 Materiales

6.1.1 Cepas Mibrobianas

Lactococcus lactis UQ2 rif^{L+} y *Micrococcus luteus* NCBI 8166, fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química.

6.1.2 Enzima coagulante

Quimosina (Qualact, fuerza de cuajo 1:7500) enzima utilizada para la hidrolisis la caseína de la leche.

6.1.3 Antimicrobianos

Nisina (MP Biomedical, LLC) y Rifampicina (Sigma)

6.1.4 Soluciones y medios de cultivo

6.1.4.1 Agua peptonada 0.1%

Por 1 L de agua se disolvió 1 g de peptona de caseína (Bioxon)

6.1.4.2 Agar lactosa purpura de bromocresol (PBC)

Por 1 L de medio de cultivo se pesaron 5 g de peptona (Bioxon), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 10 g de lactosa (Sigma, Aldrich), 0.04 g de púrpura de bromocresol (Merck) y 10 g de agar (Bioxon). Rifampicina (Sigma) 200 µg/L.

6.1.4.3 Agar Assay

Por 1 L de medio de cultivo se pesaron 10 g de peptona de caseína (Bioxon), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 3 g de cloruro de sodio (JT Baker), 1.5 g de

extracto de levadura (Bioxon), 1 g de azúcar mascabado (Dillis) y 10 g de agar (Bioxon). Se ajustó pH a 6.5 ± 0.01 .

6.1.4.4 Solución Ringer

Por 1 L de solución se pesaron 9 g de cloruro de sodio (JT Baker), 0.42 g de cloruro de potasio (JT Baker), 0.24 g de cloruro de calcio anhidro (Fermont), 0.20 g de bicarbonato de sodio (JT Baker). Solución Ringer $\frac{1}{4}$: se diluyó la solución Ringer 1:3 en agua.

6.1.4.6 Agar métodos estándar

Por 1 L de medio de cultivo se pesaron 23.5 g de agar métodos estándar (Bioxon). Se ajustó el pH a 7.0 ± 0.2 .

6.1.4.7 Agar papa dextrosa

Por 1 L de medio de cultivo se pesaron 39 g de agar papa dextrosa (Bioxon). Se agregaron 14 mL de una solución de ácido tartárico (Sigma) al 1% p/v y 0.05 g de rosa de bengala (Merck).

6.1.4.9 Estándar 2-metilpirazina

Por 1 g de estándar al 10% p/p se pesaron 0.1 g de 2-metilpirazina (Aldrich) y se llevaron a 1 g con metanol (JT Baker). Se hicieron diluciones decimales p/p hasta obtener una concentración de 0.001% p/p.

6.2 Diseño experimental

Cuadro 1. Diseño experimental para la elaboración de queso tipo panela.

Tratamiento	%Inóculo	% grasa
1	0	1.0
2	0	3.5
3	0.1	1.0
4	0.1	3.5
5	1.0	1.0
6	1.0	3.5

Para la elaboración del queso tipo panela se utilizó un diseño factorial 2^2 es decir, de 2 factores con 2 niveles cada uno. Los factores evaluados fueron la grasa de la leche (con niveles de 1.0 % y 3.5%) y el inóculo de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ (con niveles de 0.1%=10⁶ UFC/mL y 1.0%=10⁷ UFC/mL v/v). Se tuvieron 4 tratamientos y también se elaboraron dos controles sin inóculo, uno con cada nivel de grasa evaluado (Cuadro 1) cada uno con su réplica. Se tienen un total de 12 corridas, que aleatoriamente se llevaron a cabo como se muestra en el Cuadro 2. El análisis de resultados se llevó a cabo con el programa estadístico JMP versión 5.0.1.

Cuadro 2. Diseño experimental aleatorizado para la elaboración de queso tipo panela.

No. Corrida	% Inóculo	% grasa
1	0.0	3.5*
2	0.1	3.5
3	1.0	1.0
4	0.1	1.0
5	0.0	1.0*
6	1.0	3.5
7	0.1	3.5
8	0.1	1.0
9	1.0	3.5
10	0.0	1.0*
11	1.0	1.0
12	0.0	3.5*

* Los renglones sombreados representan los controles no inoculados

6.3 Métodos

6.3.1 Activación de *L. Lactis* UQ2 rif L⁺ para su incorporación como inóculo en queso panela.

L. lactis UQ2 rif L⁺ proveniente de una conserva a -70°C, se colocó en un tubo con caldo M17 adicionado al 0.5% de lactosa y se incubó durante 24 h a 30°C. Una vez activada la cepa, se tomaron 100 µL y se inocularon en otro tubo con 5 mL de leche pasteurizada (esterilizada a 112°C/15 minutos) éste se incubó a 30 °C por 12 h. El cultivo del último tubo, se inoculó en un matraz conteniendo leche

pasteurizada suplementada con soluciones estériles de sulfato de magnesio 0.5 g/L y sulfato de manganeso 0.1 g/L, y se incubó a 30°C por 6 h. Se tomó una muestra de 1 mL y se llevó a cabo la determinación de la cuenta microbiana en medio PBC adicionado de rifampicina por el método de la gota o Miles-Misra.

6.3.2 Incorporación de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ en la elaboración de queso panela como cultivo protector.

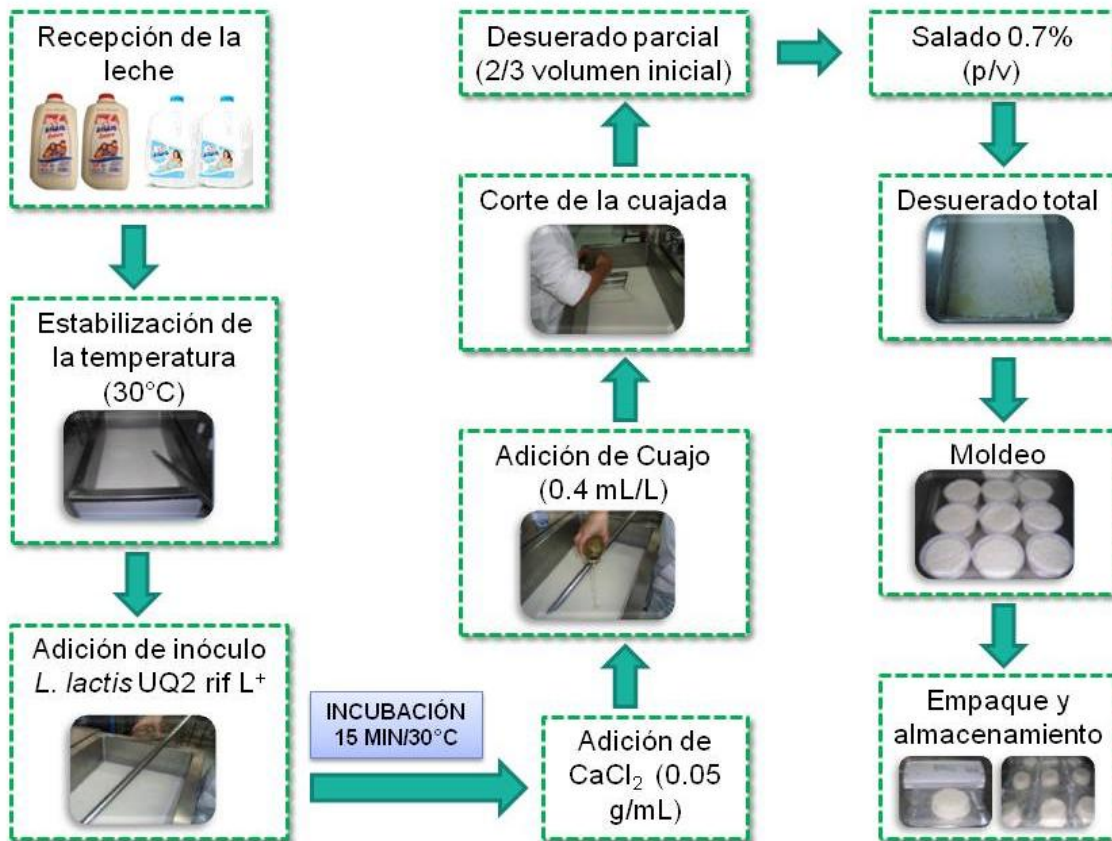


Figura 4. Diagrama de elaboración de queso panela adicado del cultivo protector

El queso se elaboró utilizando leche pasteurizada de la marca Lala, 40 L de leche, con un nivel de grasa estandarizado de acuerdo a la corrida correspondiente del diseño experimental (de 1% y 3.5%), se colocaron en una tina con chaqueta de vapor y se estabilizó la temperatura a 30°C. Se adicionó el inóculo preparado en la sección anterior en un volumen correspondiente al diseño

(0.1%-40 mL=10⁶ UFC/mL y 1.0%-400 mL= 10⁷ UFC/mL) y se dejó incubar durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó CaCl₂ a 0.05 g/L y se disolvió completamente. Se adicionó el cuajo (Qualat) a una concentración de 0.4 mL/L. El cuajo se dejó actuar durante 25 minutos y después de este tiempo se procedió a realizar el corte de la cuajada utilizando liras de corte de 1 cm³. La pasta formada se desuero parcialmente 2/3 del volumen inicial de leche y se adicionó a la pasta la sal al 0.7% p/v en base al volumen inicial. La pasta se homogenizó con la sal adicionada y se procedió a desuero totalmente. Se colocó en moldes de 600 g y se dejó desuero durante 12 h en refrigeración. Se desmoldó y empacó al vacío en empaques individuales por pieza de queso. El producto se almacenó a 4°C durante 21 días, tomando muestras a los días 0, 7, 14 y 21 para análisis posteriores (Figura 4).

6.3.3 Determinación de la actividad de nisina

La determinación de la actividad de nisina se realizó en base a una modificación al Estándar Británico 4020 para la determinación de nisina en alimentos, metodología descrita por Tramer y Fowler (1964).

6.3.3.1 Activación de *Micrococcus luteus*

M. luteus NCBI 8166 proveniente de una conserva a -70°C se colocó en un tubo con caldo assay y se incubó durante 48 h a 30°C. Finalizado el periodo de incubación, se sembró por estriado en un tubo inclinado y en placas con agar assay al 1%, para verificar la pureza de la cepa (González, 2009).

De la cepa aislada se tomó una asada y se sembró por estriado en tubos inclinados con agar assay al 1%. Para realizar los ensayos de actividad se tomó el cultivo de los tubos, y se diluyó con 1 mL de solución Ringer ¼ y se guardó en un frasco estéril; de esta solución concentrada, se tomaron alícuotas de 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 30 µL y se llevaron a 1 mL con la solución Ringer ¼, para ajustar la concentración del microorganismo a una absorbancia de 0.3 ± 0.01, leyendo a una

longitud de onda (λ) de 650 nm, la solución obtenida se denominó solución de trabajo.

6.3.3.2 Curva estándar de actividad de nisina

La curva estándar de nisina se realizó preparando una solución de 100 UI/mL, para lo cual se pesaron 0.01 g de nisina (MP Biomedical, LLC) y se disolvieron en 8 mL de HCl (JT Baker) 0.02 N. Se sometió a un calentamiento de 98°C en baño de agua por 5 min. Se enfrió a 20°C y se dejó reposar durante 2 h. Se aforó la solución a 10 mL utilizando HCl 0.02 N. De ésta solución se hicieron diluciones decimales en HCl 0.02 N hasta obtener una concentración de 10 UI/mL. De la última solución se tomaron 10, 20, 30, 50, 70 y 90 μ L y se aforaron a 1 mL con HCl 0.02 N para tener soluciones de 1, 2, 3, 5, 7 y 9 UI/mL. Las diluciones se colocaron en pozos en placas de agar inoculado con 2% v/v de la solución de trabajo de *M. luteus* y 2% de Tween 20 al 50% p/v. Las placas se incubaron a 30°C por 48 h. Después del tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición utilizando un vernier. Se graficó el promedio de dos réplicas del halo de inhibición contra el Log de UI/mL para generar la ecuación de la recta.

6.3.3.3 Tratamiento de las muestras

Las muestras de 40 g de queso se disolvieron en 160 mL de HCl 0.02 N, se ajustó el pH de la mezcla a 2.0 con HCl 0.5 M y se calentaron en un baño de agua para mantener la muestra a 80°C durante 5 minutos a fin de inactivar proteasas. Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 0.5 M y se llevaron a un volumen final de 200 mL con HCl 0.02 N, luego se centrifugaron durante 15 min a 11,000 rpm a una temperatura de 4°C. Al finalizar se observó la formación de tres fases y se tomó una alícuota de la fase líquida intermedia debajo de la grasa. Esta muestra se esterilizó mediante una membrana de poro de 0.45 μ m para obtener el extracto de nisina.

6.3.3.4 Método de difusión en agar

Las placas para la determinación de actividad se prepararon con medio assay al 1%, inoculado con 2% v/v de la solución de trabajo de *M. luteus* y 2% v/v de una solución de Tween 20 al 50% p/v. En cada caja preparada se hicieron perforaciones con un horador no. 4 estéril. En cada perforación se colocaron 60 µL muestra, con sus respectivas replicas y diluciones. Las placas inoculadas se incubaron durante 48 h a 30°C, para observar la formación de halos de inhibición alrededor de los pozos. Después del periodo de incubación, se midió el halo de inhibición (BS 4020, 1974). Para la cuantificación de nisina, la actividad antimicrobiana de los extractos se expresó en Unidades Internacionales (UI). Este valor se calculó extrapolando el halo de inhibición obtenido, en la curva de calibración, y multiplicando por el inverso de la dilución de la muestra.

6.3.4 Determinación de la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺

La determinación de la población se llevó a cabo por el método de Miles-Misra o método de la gota.

De cada una de las muestras de queso se prepararon una serie de diluciones decimales seriadas; se tomaron 10 g de queso y se colocaron en un frasco con 90 mL de agua peptonada al 0.1%. Cada dilución se homogenizó en el vórtex, se tomó 1 mL del frasco anterior y se transfirió en un tubo conteniendo 9 mL de agua peptonada, el procedimiento se repitió hasta obtener las diluciones necesarias para cada caso (Vanderzant *et al.*, 1992).

Para realizar la cuenta se colocaron tres gotas de 20 µL de las muestras y las diluciones correspondientes en placas de agar PBC al 1% adicionado con rifampicina (Sigma) y se dejaron secar a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar, las placas se incubaron a 30°C y después de 24 h se contaron las colonias en las placas.

6.3.5 Análisis Microbiológico

6.3.5.1 Determinación de la cuenta bacteriana total

Se llevó a cabo según lo descrito en la NOM-092-SSA1-1994. Se tomarón 10 g de muestra y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada al 0.1%. Se hicieron diluciones decimales seriadas en agua petonada y se colocaron en placas de agar métodos estándar (Bioxon). Se incubaron a 30°C por 48 h. Transcurrida la incubación se contaron las colonias y se expresaron los resultados como UFC/g.

6.3.5.2 Conteo de hongos y levaduras

Se llevó a cabo según lo descrito en la NOM-111-SSA1-1994. Se tomarón 10 g de muestra y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada al 0.1%. Se hicieron diluciones decimales seriadas en agua petonada y se colocaron en placas de agar papa dextrosa (Bioxon) adicionado de ácido tartárico y rosa de bengala. Se incubaron a 30°C por 7 días. Transcurrida la incubación se contaron las colonias y se expresaron los resultados como UFC/g.

6.3.6 Evaluación sensorial

Edad: _____ Sexo: _____ Fecha: _____ No. De muestra: _____

Instrucciones: Pruebe las muestras de queso y marque con una "x" el nivel de agrado de cada uno de los atributos evaluados. Entre cada muestra, coma un trozo de galleta y enjuague su boca con un poco de agua.

Sabor:

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
No gusta Gusta Moderadamente Gusta mucho

Textura:

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
No gusta Gusta Moderadamente Gusta mucho

Comentarios: _____

Figura 5. Hoja de encuesta de la evaluación sensorial con consumidores.

La evaluación sensorial de todos los tratamientos se llevó a cabo mediante una prueba hedónica con consumidores en los tiempos 7, 14 y 21 días después de la elaboración del queso, para ello se encuestaron 100 personas, las cuales evaluaron el producto en los atributos de sabor y textura mediante una escala de 0 a 10, como se muestra en la Figura 5.

6.3.7 Análisis de compuestos volátiles

El perfil de compuestos volátiles se llevó a cabo mediante la técnica de Microextracción en Fase Sólida de Espacio de Cabeza (SPME-Headspace).

6.3.7.1 Preparación de la muestra

Se pesaron 30 g de queso y se adicionaron 60 g de agua fría, la muestra se homogenizó con un ultra-turrax (T25 basic IKA-WERKE), por 2 min a 4500 rpm hasta obtener una pasta homogénea. En viales previamente horneados, se colocaron 2 g de la mezcla, 0.5 g de NaCl (Fermont) y 0.01 g de 2-metil-pirazina (Aldrich) al 0.01%, como estándar interno. Los viales se sellaron con una engargoladora Hand Crimper marca Restek (Bellefonte, PA). La muestra se guardó a -20°C hasta su análisis.

6.3.7.2 Extracción e identificación de compuestos volátiles

Para la extracción de los compuestos se utilizó un automuestreador MPS2XL (Gerstel Inc., Maryland, EUA) con una fibra SPME de 2 cm DVB/CAR/PDMS (Divinilbenceno /Carboxeno/ polidimetilxilosano) 50/30 µm de espesor de fase (Supelco, Bellefonte, VA, EUA). La muestra en el vial fue preincubada a 45°C por 5 min a 250 rpm. La extracción se llevo a cabo durante 1 h a 45°C y con una agitación constante de 250 rpm.

Una vez transcurrido el tiempo los compuestos fueron desorbidos de la fibra en el puerto de inyección por 5 min a 230°C en el modo “splitless”. Se utilizó un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, Inc., Wilmington), acoplado a

un detector de espectrometría de masas cuadrupolar modelo 5975C (Agilent Technologies, Inc., California, EUA). Se utilizó una columna capilar DB-WAX (30 m x 250 µm de diámetro, 0.25 µm de espesor de fase, Agilent Technologies Inc., California, EUA). El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 40°C por 10 min, incremento a 110°C con una velocidad de 5°C/min, incremento a 180°C con una velocidad de 2°C/min y finalmente un incremento a 230°C con una velocidad de 30°C/min donde se mantuvo por 8 min. El gas de arrastre utilizado fue Helio (pureza 99.999%), a flujo constante dentro de la columna de 1 mL/min.

El detector de espectrometría de masas se utilizó en modo de impacto electrónico a 70 eV, con un Gain Factor de 1, temperaturas de línea de transferencia, fuente de ionización y cuadrupolo de 250°C, 230°C y 150°C respectivamente, y un rango de masas de 33 a 800 uma.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó a partir de su espectro de masas, tomando como identificación positiva un 80% de parecido al localizado en la base de datos NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, versión 1.7, USA

6.3.8 Análisis fisicoquímico

6.3.8.1 Determinación de acidez

6.3.8.1.1 Determinación de acidez titulable en leche

La determinación de acidez en la leche, se llevó a cabo según lo descrito en la NMX-F-511-1988. Se titularon 20 mL de leche diluidos en 20 mL de agua con NaOH 0.1 N, utilizando fenoftaleína como indicador. La acidez se calculó como se indica en la ecuación (1) y se expresó como grados Dormic (°D = % de ácido láctico X 100)

$$- \quad \text{—————} \quad (1)$$

Donde:

V= Volumen de NaOH gastado en la titulación

N= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio

M = Volumen de muestra

6.3.8.1.2 Determinación de acidez titulable en queso

La determinación de la acidez en queso se llevó a cabo según lo descrito por Pearson (1988). Se pesaron 20 g de queso y se maceraron en agua caliente (40°C) para producir un volumen total de 210 mL y se filtraron con manta de cielo. Se titularon 25 mL del filtrado con NaOH 0.1 M por triplicado usando fenoftaleína y se determinó la acidez como grados °D (1°D=10% p/p de ácido láctico), a partir del porcentaje de ácido láctico (1 mL 0.1 M = 0.0090 g de ácido láctico).

6.3.8.2 Determinación de proteína

El análisis de proteínas se llevó a cabo según lo descrito en la NMX-F-068-S-1980. Se pesó 1 g de queso y se transfirió a un matraz Kjeldahl, se añadieron 2 g de sulfato de cobre, 10 g de sulfato de sodio anhidro, 25 mL de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio. El matraz se colocó en el digestor y se calentó a 180°C hasta que todo el material se carbonizo, se aumentó gradualmente la temperatura hasta que la disolución se observó completamente clara y se digirió por 30 minutos más. A la solución fría se le añadieron 400 mL de agua para disolver completamente la muestra, se agregaron 3 gránulos de zinc y 50 mL de NaOH 1:1. El matraz se conectó a un sistema de destilación, en la salida del refrigerante un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 50 mL de ácido bórico y unas gotas de indicador. Se destiló completamente. El destilado se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N. El Nitrógeno presente en la muestra, expresado en por ciento se calculó mediante la ecuación (2)

$$\text{-----} \quad (2)$$

En donde:

V = Volumen de ácido clorhídrico empleado en la titulación (mL)

N = Normalidad del ácido clorhídrico.

m = Masa de la muestra (g).

0.014 = Miliequivalente del nitrógeno.

El porcentaje de proteínas se obtuvo multiplicando el porcentaje de nitrógeno obtenido por el factor correspondiente, para productos lácteos, el factor es 6.38 (NOM-131-SSA1-1995).

6.3.8.3 Determinación de grasa

6.3.8.3.1 Determinación de grasa en leche

Se llevó a cabo como se describe en la NMXX-F-387-1982. Se tomaron 10 mL de ácido sulfúrico (JT Baker) y se colocaron en el butirómetro evitando bañar las paredes internas del cuello; se agregaron resbalando por las paredes y sin mezclar, 11 mL de leche, inmediatamente se agregó 1.0 mL de alcohol iso-amílico (JT Baker). Se cerró con tapón de hule y se agitó para lograr la digestión completa. Se centrifugó por dos minutos a 1100 rpm y se leyó el espesor de la capa de grasa acumulada en la parte superior; la cual expresa directamente la cantidad en por ciento de la grasa contenida en la leche.

6.3.8.3.2 Determinación de grasa en queso

Se llevó a cabo según se describe en la NMX-F-387-1982. Se midieron 10 mL de ácido sulfúrico en un butirómetro evitando bañar las paredes internas del cuello; se añadieron 1.1 g de queso, inmediatamente se agregó 1 mL de alcohol iso-amílico. Se agitó enérgicamente la mezcla bien tapada, con lo que se produce un calentamiento aproximadamente de 80°C y la disolución en ácido de las proteínas de la leche. Se centrifugó dos minutos a 1100 rpm. Se leyó el espesor de la capa de grasa acumulada en la parte superior; la cual expresa directamente la cantidad en por ciento de la grasa contenida en la muestra.

6.3.9 Determinación de perfil de proteólisis

Para determinar el perfil proteolítico, se pesó 1 g de muestra de queso y se disolvió en buffer de acetato 1 mM pH=4.3. Se calentó la mezcla a 80°C por 20 min. Se centrifugó 15 min a 3000 rpm a 4°C. Se dispersó en buffer de acetato y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Se lavó la muestra con acetona y se secó a temperatura ambiente. Se disolvió en NaOH a pH 9.0. Se agitó hasta dispersión y se centrifugó a 300 rpm por 4 min a 4°C. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

Se corrió un gel de electroforesis Tris-glicina de 12%T, utilizando como gel separador y concentrador las mezclas que se observan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Preparación de las mezclas de gel separador y gel concentrador en electroforesis desnaturalizante Tris-glicina.

Soluciones stock	Gel Separador	Gel concentrador
30% Acrilamida/0.8 % bisacrilamida	2.0 mL	1.00 mL
Tris Cl/SDS, pH 8.8	1.25 mL	0.67 mL
H ₂ O	1.75 mL	4.20 mL
Persulfato de amonio (10% p/v)	1.60 µL	25 µL
TEMED	3.3 µL	5 µL

La muestra se corrió también en un gel de electroforesis Tris- Trisina de 16.5% T, utilizando como gel separador y concentrador las mezclas que se observan en el cuadro 4. El buffer del ánodo consistió de una solución de Tris 0.2 M pH 8.9 y el buffer del cátodo de una solución de Tris 0.1 M, tricina 0.1 M y SDS 0.1% pH 8.25.

Cuadro 4. Preparación de las mezclas de gel separador y gel concentrador en electroforesis desnaturizante Tris-trisina.

Soluciones stock	Gel Separador	Gel concentrador
30% Acrilamida/0.8 % bisacrilamida	9.80 mL	1.62 mL
Tris Cl/SDS, pH 8.45	10.00 mL	3.10 mL
H ₂ O	7.03 mL	7.78 mL
Glicerol	4.00 g (3.17 mL)	-----
Persulfato de amonio (10% p/v)	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	5 µL

La electroforesis se corrió durante 1 h a 30V y después se ajustó el voltaje a 150 V durante 2.5 h a temperatura controlada de 20± 3°C.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ durante su activación en leche suplementada.

Para establecer los tiempos requeridos para la activación del inóculo, se hicieron cinéticas de crecimiento durante 24 h con el fin de encontrar el tiempo adecuado en el cual el microorganismo se encontraba en fase exponencial y en éste tiempo incorporarlo en la leche utilizada como materia prima para la elaboración del queso. Para ello, se esterilizó leche pasteurizada 112 °C por 15 min, el inóculo se adicionó al 1%. Se incubó a 30 °C por un lapso de 24 h tomando muestra cada h, las primeras 12 h y una muestra final a las 24 h. Ochoa (2011) realizó una cinética de crecimiento para 4 activaciones obteniendo una población máxima de 10⁹ UFC/g a las 10 h después de tres resiembras en leche. En este caso, se realizaron tres activaciones como se muestra en la Figura 6.

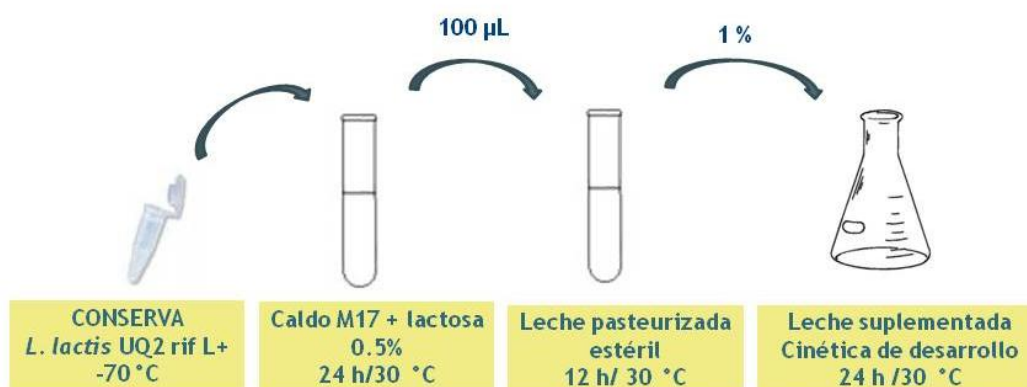


Figura 6. Activaciones de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ para realizar la curva de desarrollo en leche pasteurizada suplementada.

La suplementación de la leche consistió de sales de sulfato de magnesio 0.5 g/L y sulfato de manganeso 0.1 g/L, y 1.86 µg de nisina/mL de leche como inductor.

Los resultados del monitoreo, se muestran en la Figura 7. Se observa una fase de adaptación de 3 h, mostrando luego un crecimiento exponencial entre las 4 y

hasta las 9 h, con una población máxima de 7.10 ± 0.14 Log UFC/g, después de éste tiempo se observa la fase de decaimiento microbiano. En base a éste resultado, se estableció como tiempo de incubación para el inóculo durante la tercera activación un periodo de 6 h, tiempo en el cual podemos asegurar que el microorganismo se encuentre en fase exponencial de desarrollo.

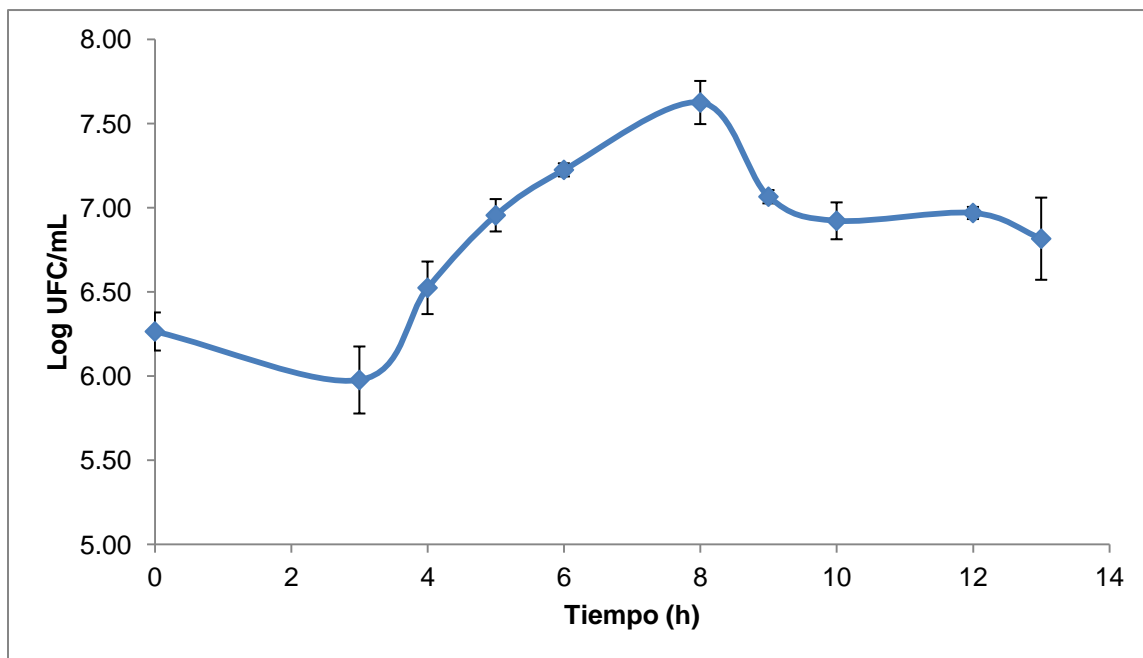


Figura 7. Curva de desarrollo de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ durante la tercera activación en leche pasteurizada suplementada

7.2 Efecto del tiempo de preincubación

Una vez determinadas las condiciones de activación de la cepa, se realizaron pruebas para establecer el tiempo de incubación del inóculo en la leche antes de proceder al cuajado durante el proceso de elaboración del queso. Se elaboró queso tipo panela adicionado del inóculo sin preincubación y probando 15 minutos a 30°C previo a la adición del cloruro de calcio y adición del cuajo. Para los productos elaborados, se monitoreo la cuenta del inóculo de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ y la acidez del producto durante 14 días para producto almacenado en refrigeración a 4°C, con el fin de verificar cual de los dos tiempos resulta más favorable para el

desarrollo del microorganismo a través del tiempo sin afectar de manera considerable sus características sensoriales mediante la determinación de la acidez.

En la Figura 8 se puede observar el comportamiento de la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ durante 14 días en queso tipo panela con y sin tiempo de preincubación. Se observa que para el tiempo de preincubación de 15 minutos existe un mayor desarrollo del inóculo en el queso, mientras que en el queso que se elaboró con el inóculo sin preincubar, observó bajo desarrollo de la población estableciendo una población estable durante los 14 días evaluado, de aproximadamente 8 Log UFC/g, mientras que en el queso con 15 min de preincubación se alcanzo una población máxima de 9.26 ± 0.03 Log UFC/g a los 14 días de almacenamiento del producto.

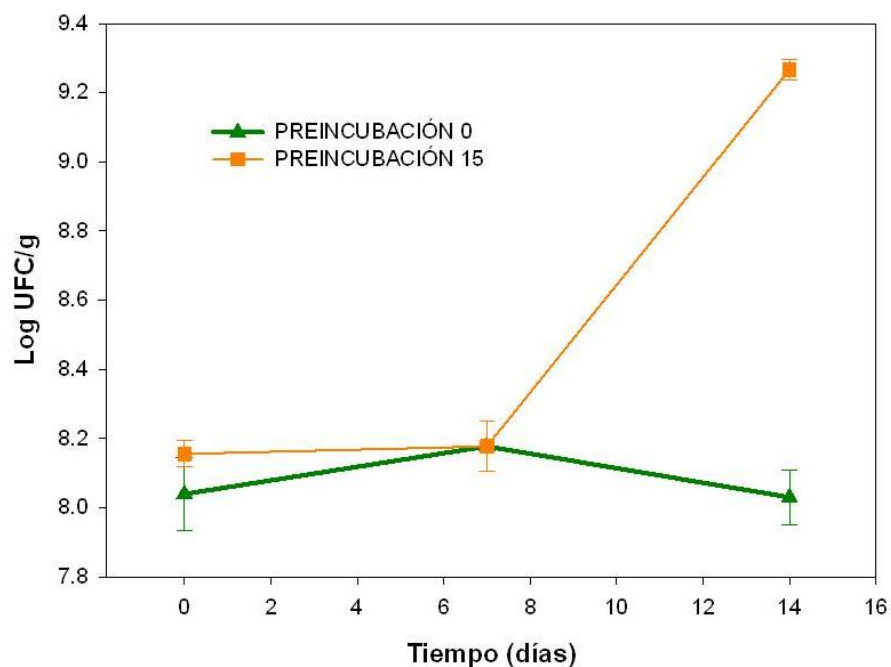


Figura 8. Cinética de desarrollo de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ en queso tipo panela evaluado con y sin tiempo de preincubación.

En la Figura 9, observamos el desarrollo de acidez en los productos elaborados con y sin tiempo de preincubación, encontrando que cuando no se dio

tiempo de preincubación al inóculo, la acidez tiende a estabilizarse en 7°D, en el caso del queso que se elaboró con un tiempo de preincubación de 15 minutos, se observa que la acidez sigue en ascenso después del día 7, sin embargo, se alcanza un valor máximo de 11.90 ± 0.21 °D a los 14 días, lo cual, no se refleja en detrimento de la calidad del producto y se considera un valor dentro de los rangos de acidez aceptable para quesos frescos.

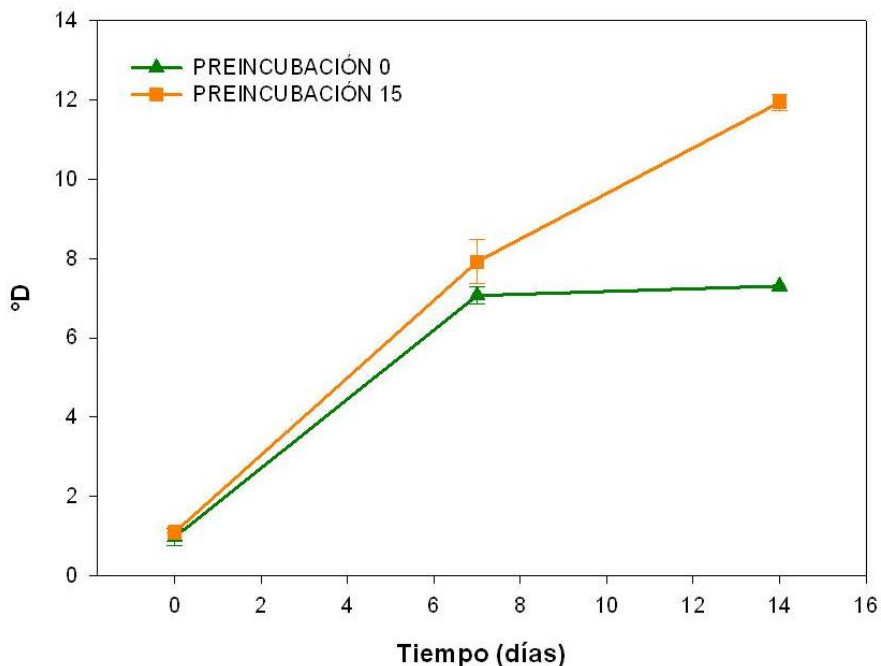


Figura 9. Comportamiento de la acidez en queso tipo panela evaluado con y sin tiempo de preincubación.

En base a éstos resultados, se determinó que para los productos que corresponden al diseño experimental se estableció un tiempo de preincubación de 15 minutos para el inóculo a 30°C durante el proceso y previo a la adición del CaCl_2 .

7.3 Pruebas de la leche utilizada como materia prima

En la leche utilizada como materia prima para cada una de las corridas del diseño experimental, se realizaron pruebas de acidez, cuenta bacteriana total y contenido de grasa, como parámetros de calidad de la materia prima.

La acidez se determinó mediante titulación ácido-base y el contenido de grasa mediante el método de Gerber (Pearson, 1988). Se llevó a cabo una prueba de antibiótico utilizando el kit comercial Delvotest®. La prueba consiste en evaluar el crecimiento o inhibición de *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*. En una ampolleta que contiene al microorganismo y una pastilla nutritiva se coloca la muestra y se incuba a 65 °C/2.5 h. Después de éste tiempo se evalúa el cambio de coloración, si la ampolleta se conserva de color azul, la muestra se considera positiva, es decir, contiene residuos de antibióticos que sobrepasan el límite de detección de la prueba, 3 ppb. Si se observa un color amarillo, indica que los residuos de antibióticos no sobrepasan el límite de detección. Un color parcialmente amarillo y purpúreo del medio sólido indica que contiene residuos de antibióticos en una concentración próxima al límite de detección. En el Cuadro 5 se observan los resultados para la acidez, grasa de la leche y prueba de antibiótico para cada tratamiento del diseño experimental y su réplica.

Cuadro 5. Acidez, contenido de grasa y prueba de antibiótico de la leche utilizada como materia prima en la elaboración de queso tipo panela en cada uno de los tratamientos del diseño experimental y su réplica.

Tratamiento	Acidez (°D)	Acidez (% de ácido láctico)	% grasa	Prueba de antibiótico
T1	17.67 ± 0.58	0.18 ± 0.01	1.00 ± 0.00	Negativo
	9.67 ± 0.58	0.10 ± 0.01	1.00 ± 0.00	Negativo
T2	17.00 ± 1.73	0.17 ± 0.01	3.55 ± 0.07	Negativo
	13.67 ± 1.15	0.14 ± 0.01	3.20 ± 0.00	Negativo
T3	18.00 ± 1.73	0.18 ± 0.01	1.00 ± 0.00	Negativo
	12.00 ± 0.00	0.12 ± 0.00	1.00 ± 0.00	Negativo
T4	18.33 ± 0.58	0.18 ± 0.01	3.50 ± 0.00	Negativo
	15.00 ± 0.00	0.15 ± 0.00	3.20 ± 0.00	Negativo
T5	16.00 ± 1.00	0.16 ± 0.01	1.00 ± 0.00	Negativo
	10.33 ± 0.58	0.10 ± 0.01	1.00 ± 0.00	Negativo
T6	13.00 ± 0.00	0.13 ± 0.00	3.25 ± 0.07	Negativo
	10.67 ± 1.15	0.11 ± 0.01	3.40 ± 0.14	Negativo

Cuadro 6. Conteo de hongos y levaduras y cuenta microbiana total de la leche utilizada como materia prima en la elaboración de queso tipo panela en cada uno de los tratamientos del diseño experimental y su réplica.

Tratamiento	Cuenta de Hongos y Levaduras (UFC/g)	Cuenta Microbiana Total (UFC/g)
T1	ND	81000
	20	45900
T2	ND	16380
	ND	45000
T3	10	41400
	10	1800
T4	ND	1800
	ND	28800
T5	ND	28800
	10	1440
T6	ND	1620
	20	1800

Cuadro 7. Actividad de nisina y población de *L. lactis* UQ2 rif L+ en leche suplementada (3ª activación) que se utilizó como inóculo en queso tipo panela para cada tratamiento y su réplica*.

Tratamiento	Actividad de nisina (UI/mL)	Población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ (Log UFC/g)
T3	9.62 ± 1.66	9.13
	14.51 ± 0.27	8.93
T4	10.99 ± 0.28	9.02
	10.60 ± 0.38	9.19
T5	12.56 ± 0.83	9.19
	7.46 ± 0.28	9.15
T6	7.86 ± 0.25	9.15
	9.23 ± 0.55	9.16

*No se incluyen datos de los tratamientos 1 y 2, ya que son controles no inoculados

Para monitorear la calidad microbiológica de la leche, se realizó conteo de hongos y levaduras así como la cuenta microbiana total. Los resultados se muestran en el Cuadro 6.

Se determinó la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ y la actividad de nisina producida en la leche suplementada de la tercera resiembra de la activación de la cepa que se utilizó como inóculo durante la elaboración del queso tipo panela después de 6 h de incubación a 30 °C, los resultados se pueden observar en el Cuadro 7.

En todos los casos, la leche se considero apta para su uso como materia prima en la elaboración del producto ya que cumplió con las especificaciones de la NOM-243-SSA1-2010.

7.4 Población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺

La población del *L. lactis* UQ2 rif L⁺ se determinó para los tratamientos inoculados 3, 4, 5 y 6 durante su almacenamiento en refrigeración a los 0, 7, 14 y 21 días. En la Figura 10, se puede observar el comportamiento de la población del inóculo a través del tiempo. Para evaluar el efecto de los factores evaluados, nivel de grasa y población inoculada, se realizó un análisis estadístico para cada tiempo evaluado. Se observó que para el día 0, los factores evaluados no resultan estadísticamente significativos (Cuadro 8), pero existe un efecto de interacción por el cual se puede observar que a menor nivel de grasa (1.0%) y menor nivel de inóculo (1×10^6 UFC/mL), la población es mayor (Figura 11). Para el día 7 de almacenamiento, el factor nivel de inóculo resultó estadísticamente significativo para la variable respuesta (Cuadro 9), observándose un efecto de interacción que muestra que un nivel de grasa mayor (3.5%) y alto nivel de inóculo (1×10^7 UFC/mL), se obtiene una respuesta mayor (Figura 12). Al día 14 de almacenamiento, se observa que ninguno de los factores resultó estadísticamente significativo (Cuadro 10) y se observa el mismo comportamiento que para el día 0, 7 y 21. Al día 21 se observa que el factor nivel de inóculo tiene un efecto estadísticamente significativo (Cuadro 11).

En general, los cuatro tratamientos que tienen un crecimiento exponencial a través del tiempo siendo el tratamiento 4 el que mostró mayor desarrollo con una población máxima de 9.29 ± 0.01 Log UFC/g a los 21 días de almacenamiento. Dado el comportamiento de la población que se observa en la Figura 10, se sugiere que después de 14 días, la cepa inoculada entra en fase estacionaria.

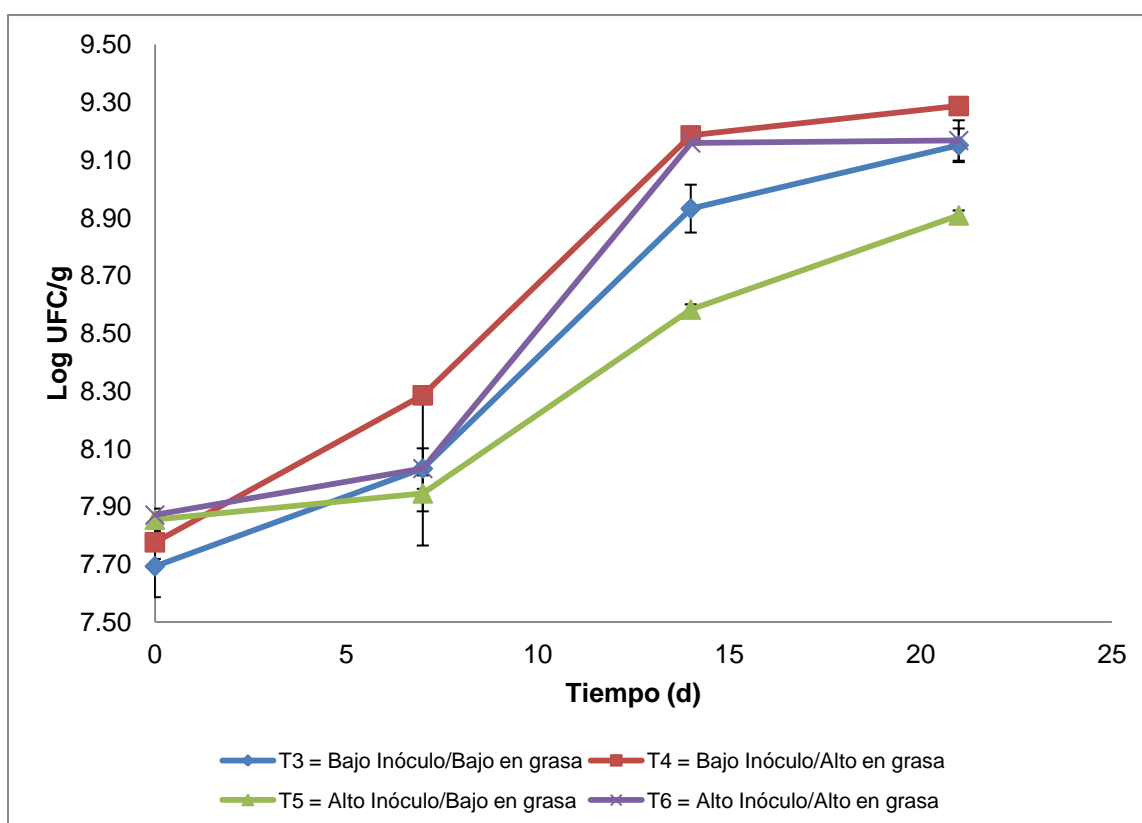


Figura 10. Comportamiento de la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ en quesos inoculados almacenados a 4°C a través del tiempo.

Cuadro 8. Análisis estadístico ANOVA para la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ a los 0 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	3.91	2.49	1.57	0.15
Inóculo	4.41	2.51	1.76	0.11
Grasa	-0.15	0.90	-0.17	0.87
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.73	2.01	-0.37	0.72

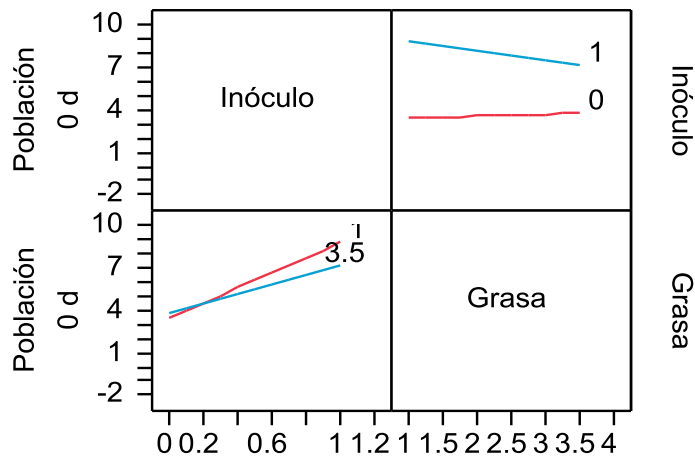


Figura 11. Gráfico de interacción para la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ a los 0 días de almacenamiento a 4°C

Cuadro 9. Análisis estadístico ANOVA para la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ a los 7 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	3.84	2.15	1.78	0.11
Inóculo	5.76	2.16	2.67	0.02*
Grasa	-0.31	0.77	-0.39	0.70
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.51	1.73	-0.29	0.77

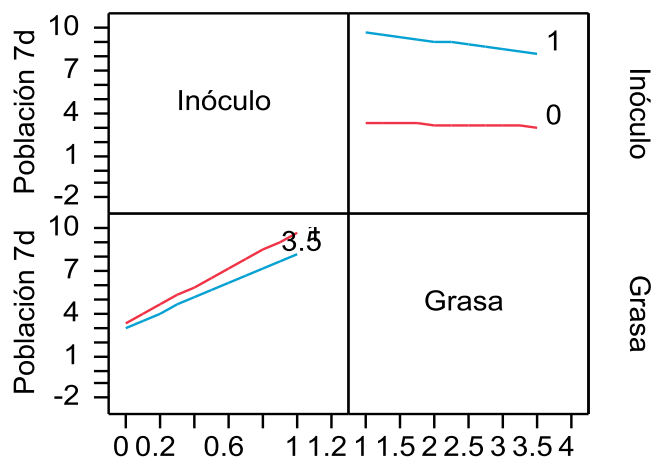


Figura 12. Gráfico de interacción para la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ a los 7 días de almacenamiento a 4°C

Cuadro 10. Análisis estadístico ANOVA para la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ a los 14 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	3.87	2.39	1.62	0.14
Inóculo	4.41	2.40	1.84	0.10
Grasa	-0.17	0.86	-0.20	0.84
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.032	1.92	-0.02	0.98

Cuadro 11. Análisis estadístico ANOVA para la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ a los 21 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intercept	3.10	2.01	1.54	0.16
Inóculo	5.04	2.02	2.50	0.04*
Grasa	-0.07	0.72	-0.10	0.92
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.20	1.61	-0.13	0.90

Ochoa (2011), reportó una población máxima de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ en queso tipo panela de 8.48 Log UFC/g el día 14 de almacenamiento. Pero observó que esta población ocasionaba deterioro en el producto por una rápida acidificación y pérdida de textura. En 2001, Martínez-Cuesta *et. al.*, observaron una población de 8.42 Log UFC/g después de 42 días de almacenamiento de *L. lactis* IFPL359 sin observar efectos negativos en las características del producto. Éste comportamiento se debe a que durante la primera fase o fase de adaptación, los aminoácidos son utilizados como fuente de nitrógeno y posteriormente el microorganismo recurre a las caseínas como fuente de aminoácidos y es en esta etapa, cuando se estabiliza el crecimiento y se inicia la fase estacionaria (Yvon, *et. Al.*, 2011).

7.5 Determinación de actividad de nisina

La actividad de nisina se cuantificó a través del tiempo y durante 21 días para los tratamientos inoculados con el cultivo protector que corresponden a los tratamientos 3, 4, 5 y 6.

En la Figura 13 se observa el comportamiento de la actividad de nisina a través del tiempo. Se puede observar que todos los tratamientos muestran una tendencia a incrementar a través del tiempo, sin embargo, los factores evaluados no resultan estadísticamente significativos para los tiempos de almacenamiento evaluados (Cuadros 12-15), se observa que una combinación de un mayor nivel de grasa y mayor nivel de inóculo favorecen una mayor respuesta, mientras que aún teniendo un alto nivel de inóculo, si se disminuye la grasa, se observa una disminución en la respuesta, actividad de nisina.

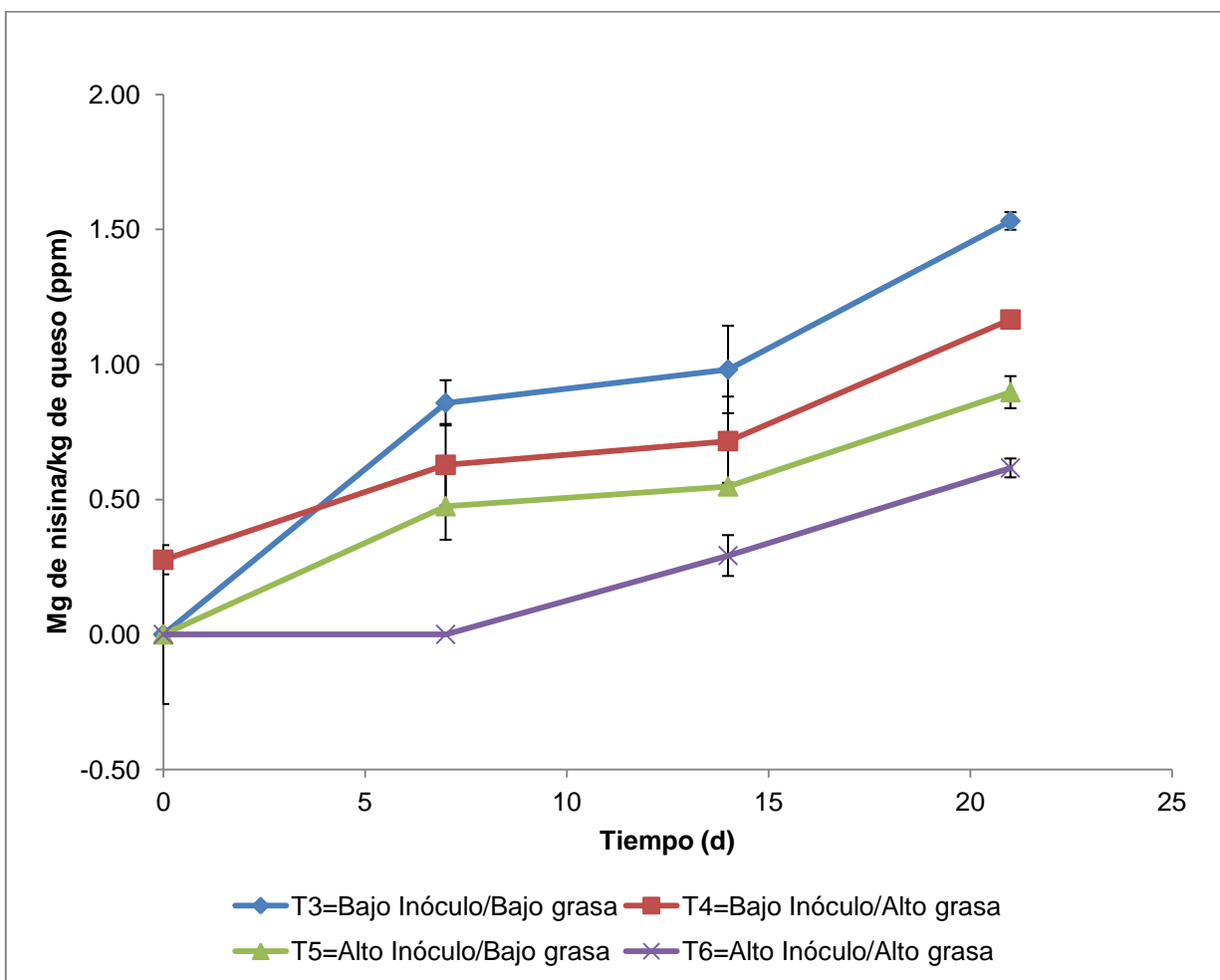


Figura 13. Comportamiento de la actividad de nisina en quesos inoculados almacenados a 4°C a través del tiempo.

Para todos los casos el máximo valor encontrado fue el día 21 de almacenamiento y teniendo el mayor valor para el tratamiento con bajo nivel de

inóculo y bajo nivel de grasa, con un título de 1.53 ± 0.03 mg de nisina/kg de queso equivalente a $61.2 \pm$ UI/g de queso.

Cuadro 12. Análisis estadístico ANOVA para la actividad de nisina a los 0 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	0.06	0.04	1.38	0.21
Inóculo	-0.02	0.04	-0.55	0.59
Grasa	-0.01	0.02	-0.93	0.38
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	0.02	0.03	0.55	0.59

Cuadro 13. Análisis estadístico ANOVA para la actividad de nisina a los 7 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	4.98	2.16	2.31	0.05*
Inóculo	-2.00	2.17	-0.92	0.38
Grasa	-1.13	0.78	-1.45	0.18
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	1.30	1.73	0.75	0.47

Cuadro 14. Análisis estadístico ANOVA para la actividad de nisina a los 14 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	5.25	2.33	2.25	0.05
Inóculo	-1.64	2.34	-0.70	0.50
Grasa	-1.18	0.84	-1.40	0.19
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	1.69	1.87	0.90	0.39

Cuadro 15. Análisis estadístico ANOVA para la actividad de nisina a los 21 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	5.01	2.70	1.86	0.10
Inóculo	-0.45	2.71	-0.17	0.87
Grasa	-0.96	0.97	-0.98	0.35
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	3.21	2.17	1.48	0.17

En el estudio realizado por Ochoa en 2011, se observaron títulos de actividad de nisina de hasta 1836.8 UI/g sobrepasando el límite máximo establecido en la NOM-243-SSA1-2010 hasta 3.6 veces, con lo cual, podemos concluir que los valores de actividad encontrados en éste trabajo se encuentran dentro de las especificaciones de la NOM-243-SSA1-2010, de 125 mg/Kg de queso.

Naidu (2010), recomienda una adición entre 0.5-1.5 mg de nisina/kg que resultan suficientes para detener o suprimir desarrollo de microorganismos deterioradores y patógenos. Con lo cual, el valor máximo encontrado en el queso correspondiente al tratamiento 3 (bajo inóculo, bajo grasa) se encuentra dentro de los parámetros establecidos para la protección del producto.

La adición del cultivo protector permite la síntesis de la bacteriocina favoreciendo la inocuidad del producto reduciendo así el riesgo microbiano atribuido a éste tipo de productos frescos.

7.6 Parámetros microbiológicos

Como microorganismos indicadores se hicieron cuentas en placa de hongos y levaduras y cuenta bacteriana total.

Los resultados de la cuenta total se observan en la Figura 14, se puede observar que los tratamientos 1 y 2, correspondientes a los controles no inoculados, con nivel de grasa bajo (1.0%) y alto (3.5%) respectivamente tuvieron durante todo el tiempo de almacenamiento cuentas menores a las de los tratamientos 3-6 que correspondieron a los tratamientos inoculados, con lo cual se puede observar que el inóculo contribuyó a la población microbiana total.

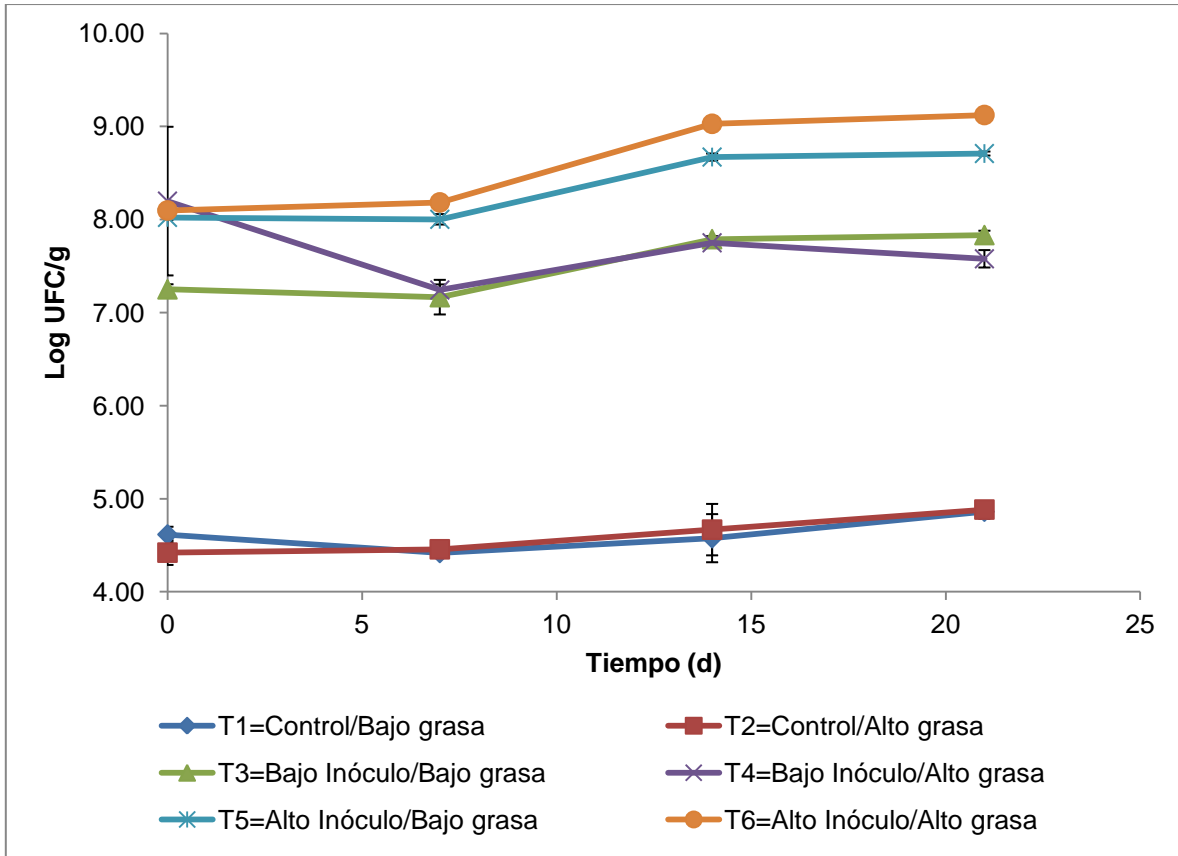


Figura 14. Cuenta bacteriana total en quesos almacenados a 4°C a través del tiempo.

El análisis estadístico para cada uno de los tiempos de almacenamiento evaluados, demostró que no existe efecto significativo de los factores evaluados (Cuadros 16-19), los efectos de interacción no resultan significativos pero muestran que un mayor nivel de grasa combinado un mayor nivel de inóculo, permiten obtener un mayor nivel de población a los 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento.

Cuadro 16. Análisis estadístico ANOVA para la cuenta bacteriana total a los 0 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	7.72	1.01	7.58	<.0001*
Inóculo	1.73	1.02	1.69	0.12
Grasa	-0.34	0.36	-0.95	0.37
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.62	0.81	-0.76	0.47

Cuadro 17. Análisis estadístico ANOVA para la cuenta bacteriana total a los 7 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	7.49	0.91	8.24	<.0001*
Inóculo	1.13	0.91	1.25	0.24
Grasa	-0.22	0.33	-0.69	0.51
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.76	0.73	-1.05	0.32

Cuadro 18. Análisis estadístico ANOVA para la cuenta bacteriana total a los 14 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	7.61	1.18	6.43	0.0002*
Inóculo	2.13	1.18	1.80	0.11
Grasa	-0.16	0.42	-0.39	0.70
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.54	0.95	-0.57	0.58

Cuadro 19. Análisis estadístico ANOVA para la cuenta bacteriana total a los 21 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	7.64	1.40	5.44	0.0006*
Inóculo	2.28	1.41	1.62	0.14
Grasa	-0.07	0.51	-0.14	0.89
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.05	1.13	-0.05	0.96

Cuadro 20. Cuenta de Hongos y Levaduras para los quesos almacenados a 4°C a través del tiempo

Tiempo (días)	Control/ Bajo grasa	Control/ Alto grasa	Bajo Inóculo/ Baja grasa	Bajo Inóculo/ Alto grasa	Alto Inóculo/ Bajo grasa	Alto Inóculo/ Alto grasa
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	225 ± 59	45±13	45±25	135±63	45±13	45±13
14	90 ± 0	225±95	45±25	135±31	45±13	45±13
21	180 ± 63	90±0	45±13	90±0	90±63	90±0

Para la cuenta de hongos y levaduras de todos los tratamientos se pueden observar los resultados en el Cuadro 20. En todos los casos, el producto se encontró dentro del límite establecido en la NOM-243-SSA1-2010 de 500 UFC/g.

La adición del cultivo protector favorece la protección microbiana del queso observándose cuentas más bajas para los productos inoculados que para los no inoculados tal como lo reportó Ochoa (2011), donde observó que para productos inoculados con el cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L⁺ se observaban cuentas menores de hongos y levaduras y coliformes fecales que para productos no inoculados incluso en el caso de queso elaborado con leche no pasteurizada. Solo en el caso de producto elaborado con leche no pasteurizada y no adicionado del cultivo protector, Ochoa (2011), observó que la cuenta de hongos y levaduras sobrepasó el límite establecido en la NOM, con cuentas de 540 a 590 UFC/g.

7.7 Acidez

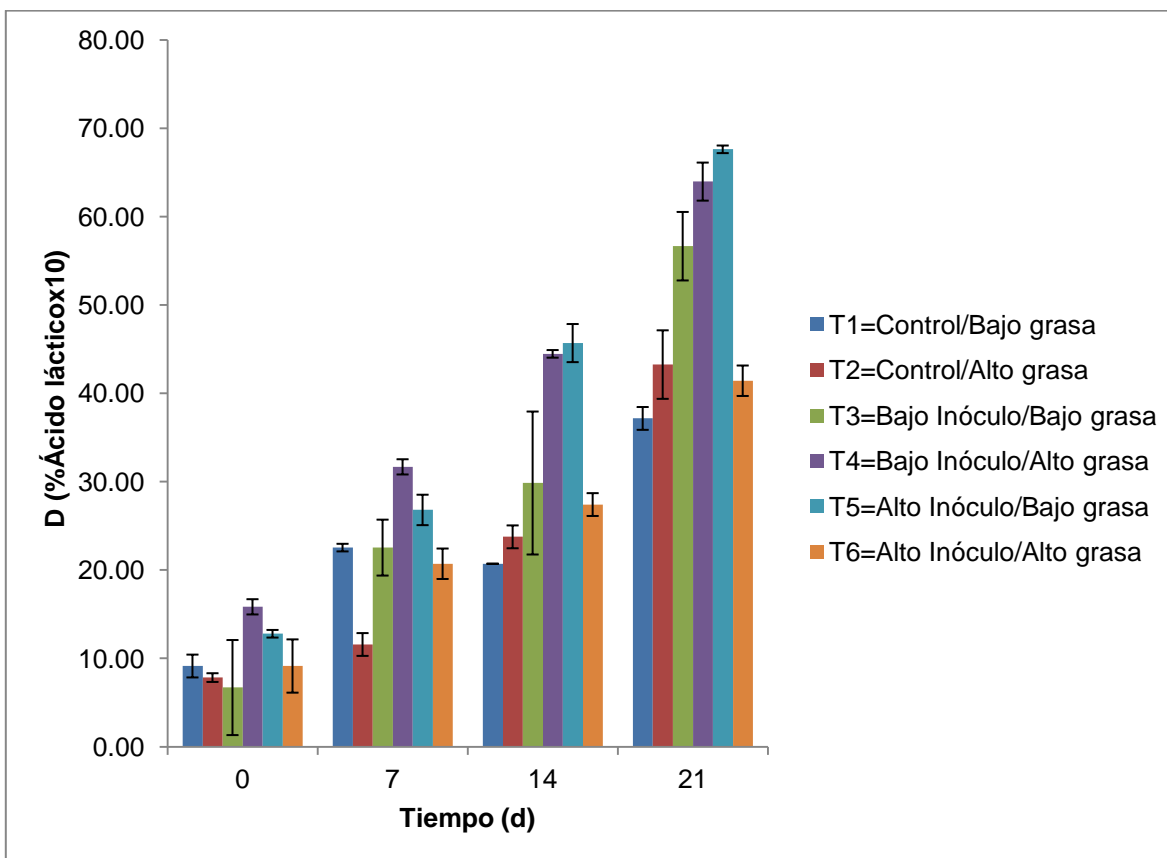


Figura 15. Acidez titulable en quesos almacenados a 4°C a través del tiempo.

Los resultados de la acidez de los diferentes tratamientos se pueden observar en la Figura 15. En todos los casos, la acidez tuvo un valor en incremento a través del tiempo de almacenamiento, observándose en todos los casos el valor máximo a los 21 días.

El análisis estadístico mostró que los factores evaluados no tienen un efecto significativo sobre la variable respuesta a los diferentes tiempos evaluados (Cuadros 21-24), las interacciones muestran que el efecto de una combinación de mayor nivel de grasa y un mayor nivel de inóculo permiten obtener menores valores de acidez, mientras que un menor nivel de grasa o inóculo afectan la respuesta generando valores mayores de acidez, lo cual es indeseable para la aceptación sensorial del producto.

Cuadro 21. Análisis estadístico ANOVA para la acidez a los 0 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	9.31	2.78	3.35	0.0101*
Inóculo	4.78	2.79	1.71	0.12
Grasa	-0.30	1.01	-0.31	0.76
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	1.20	2.23	0.54	0.60

Cuadro 22. Análisis estadístico ANOVA para la acidez a los 7 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	30.77	7.06	4.36	0.0024*
Inóculo	2.46	7.09	0.35	0.73
Grasa	-4.06	2.55	-1.59	0.15
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	2.98	5.67	0.53	0.61

Cuadro 23. Análisis estadístico ANOVA para la acidez a los 14 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	34.60	10.78	3.21	0.0125*
Inóculo	-1.00	10.83	-0.09	0.92
Grasa	-0.32	3.89	-0.08	0.93
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-7.12	8.66	-0.82	0.43

Cuadro 24. Análisis estadístico ANOVA para la acidez a los 21 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	52.92	7.33	7.21	<.0001*
Inóculo	-12.11	7.36	-1.64	0.13
Grasa	1.52	2.64	0.58	0.58
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-6.26	5.89	-1.06	0.31

Se obtuvo un valor máximo de 67.62 ± 0.43 °D equivalente a 0.67 ± 0.004 % de ácido láctico para el tratamiento 5 al día 21 de almacenamiento. Otros autores como Barbaros *et. al.*, 2011 encontraron valores de acidez de 0.77% de ácido láctico en queso artesanal inoculado con tres cepas de *L. lactis* después de 30 días de almacenamiento. Ayad (2011), encontró valores de 0.41-0.75% de ácido láctico en queso artesanal almacenado durante treinta días. Con éstos datos se observan mayores valores de acidez que los encontrados en éste trabajo, con lo cual se puede concluir que los rangos de acidez encontrados en éste estudio no se ven afectados por la adición del inóculo.

7.8 Contenido de Proteína y Grasa

En el Cuadro 25, se observan los resultados del contenido de proteína y grasa para cada tratamiento.

El contenido de proteína se analizó mediante una prueba de Tuckey ($p > 0.001$) observándose que no existe diferencia significativa entre los tratamientos de acuerdo al software estadístico, aún cuando entre el tratamiento 3 y 4 se observa una diferencia cercana al 40%.

En lo que se refiere al contenido de grasa, también se ejecuto una comparación de medias de Tuckey observándose que los tratamientos 1, 3 y 5 muestran diferencia estadística con los tratamientos 2, 4 y 6, como era de esperarse dado que se partió de leche descremada y leche entera respectivamente.

Cuadro 25. Contenido de proteína y grasa en cada tratamiento

Tratamiento	% Proteína	% Grasa
T1	24.52 ^a	14.16 ^b
T2	23.44 ^a	22.80 ^c
T3	27.47 ^a	16.54 ^b
T4	17.31 ^a	23.36 ^c
T5	25.35 ^a	13.40 ^b
T6	19.24 ^a	21.17 ^c

*Letras diferentes indican diferencia estadística significativa mediante prueba de tuckey ($p > 0.001$).

7.9 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial arrojó dos series de datos, los datos que corresponden al atributo “sabor” a los diferentes tiempos y los que corresponden al atributo “textura” a los diferentes tiempos de almacenamiento.

Los resultados para la mediana de la calificación del atributo “sabor” se pueden observar en la Figura 16, donde se observa que en todos los tiempos, los quesos correspondientes a los tratamientos 2, 4 y 6 (tratamientos altos en grasa) obtuvieron mejores calificaciones que su análogo bajo en grasa para cada nivel de inóculo. El tratamiento mejor calificado a todos los tiempos fue el tratamiento 6, que correspondió al queso con alto nivel de inóculo y alto nivel de grasa, sin embargo, éste tuvo un decaimiento en su calificación para el día 21. El tratamiento 5, aún cuando no fue el mejor calificado en ninguno de los tiempos evaluados, fue el único que tuvo un incremento en su calificación a través del tiempo.

El análisis estadístico muestra que para el día 7 y 14, ambos factores, nivel de grasa y nivel de inóculo y la interacción de ambos, tienen un efecto significativo sobre la aceptación del sabor del queso (Cuadros 26 y 27), mientras que para el día 21, solo el nivel de grasa resultó estadísticamente significativo (Cuadro 28). Los gráficos de interacción para los días 7 y 14, muestran que un alto nivel de grasa y alto nivel de inóculo, tienen un efecto positivo sobre la aceptación (Figuras

17 y 18), mientras que para el día 21, un mayor nivel de grasa y mayor nivel de inóculo bajan la aceptación de éste atributo (Figura 19).

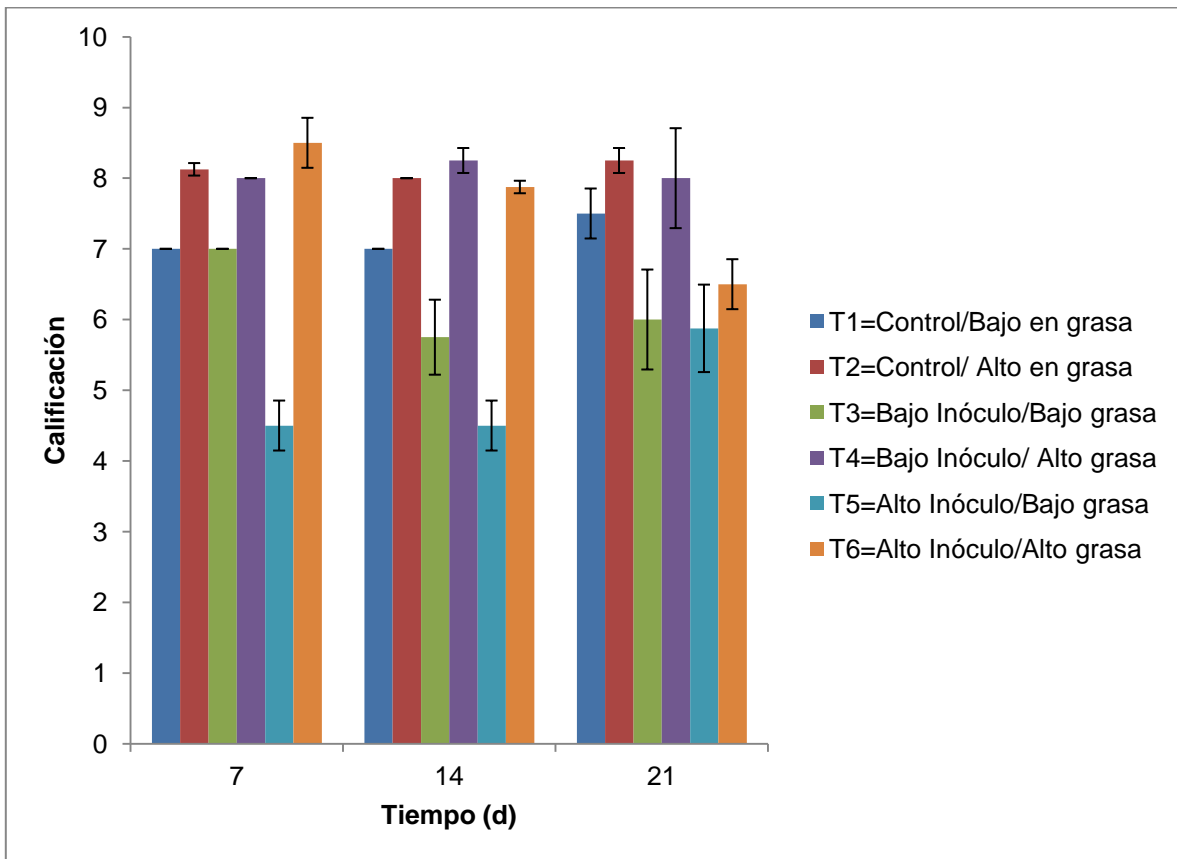


Figura 16. Calificaciones para el atributo sabor en los quesos almacenados a 4°C a través del tiempo.

Según las observaciones realizadas por el panel de consumidores que evaluaron el producto, en el caso del tratamiento 5 al día 21, no observaban un sabor esperado de un queso panela, sin embargo el producto mostraba notas de sabor agradables semejantes a las de un queso con mayor tiempo de maduración. En base a estas observaciones se puede decir que el tratamiento 5 corresponde a un producto con potencial para ser utilizado con fines de síntesis de sabor como un producto biotecnológico.

Las descripciones y recomendaciones de los consumidores dirigieron el tratamiento 4 como un producto con las características sensoriales esperadas en un queso tipo panela, por lo cual y dado que las medianas de su calificación

mostraron semejanzas a las del producto control alto en grasa (tratamiento 2) se puede considerar como un producto óptimo para el consumo directo.

Cuadro 26. Análisis estadístico ANOVA para el atributo sabor a los 7 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	5.66	0.29	19.31	<.0001*
Inóculo	-0.74	0.29	-2.51	0.0363*
Grasa	0.64	0.10	6.08	0.0003*
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	0.73	0.23	3.11	0.0144*

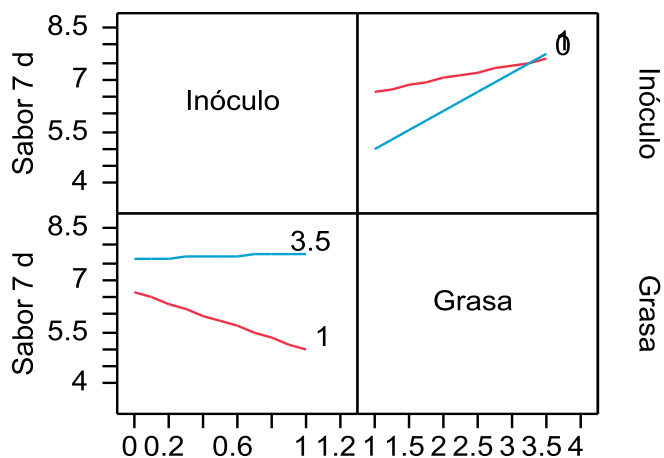


Figura 17. Gráfico de interacción para el atributo sabor a los 7 días de almacenamiento a 4°C

Cuadro 27. Análisis estadístico ANOVA para el atributo sabor a los 14 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	5.34	0.25	20.59	<.0001*
Inóculo	-0.87	0.26	-3.36	0.0100*
Grasa	0.67	0.09	7.19	<.0001*
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	0.65	0.21	3.12	0.0143*

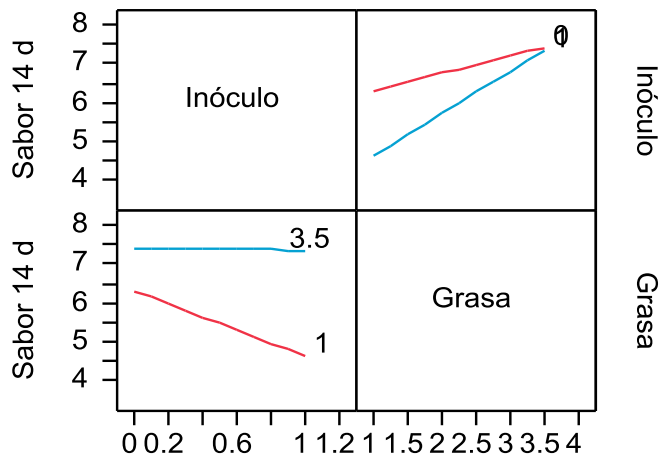


Figura 18. Gráfico de interacción para el atributo sabor a los 14 días de almacenamiento a 4°C

Cuadro 28. Análisis estadístico ANOVA para el atributo sabor a los 21 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	5.71	0.52	11.02	<.0001*
Inóculo	-1.07	0.52	-2.06	0.07
Grasa	0.52	0.18	2.78	0.0238*
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.41	0.42	-1.00	0.34

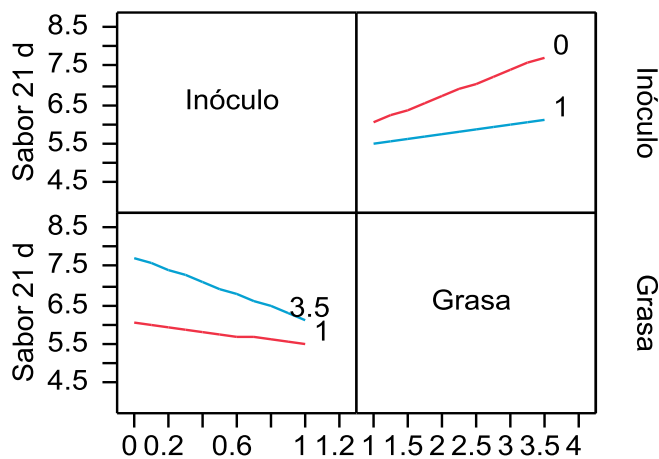


Figura 19. Gráfico de interacción para el atributo sabor a los 21 días de almacenamiento a 4°C

Los resultados para las medianas de las calificaciones del atributo “textura” se pueden observar en la Figura 20, los productos mejor calificados fueron aquellos con mayor nivel de grasa, correspondientes a los tratamientos 2, 4 y 6. Para los quesos elaborados con leche baja en grasa, se observó menor aceptación general tanto para tratamientos inoculados como para el control no inoculado. Los descriptores del panel sensorial, coincidieron en que los productos correspondientes a los tratamientos con mayor nivel de grasa (2, 4 y 6) mostraban una textura más suave e integrada, mientras que los quesos elaborados con leche baja en grasa mostraban textura fibrosa y seca, lo cual no resultaba agradable para el consumidor.

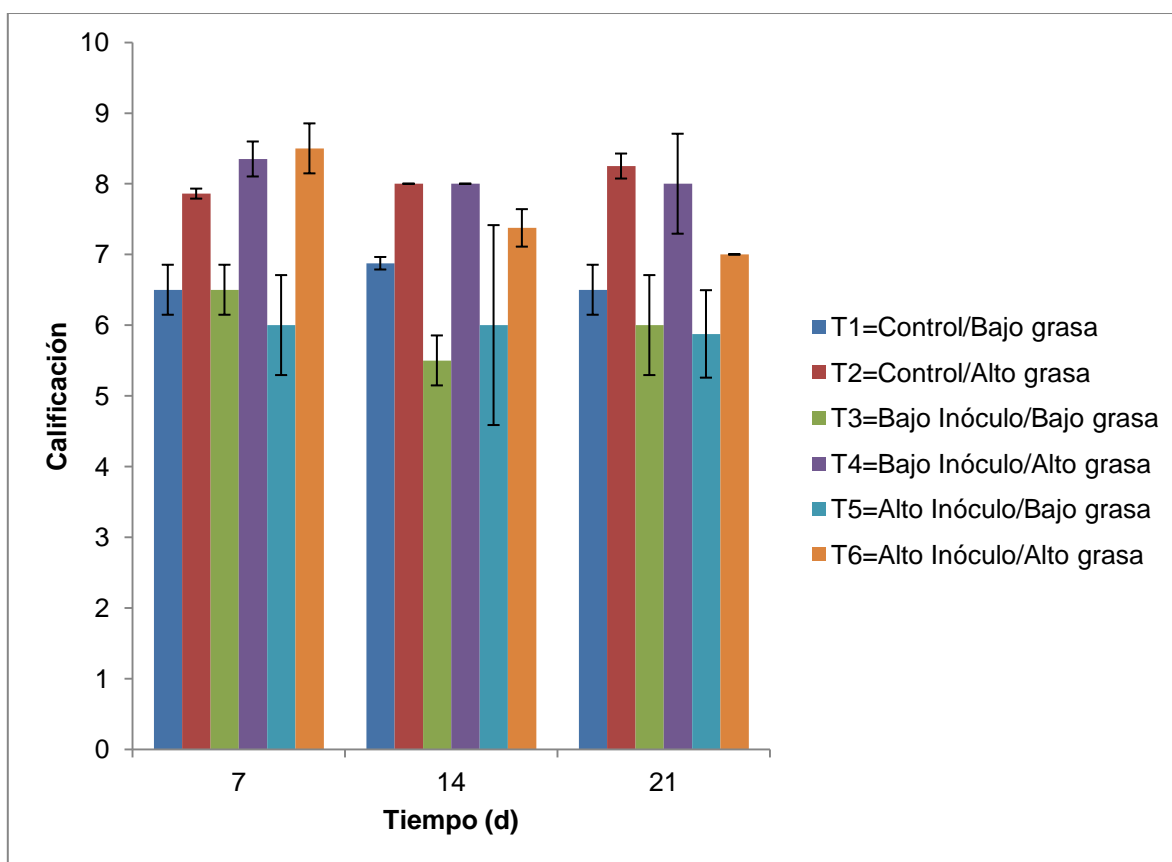


Figura 20. Calificaciones para el atributo textura en los quesos almacenados a 4°C a través del tiempo.

En el caso del tratamiento 4, se puede observar que en todos los tiempos evaluados, obtuvo calificaciones semejantes a las del control no inoculado también

elaborado con leche alta en grasa. Con éstos resultados y las calificaciones obtenidas para el “sabor” se sigue proponiendo a éste tratamiento como el más óptimo para consumo directo.

Los resultados del análisis estadístico, arrojaron que para todos los tiempos evaluados, 7, 14 y 21 días, el factor nivel de grasa resulto significativo sobre la variable respuesta (Cuadros 29-31), obteniendo una mejor aceptación cuando se usó leche con un mayor nivel de grasa, el nivel de inóculo no tuvo efecto significativo sobre la respuesta. Los efectos de interacción no resultan significativos, en general se observa que las combinaciones de mayores niveles de grasa y mayores niveles de inóculo favorecen una mayor aceptación para la textura.

Cuadro 29. Análisis estadístico ANOVA para el atributo textura a los 7 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	5.32	0.43	12.28	<.0001*
Inóculo	-0.10	0.43	-0.24	0.81
Grasa	0.73	0.15	4.66	0.0016*
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	0.11	0.34	0.32	0.76

Cuadro 30. Análisis estadístico ANOVA para el atributo textura a los 14 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	5.54	0.20	27.14	<.0001*
Inóculo	-0.42	0.20	-2.05	0.07
Grasa	0.58	0.07	7.84	<.0001*
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	0.03	0.16	0.20	0.84

Cuadro 31. Análisis estadístico ANOVA para el atributo textura a los 21 días de almacenamiento a 4°C

Factor	Valor Estimado	Error estándar	Valor F	Valor p
Intersección	5.77	0.43	13.43	<.0001*
Inóculo	-0.42	0.43	-0.98	0.35
Grasa	0.53	0.15	3.44	0.0088*
(Inóculo-0.36667)*(Grasa-2.25)	-0.66	0.34	-1.92	0.09

7.10 Determinación de compuestos volátiles

En lo que respecta a la síntesis y formación de compuestos de sabor se hicieron determinaciones a diferentes tiempos, 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento para todos los tratamientos. En las muestras analizadas y en base al trabajo de Ochoa (2011), se identificaron 37 compuestos, los cuales se enlistan en el Cuadro 15, así como las notas de sabor que han sido reportadas para éstos compuestos.

Con base en los compuestos identificados, se realizaron gráficos de componentes principales para cada tiempo evaluado con el fin de verificar el comportamiento del perfil y su influencia en las características del producto.

Cuadro 32. Compuestos volátiles identificados en el queso, no. de CAS y sus notas de aroma correspondientes.

Alcoholes		
3-metil-1-butanol	123-51-3	Herbáceo ^a , queso fresco ^b
Hexanol	111-27-3	Herbáceo, verde ^a
Fenil etanol	60-12-8	Rosas, floral ^c
2-metil-1-propanol	78-83-1	Plástico ^d
Cetonas		
2-heptanona	110-43-0	Queso azul, especias ^c
2-Pentanona	107-87-9	Frutal, acetona, dulce ^c floral ^a
2-Nonanona	821-55-6	Floral, frutal ^a
3-hidroxi-2-butanona	513-86-0	Mantequilla ^a
Ácidos		
Acido hexanoico	142-62-1	Pungente, amargo ^c
Ácido octanoico	124-07-2	Cabra, cera, frutal ^c , rancio ^e
Ácido n-decanoico	334-48-5	Rancio ^c , grasa ^a
Acido butanoico	107-92-6	Queso rancio ^e , fuerte ^a
Ácido acético	64-19-7	Vinagre ^e
Ácido dodecanoico	143-07-7	Grasa ^a
Aldehídos		
Hexanal	66-25-1	Verde, madera ^a , dulce ^e
Nonanal	124-19-6	Cítrico, verde ^a , floral ^e
Heptanal	111-71-7	Leche amarga, lácteo ^a

^aPanseri *et. al.*, 2008; ^bSmith *et. al.*, 2005; ^cLecanu *et. al.*, 2002; ^dOchoa, 2011;

^eCarunchia *et. al.*, 2005.

Cuadro 32. Compuestos volátiles identificados en el queso, no. de CAS y sus notas de aroma correspondientes (Continuación).

Aldehídos		
Benzaldehído	100-52-7	Dulce ^a
Acetaldehído	122-78-1	Almendra, nuez ^a
3-metil butanal	590-86-3	Grasa, mantequilla ^a
Ésteres		
Butirato de metilo	623-42-7	Fragante, dulce, etéreo ^a
Hexanoato de metilo	106-70-7	Piña, etéreo ^a
Hexanoato de etilo	123-66-0	Amargo ^a
Octanoato de metilo	111-11-5	Verde, frutal ^a
Nonanoato de metilo	1731-84-6	Vino, coco ^d
Isopropil miristato	110-27-0	-----
Tetradecanoato de metilo	124-10-7	Ceroso, jabonoso ^a
Meristolato de metilo	56219-06-8	-----
14-metil pentadecanoato de metilo	5129-60-2	-----
3-oxo-2-pentil-ácido ciclopentanoacético de metilo	24851-98-7	-----
Decanoato de metilo	110-42-9	Grasa, jabón, coco ^d
Undecanoato de metilo	1731-86-8	-----
Decanoato de etilo	110-38-3	Grasa ^a
Aromáticos		
Etilbenceno	100-41-4	Floral ^a
Hidrocarburos		
D-Limoneno	5989-27-5	Cítrico ^d
Lactonas		
δ -decalactona	705-86-2	Durazno ^e
Compuestos sulfurados		
Sulfuro de dimetilo	75-18-3	Vegetal, repollo ^c

^aPanseri *et. al.*, 2008; ^bSmith *et. al.*, 2005; ^cLecanu *et. al.*, 2002; ^dOchoa, 2011;

^eCarunchia *et. al.*, 2005.

Ochoa (2011), identificó 38 compuestos en queso panela inoculado con *L. lactis* UQ2 rif L⁺ como cultivo protector de los cuales, 2-undecanona, ácido heptanóico, laurato de metilo, ciclopropanato de metilo, 1,3-dimetil benceno, 1-etil-3-metil benceno no fueron encontrados en éste trabajo, en cambio, se encontraron otra serie de compuestos como ácido dodecanoico, 3-oxo-2-pentil-ácido ciclopentanoacético de metilo, sulfuro de dimetilo, hexanoato de etilo, isopropil miristato.

Como se observa en el Cuadro 32, la lista de compuestos identificados comprende 4 alcoholes, 4 cetonas, 6 ácidos, 6 aldehídos, 13 ésteres, 1 compuesto aromático, 1 hidrocarburo, 1 lactona y 1 compuesto sulfurado.

Los cuatro alcoholes identificados, 3-metil-1 butanol, hexanol, fenil etanol y 2-metil-1-propanol, fueron reportados por Ochoa (2011). Existen diversos mecanismos por los cuales se pueden sintetizar alcoholes como la degradación de la lactosa y reducción de metilcetonas. Se ha reportado el 3-metil butanol como un compuesto que se encuentra normalmente en el queso y en algunas variedades puede estar presente en cantidades elevadas, de hecho, éste compuesto se ha encontrado predominando en cultivos lácteos de algunas cepas de *L. lactis* (Centeno *et. al.*, 2002). La presencia de alcoholes metilados ha sido asociada con sabores producidos por ciertas cepas de *Lactococcus*, han sido identificados como compuestos clave del sabor de quesos artesanales y se ha sugerido que en balance con otros compuestos volátiles, contribuyen positivamente al sabor del queso (Morales *et. al.*, 2003). Proviene de la reducción de aldehídos por actividad de las deshidrogenasas bacterianas de BAL (Garde, *et. al.*, 2007).

Se identificaron cuatro cetonas: 2-heptanona, 2-nonanona, 2-pentanona y 3-hidroxi-2-butanona, todos reportados por Ochoa, 2011. Las metil cetonas como la 2-heptanona y 2-nonanona provienen de la β -oxidación de ácidos grasos libres y son considerados responsables del aroma característico de quesos como el Roquefort y Camembert. El diacetilo o 2,3-butanodiona un compuesto de aroma clave de la mantequilla y de algunas variedades de queso se descompone por reducción produciendo acetoina o 3-hidroxi-2-butanona y ha sido relacionada con el metabolismo del citrato (Garde *et. al.*, 2007).

Los seis ácidos orgánicos encontrados fueron ácido hexanoico, octanoico, decanoico, butanoico, acético y dodecanoico. Estos compuestos son importantes componentes de sabor en varios tipos de queso, provienen de la lipólisis de la grasa de la leche o de la degradación de algunos aminoácidos (Ochoa, 2011). El ácido butanoico es un componente importante de sabor en quesos como el Cheddar y se forma mediante lipólisis. El ácido acético se caracteriza por un típico

olor a vinagre, mientras que el ácido hexanoico tiene un aroma pungente y amargo, característico del queso azul (Carunchia *et. al.*, 2005). El ácido heptanoico y decanoico se caracterizan por aromas a rancidez de grasas, mientras que el ácido octanoico brinda un aroma semejante a la leche de cabra (Lecanu *et. al.*, 2002). Los ácidos juegan un papel importante en el sabor del queso por sí mismos y a través de la formación de ésteres mediante reacciones de esterificación (Garde *et. al.*, 2007).

Se identificaron seis aldehídos: hexanal, nonanal, heptanal, acetaldehído y 3-metil-butanal, todos reportados previamente por Ochoa, 2011. Algunos aldehídos provienen de aminoácidos de cadena ramificada como leucina, isoleucina y valina (Centeno *et. al.*, 2002). Su síntesis depende de la disponibilidad de los precursores (Morales *et. al.*, 2003). El tipo de cultivo influye la abundancia relativa de los aldehídos encontrados en productos lácteos. El acetaldehído es un compuesto relevante en el aroma de yogurt y algunas variedades de queso, se produce por bacterias ácido lácticas mediante dos vías, el metabolismo de la lactosa y la degradación de la treonina a glicina y acetaldehído mediante la treonina aldolasa. El 3-metil-butanal proviene de la leucina por transaminación o degradación de Strecker, este compuesto ha sido identificado como un potente odorante en quesos como Camembert, Cheddar y Gruyère, pero elevadas concentraciones de éste compuesto se relacionan a contaminaciones en queso Cheddar. Los aldehídos de cadena lineal como el hexanal, nonanal y decanal se forman durante la β -oxidación de ácidos grasos insaturados; se caracterizan por aromas herbaceos, pero se vuelven muy desagradables cuando sus concentraciones exceden ciertos niveles. El nonanal es relevante para el aroma de quesos como Mozzarella y Grana Padano (Garde *et. al.*, 2007). Durante la maduración del queso, los aminoácidos son liberados mediante proteólisis. Una vez que los aminoácidos se encuentran en su forma libre, su degradación ocurre fácilmente. Se han identificado diversas aminotransferasas de diversos grupos de bacterias ácidos lácticas, incluyendo cepas de *L. lactis* (Carunchia *et. al.*, 2005).

Trece ésteres fueron identificados: butirato de metilo, hexanoato de metilo, octanoato de metilo, nonanoato de metilo, decanoato de metilo, undecanoato de metilo, tetradecanoato de metilo, meristolato de metilo y 14-metil pentadecanoato de metilo, hexanoato de etilo y decanoato de etilo, 3-oxo-2-pentil-ácido ciclopentanoacético de metilo e isopropil miristato. La biosíntesis de ésteres de aroma en sistemas lácteos viene a través de dos mecanismos enzimáticos, la esterificación es una reacción en la cual, los ésteres se forman a partir de alcoholes y ácidos carboxílicos y la alcoholisis, una reacción de transferencia en la cual los derivados de grupos acilo de los acilgliceridos y acil-CoA son directamente transformados en alcoholes. La alcoholisis es el mecanismo mayoritario en la biosíntesis de ésteres por bacterias ácido lácticas y levaduras. Se ha atribuido un papel importante en el aroma de algunas variedades de queso a ésteres como el butanoato de etilo y hexanoato de etilo (Garde *et. al.*, 2007).

Se identificó un compuesto aromático, etilbenceno, ha sido reportado en otras variedades de queso en bajas concentraciones y brinda aromas alcohólico-florales, sin embargo, si se encuentra en elevadas concentraciones, puede generar sabores defectuosos y desagradables (Panseri *et. al.*, 2008). El D-limoneno, fue identificado también por Ochoa (2011), éste compuesto como otros hidrocarburos se ha asociado a aromas cítricos que conforman el balance de productos frescos y madurados.

La δ -lactona, proporciona notas afrutadas y cuenta con bajo umbral de percepción. Éste compuesto es clave en el aroma de quesos como el Camembert y Emmental (Ochoa, 2011).

Se encontró un compuesto sulfurado, el sulfuro de dimetilo. Se ha reportado que los compuestos sulfurados en queso, muestran una ruta de formación lenta consistente en la oxidación de metanotiol. En el proceso de maduración de algunos quesos como el Cheddar, envuelve, en parte la descomposición de aminoácidos azufrados como cisteína y metionina. Sin embargo, la contribución de los compuestos sulfurados al aroma del queso, no ha sido totalmente elucidada

pero se sabe que son compuestos que contribuyen ampliamente al balance del aroma de algunas variedades de queso (Burbank *et. al.*, 2008).

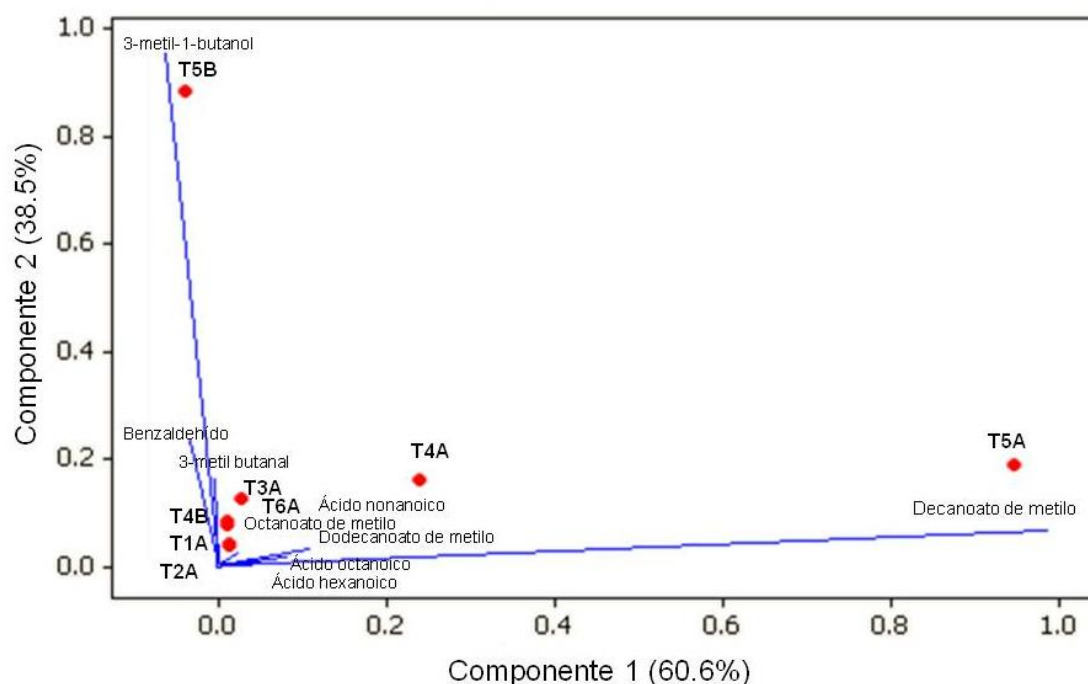


Figura 21. Análisis de componentes principales (APC), tendencia de los 37 compuestos identificados al día 0 para los diferentes tratamientos (donde A y B corresponden a la identificación de la réplica de los tratamientos).

Para verificar el comportamiento de los compuestos volátiles producidos, se realizó un análisis de componentes principales a los 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento. Para fin de éste análisis, las réplicas de cada tratamiento se analizaron por separado.

El análisis de componentes principales, permite encontrar las causas de variabilidad de un sistema y ordenarlas de acuerdo a su importancia generando una proyección en un sistema de coordenadas en el cual, la varianza del primer conjunto de datos se grafica en el primer eje (componente 1), la segunda varianza en el segundo eje (componente 2). Esta transformación lineal proviene de una matriz de correlaciones de los datos, y una base de vectores de la misma. Este análisis permite reducir la dimensionalidad de los datos reteniendo el grupo de datos que contribuyen más a la varianza (Guisande *et. al.*, 2006).

En la Figura 21, se observa el comportamiento de los 37 compuestos para el día 0 de almacenamiento para cada tratamiento y su réplica. Se observa que los principales compuestos que influyen en el aroma para el tratamiento 5 son el 3-metil-butanol y el decanoato de metilo (réplica B y A, respectivamente) observándose que los compuestos que tienen más importancia para el tratamiento 4 son algunos aldehídos como el 3-metil butanal y el benzaldehído. Ambos fueron los tratamientos seleccionados como los más importantes de acuerdo a los resultados obtenidos en las evaluaciones sensoriales. Al día 0 de almacenamiento no se esperaba una fuerte distinción entre tratamientos y se observa en el diagrama que el que tuvo mayor diferencia fue el tratamiento 5, réplica B, mismo que fue considerado como el mejor para su posterior desarrollo en un proceso biotecnológico.

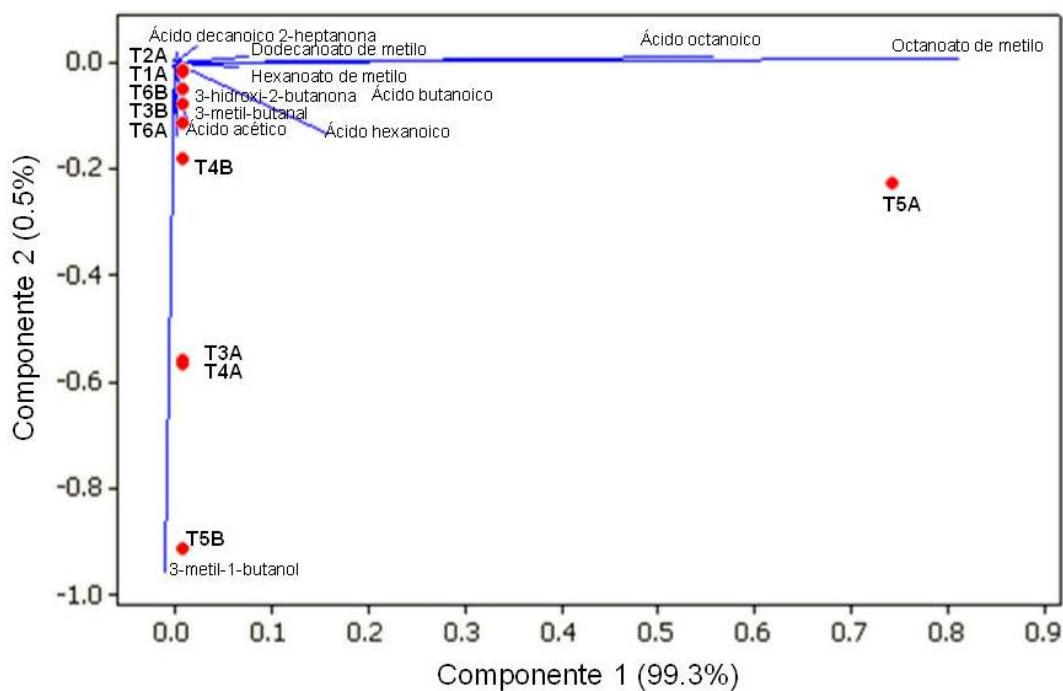


Figura 22. Análisis de componentes principales (APC), tendencia de los 37 compuestos identificados al día 7 para los diferentes tratamientos (donde A y B corresponden a la identificación de la réplica de los tratamientos).

En la Figura 22, se muestra el comportamiento de los compuestos identificados a los 7 días de almacenamiento, se observa, como al día 0, que el tratamiento 5 se separa en relación al resto de los tratamientos, en éste caso, la réplica A muestra un mayor desplazamiento ya que el componente uno tiene una varianza de 99.3 contra 0.5 del componente 2, con lo que un desplazamiento en el eje y no resulta tan significativo como un desplazamiento en el eje x. sin embargo, cabe resaltar, que también a los 7 días, el 3-metil-butanol mostró una concentración importante influyendo en el aroma del tratamiento 5 réplica B. Otros compuestos que resultaron de importancia fueron ésteres como el octanoato y hexanoato de metilo así como el ácido octanoico y decanoico. El tratamiento 4 tuvo mayor influencia por el 3-metil-butanol, compuesto que destaca por haber sido previamente reportado por su importancia en el balance del aroma de queso así como por provenir del metabolismo enzimático de *L. lactis* (Ochoa, 2011). Se puede decir que los ésteres como el octanoato de metilo brindan un sabor agradable del producto, o semejante al esperado en un queso fresco, comparando con el resultado de la evaluación sensorial, que tuvo una calificación semejante al control para el tratamiento 4 (ver figura 17). En cambio, el 3-metil-butanol puede favorecer la aceptación sensorial al ir en incremento como se observa para el tratamiento 5.

La Figura 23 muestra la tendencia de los compuestos, después de 14 días de almacenamiento, en éste caso, se observa que el tratamiento 4, tiene mayores concentraciones de 3-metil-butanol, el resto de los tratamientos están ubicados al centro del diagrama, con mayor influencia del componente 1 (x), el tratamiento 5 no muestra clara diferencia entre réplicas o contra los demás tratamientos, pero puede estar influido por ésteres como el octanoato de metilo y decanoato de metilo, tal y como se observó en el tiempo 0 (ver Figura 21). Se puede decir que un balance entre éstos ésteres y alcoholes favorece un incremento en la aceptación sensorial del producto como ocurre para el tratamiento 5 (ver Figura 17). Este balance sostiene la aceptación sensorial del tratamiento 4, que sin embargo, no muestra una tendencia semejante a la de su control (tratamiento 2)

pero si con el tratamiento 6 que corresponde a su análogo con alto nivel de inóculo.

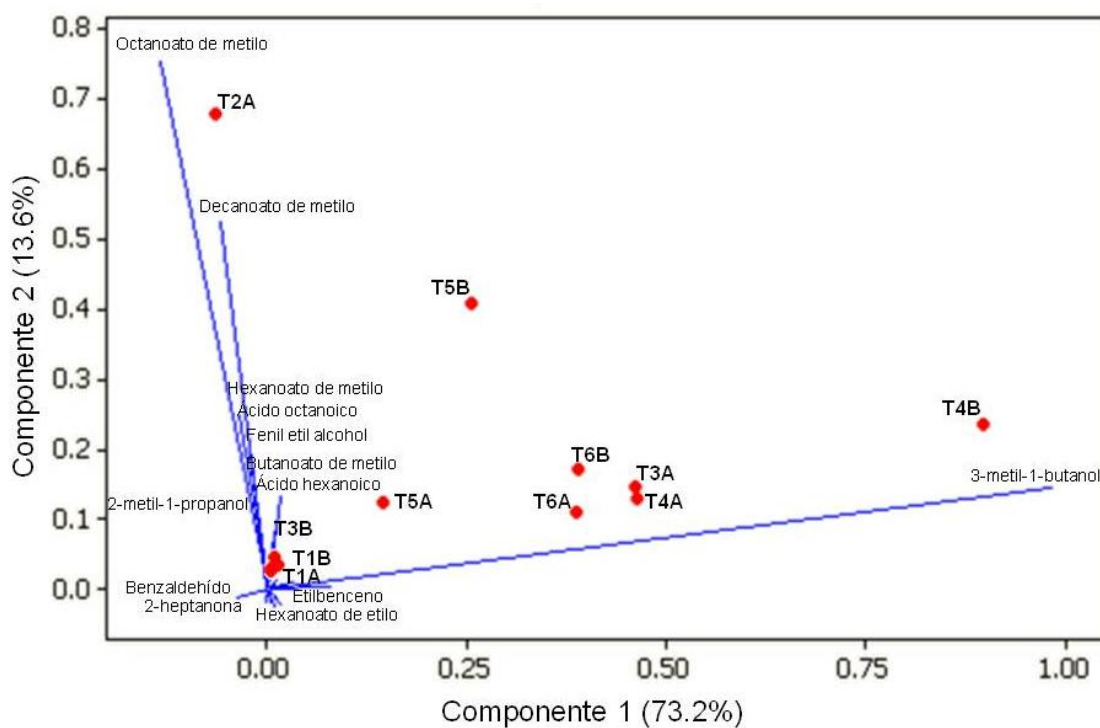


Figura 23. Análisis de componentes principales (APC), tendencia de los 37 compuestos identificados al día 14 para los diferentes tratamientos (donde A y B corresponden a la identificación de la réplica de los tratamientos).

La Figura 24, muestra el comportamiento de los compuestos volátiles a los 21 días de almacenamiento. Se observa que la tendencia sigue estando influida por ésteres como el octanoato, decanoato y hexanoato de metilo para el tratamiento 4 en sus dos réplicas y por el 3-metil butanol para el tratamiento 5 en sus dos réplicas. Con lo cual, se puede decir que éstos ésteres, junto con el 3-metil-butanol son parte importante del balance aromático del queso, además, todos ellos han sido reportados previamente como resultado del metabolismo del cultivo protector *L. lactis* (Ochoa, 2011).

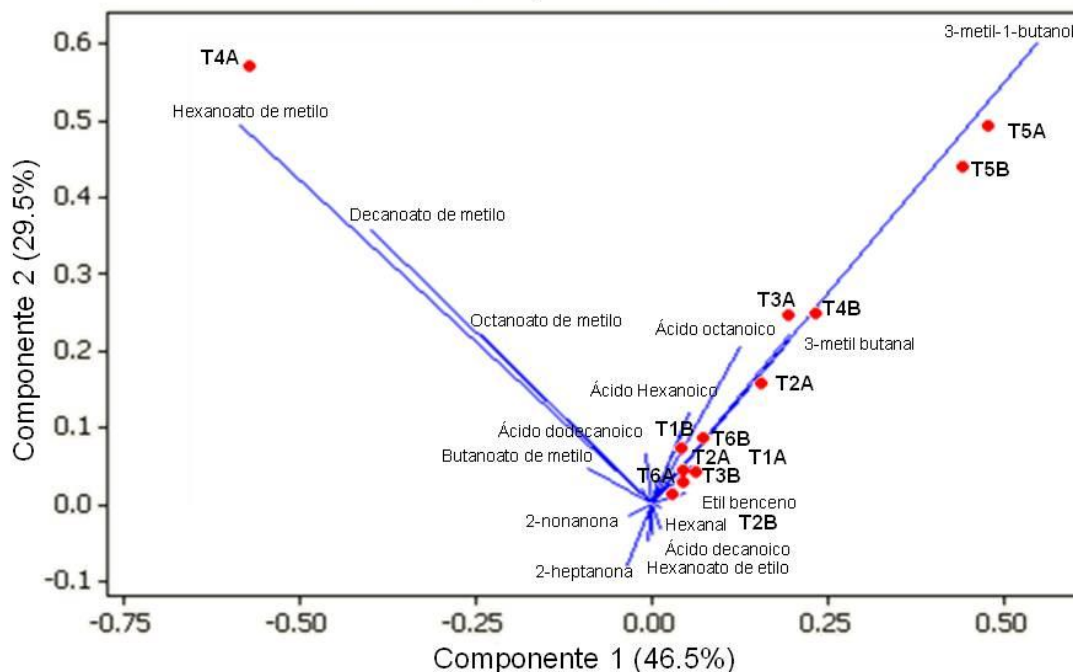


Figura 24. Análisis de componentes principales (APC), tendencia de los 37 compuestos identificados al día 21 para los diferentes tratamientos (donde A y B corresponden a la identificación de la réplica de los tratamientos).

7.11 Determinación del perfil proteolítico

Para elucidar el comportamiento del cultivo protector a través del tiempo en los quesos inoculados contra los quesos control, se realizó una electroforesis en gel Tris-glicina.

En la Figura 25 se observa con fines comparativos el perfil de dos geles de electroforesis Tris-glicina, para diferentes muestras de queso. En el carril 1 y 2 se observa el perfil del tratamiento 2 que consiste de un control no inoculado con nivel inicial de grasa alto al día 0 y 21 respectivamente, se observa una clara diferencia entre ambos tiempos, para el día 0, no se observa la presencia de ninguna banda por arriba de los 45 KDa, si no hasta aproximadamente los 27-25 KDa, lo que nos lleva a pensar que se trata de bandas correspondientes a caseínas como la α_1 , α_2 y β con pesos de 23, 25 y 23 KDa respectivamente (Badui, 2006). Para el día 21, se observa una banda muy clara aproximadamente

de 40 KDa, que pudiera asociarse a péptidos secretados por la flora nativa presente en el producto. En el carril 3 y 4, se observa la comparación entre el día 0 y 21 respectivamente para el tratamiento 5, que consiste de queso con alto nivel de inóculo y bajo nivel de grasa inicial. Al tiempo 0, se observa que hay una mayor carga de proteínas de alto peso molecular, que pudieran estar asociadas a las proteínas del suero, sin embargo, también se puede suponer, que la presencia del inóculo favoreció o permitió la secreción de éste tipo de proteínas, recordando que se tuvo un tiempo de preincubación durante de la elaboración, de 15 minutos, mismos que pudieron resultar favorables para la secreción de proteasas por parte del microorganismo. También pudo ocurrir dimerización de algunas proteínas, lo que no se observa en el carril 4, que corresponde al mismo tratamiento pero después de 21 días, donde las bandas comienzan a aparecer por debajo de 66 KDa, lo que indica que el microorganismo inoculado, además de la presencia de la flora nativa, favorecieron cierta proteólisis durante el tiempo de almacenamiento, dando lugar a proteínas de menor peso molecular. Esta proteólisis se ve reflejada en el sabor del producto ya que ciertos péptidos pequeños pueden generar amargor en el producto final (Sanchez-Ponte, 2003), lo que puede complementarse con el resultado de la evaluación sensorial para éste tratamiento, que a pesar de no tener las mejores evaluaciones, tuvo un incremento en su aceptación a través del tiempo. En los carriles 5 y 6 se observan los resultados para el tratamiento 6, día 0 y 21, respectivamente, en éste caso, se observa una distribución de las bandas con pesos moleculares menores para el día 21, lo cual nos indica que también existe un nivel de proteólisis asociado a la actividad del inóculo, sin embargo, para el día 0, en comparación con el resto de los tratamientos analizados, no se observan tan claramente las bandas de pesos moleculares altos, esto puede deberse a la presencia de la grasa en conjunto con el inóculo, ya que un mayor nivel de grasa, pudiera estar inhibiendo la secreción de ciertas proteasas asociadas al cultivo protector o a la flora nativa.

Se sabe que todas las caseínas tienen secciones con una hidrofobicidad alta que proviene de aminoácidos aromáticos lo que también puede estar afectando su

comportamiento en presencia de cierto niveles de grasa en el producto (Badui, 2006).

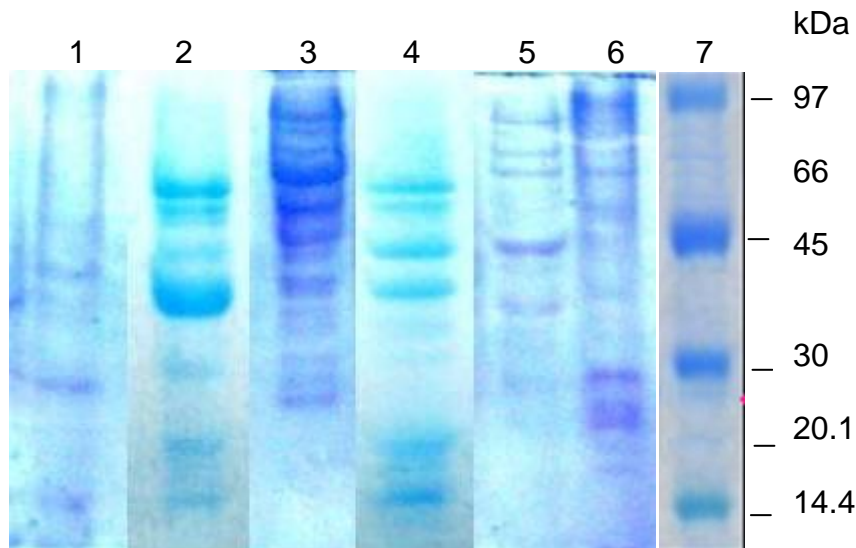


Figura 25. Gel de electroforesis Tris-glicina para muestras de queso tipo panela.

1. Tratamiento 2, día 0 (sin inóculo, 3.5% grasa) 2. Tratamiento 2, día 21 (sin inóculo, 3.5% grasa). 3. Tratamiento 5, día 0 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 1 % grasa). 4. Tratamiento 5, día 21 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 1 % grasa). 5. Tratamiento 6, día 0 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 3.5 % grasa). 6. Tratamiento 6, día 21 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 3.5 % grasa). 7. Marcador de bajo peso molecular (GE)

Dados los resultados encontrados en el gel Tris- glicina, en donde las bandas correspondientes a los péptidos de bajos pesos moleculares no se observan claramente, se procedió a realizar una electroforesis en sistema Tris-trisina que permite separar péptidos y proteínas de pesos menores a 15 KDa mejorando la resolución. Para muestras de queso control (tratamientos 1 y 2) a los 0 y 21 días de almacenamiento y para los quesos con alto nivel de inóculo (tratamientos 5 y 6) a los 0 y 21 días de almacenamiento. En la Figura 26, se observa que todos los tratamientos sufrieron proteólisis a través del tiempo, pero no se observan notables diferencias entre tratamientos. Se observa un claro desplazamiento de los péptidos en todos los casos por debajo de 26 kDa, con mayor abundancia entre 4 y 6 kDa.

Con este resultado se puede decir que el producto sufre una degradación proteica que puede provenir desde el momento de la coagulación, donde la κ -caseína es hidrolizada y separada del macropéptido (Alanis, 1979). Cuando los tratamientos se elaboraron con leche con un nivel menor de grasa, se observa una mayor actividad proteolítica que cuando hay más grasa. La mayor incidencia de las bandas, se observó para péptidos con pesos moleculares entre 6 y 14 KDa. El día 21, se dejan de observar bandas menores 6 KDa, esto puede deberse a que un contenido mayor de grasa dificulta la hidrólisis a pesos menores, independientemente de la cantidad inicial de inóculo.

Los tratamientos 5 y 6, fueron los que mostraron más cambios, se observa una hidrólisis más intensa, lo que concuerda con los resultados de acidez, ya que en ambos se observó una mayor acidez el día 21 que el resto de los tratamientos y también en el perfil de sabor, en el gel de la Figura 26, se observa que el tratamiento 5 sufrió una hidrólisis mayor a la del tratamiento 6 lo que es coincidente con que éste tratamiento fue el que tuvo mayor importancia en los perfiles de compuestos volátiles, a diferencia del tratamiento 6 que tuvo un comportamiento muy semejante a los tratamientos control, 1 y 2, se trata de productos con buena aceptación, pero que no mostraron comportamientos sobresalientes en los perfiles de compuestos volátiles (Figuras 21-24).

Se ha observado que existe una relación entre la intensidad de proteólisis con un sabor amargo en el queso, en éste caso, el tratamiento 5 mostró la formación de péptidos de menor bajo peso molecular (Figura 26), después de los 21 días de almacenamiento, lo que podría estar relacionado con un bajo nivel de aceptación, mismo que se observó en los resultados del análisis sensorial para éste tratamiento específico, los comentarios de los panelistas también señalaron que en éste tratamiento se observaban sabores más intensos con el paso del tiempo.

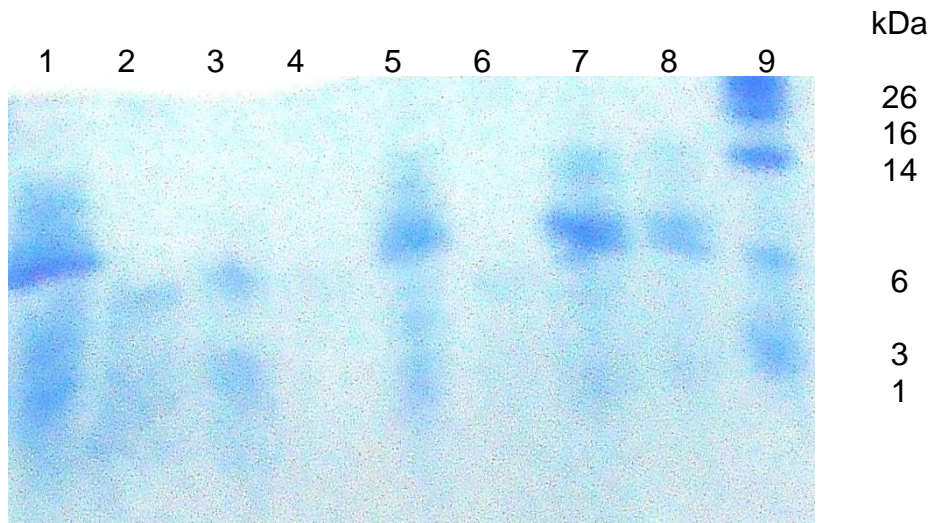


Figura 26. Electroforesis en gel Tris-trisina para las muestras de queso tipo panela. 1= Tratamiento 1 (sin inóculo, 1.0 % grasa), día 0; 2= Tratamiento 1 (sin inóculo, 1.0% grasa), día 21; 3 = Tratamiento 2 (sin inóculo, 3.5% grasa), día 0; 4= Tratamiento 2 (sin inóculo, 3.5% grasa), día 21; 5= Tratamiento 5 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 1 % grasa), día 0; 6= Tratamiento 5 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 1 % grasa), día 21; 7= Tratamiento 6 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 3.5 % grasa), día 0; 8= Tratamiento 6 (con inóculo 10^7 ufc/mL, 3.5 % grasa), día 21; 9=Marcador de PM (Biorad).

VIII. CONCLUSIONES

Los valores de actividad de nisina obtenidos para los seis tratamientos del diseño donde se evaluó el efecto del nivel de grasa inicial de la leche (de 1% y 3.5%) y el nivel de inóculo del cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L⁺ (10⁶ y 10⁷ UFC/mL) a través del tiempo a los 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 4°C, mostraron que los factores, el nivel inicial de grasa y el nivel inicial de inóculo, no tuvieron un efecto significativo. La mayor actividad se observó al día 21, de 61.2 UI/g de queso en el tratamiento 3 (1% grasa, 10⁶ UFC/mL de inóculo inicial). Todos los tratamientos se encuentran dentro del máximo permitido en la NOM-243-SSA1-2010, de 12.5 ppm.

Se observó que la población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ tuvo un crecimiento exponencial durante el almacenamiento después de evaluar los seis tratamientos a los 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 4°C, después del día 14 la población establece la fase estacionaria de desarrollo para todos los tratamientos. Los dos factores evaluados, tanto el nivel inicial de grasa como el nivel inicial de inóculo no resultaron significativos, observando mayor desarrollo para el tratamiento 4 (3.5% grasa, 10⁶ UFC/mL de inóculo inicial) con una población máxima de 9.29 Log UFC/g de queso a los 21 días de almacenamiento.

Las poblaciones de microorganismos indicadores, hongos y levaduras, se encontraron en niveles por debajo de 500 UFC/g permitido en la NOM-243-SSA1-2010.

Los resultados de la evaluación de la acidez en los seis tratamientos a los 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 4°C, permitieron observar que los factores de nivel de grasa e inóculo inicial no fueron significativos para éste parámetro. Los valores máximos de acidez se observaron para todos los tratamientos el día 21 de almacenamiento teniendo el máximo fue de 67°D para el tratamiento 5 (1% de grasa inicial y 10⁷ UFC/mL de inóculo inicial).

Las características sensoriales evaluadas a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento con paneles de 100 consumidores cada uno, mostraron que el nivel inicial de grasa determina la preferencia del consumidor para el sabor y textura del producto. Observándose que los tratamientos en los cuales se partió de leche con mayor contenido inicial de grasa (tratamientos 2, 4 y 6) tuvieron mayor preferencia del consumidor para los dos parámetros sensoriales evaluados. Para el atributo sabor, el tratamiento 4 (3.5% grasa y 10^7 UFC/mL inóculo) tuvo una aceptación de 80% en los tres tiempos evaluados y por tanto el que tiene más potencial como el mejor para el consumo directo. En el parámetro textura, el factor de nivel de grasa fue significativo estadísticamente, observándose que los tratamientos 2, 4 y 6 tuvieron más aceptación teniendo el máximo para el tratamiento 4 con una aceptación mayor al 80% en los tres tiempos evaluados.

La aceptación de los atributos textura y sabor para el tratamiento 5 (1.0% grasa y 10^7 UFC/mL inóculo), va en incremento a través del tiempo desde 40 hasta 60%, el análisis sensorial señaló mediante los comentarios de los panelistas que el sabor va intensificando de manera agradable, pero no se trataba del sabor esperado para un queso fresco, si no más parecido al de un queso madurado.

Las muestras correspondientes a los seis tratamientos y sus réplicas, fueron analizadas a los 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 4°C mediante la técnica de microextracción en fase sólida de espacio de cabeza donde se lograron identificar 37 compuestos volátiles. Mediante un análisis de componentes principales se pudo observar que los tratamientos 4 (3.5% grasa y 10^7 UFC/mL inóculo) y 5 (1.0% grasa y 10^7 UFC/mL inóculo) mostraron la presencia de compuestos producidos por *L. lactis*, entre los que se encuentran alcoholes como 3-metil butanol y ésteres como hexanoato, decanoato y octanoato de metilo.

La electroforesis en gel de las muestras de 0 y 21 días de almacenamiento a 4°C para los tratamientos 1(1.0% grasa, sin inóculo), 2 (3.5% grasa, sin inóculo), 5 (1.0 % grasa, 10^9 UFC/mL de inóculo) y 6 (3.5 % grasa, 10^9 UFC/mL de inóculo) permitió observar bandas de bajo peso molecular, por debajo de las caseínas de 26 kDa.

L. lactis UQ2 rif L⁺ es una cepa capaz de favorecer la bioconservación de un producto como el queso mediante la síntesis de nisina en la matriz del producto y además genera aromas y sabores muy específicos que influyen en su aceptación sensorial.

IX. LITERATURA CITADA

- Alais, C., 2003. Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera. Editorial Reverte S.A. de C.V. Barcelona, España. 755.
- Alegría, A., Delgado, S., Rocas, C., López, B., Mayo, B., 2010. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 143: 61-66.
- Ayad, E. H. E., Verheul, A., Engels, W. J. M., Wouters, J. T. M., Smit, G., 2001. Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus completion of a metabolic pathway. *J. Appl. Microbiol.* 90:59-67.
- Ayad, E.H.E., 2009. Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese. *Food Microbiology.* 26:533-541.
- Badui, S. 2006. Química de los alimentos. Ed. Pearson Educación S.A. de C.V. México. 4ª Ed. 716.
- Barbaros, O., Kirmaci, H.A., Hayaloglu, A.A., Akcelik, M., Akkoc, N., 2011. The effects of incorporating wild type strains of *Lactococcus lactis* into Turkish white-brined cheese (Beyaz peynir) on the fatty acid and volatile content. *Int. J. Dairy Tech.* 64: 494-501.
- Breukink, E., De Kruijff, B. 2006. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discovery.* 10.1038: 1-12.
- Burbank, H., Qian, M.C., 2008. Development of volatile sulfur compounds in heat-shocked pasteurized milk cheese. *Int. Dairy J.* 18: 811-818.
- Carunchia, M. E., Cadwallader, K. R., Drake, M., 2005. Characterization of aroma compounds responsible of the rosy/floral flavor in Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3126-3132.
- Centeno, J. A., Tomillo, E., Fernández-García, P., Nuñez, M., 2002. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of Ewe's raw milk cheese. *American Dairy Sci. Association.* 85: 3164-3172.
- De la Cruz, F., Davies, J., 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species lessons from bacteria. *Trends in Microbiol.* 8: 128-133.
- Delves-Broughton, J., Friis, M., 1998. Nisin preparations-production, specifications and assay procedures. *Bulletin Int. Dairy Fed.* 39: 18-19.
- Desmazeau, M.J.; Gripon, J.C., 1977. General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft.* 32: 731-734

- Fallico, V., McAuliffe, O., Fitzgerald, G. F., Hill, C., Ross, R. P., 2009. The presence of PMRC01 promotes greater cell permeability and autolysis in lactococcal starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 133: 217-224.
- Frost, L. S., 1992. Bacterial conjugation: everybody's doing it. *Can. J. Microbiol.* 38: 1091-1096.
- García-Almendárez, B. E., Cann, I. K. O., Martin, S. E., Guerrero, I., Regalado, C., 2008. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control.* 19: 670-680.
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., Martínez, B., 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Sci & Technol.* 21: 373-382.
- García-Parra, M. D., García-Almendárez, B. E., Guevara, R., Rodríguez, A., Martínez, B., Domínguez, J., Regalado, C., 2009. Effect of sub-inhibitory amounts of nisin and mineral salt on nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 in skim milk. *Food Bioprocess Technol.* DOI 10.1007/s11947-009-0287-7.
- Garde, S., Ávila, M., Fernández-García, E., Medina, M., Nuñez, M., 2007. Volatile compounds and aroma of Hispánico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 639 as an adjunct culture. *Int. Dairy J.* 17: 717-726.
- Gasson, M. J., 1983. Plasmid complements and *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lacti streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1-9.
- Grattepanche, F., Audet, P., Lacroix, C., 2007. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in fresh cheese model. *Int. Dairy J.* 17: 123-132.
- Guisande, C., Barreiro, A., Maneiro, E., Riveiro, I., Vergara, A.R., Vaanonde, A. 2006. Tratamiento de Datos. pp 356. Ediciones Díaz de Santos. España.
- Gujarathi, S. S., Bankar, S. B., Ananthanarayan, L. A., 2008. Fermentative production, purification and characterization of nisin. *Int. J. Food Eng.* 4: 1-21.
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, H., Gasson, M. J. 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* 228: 129-135.
- Hwan Lee, J., Diono, R., Yoo Kim, G., Min, D. B. 2003. Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of parmesan cheese. *J. Agric. Food Chem.* 51:1136-1140

- IDF. 2005. The world market for cheese 1995-2004. Bulletin no. 402. Brussels, Belgium: Int. Dairy Federation (IDF).
- Issanchou, S., Schlich, P., Lesschaeve, I., 1997. Sensory analysis: Methodological aspects relevant to the study of cheese. *Lait*. 77:5-12.
- Kim, W. S., Hall, R. J. Dunn, N., W. 1998. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol and Biotechnol*. 50: 429-433.
- Law, J.; Fitzgerald, G.F; Uniacke-Lowe, T.; Daly, C.; Fox, P.F., 1993. The contribution of lactococcal starter proteinases to proteolysis in Cheddar cheese. *J Dairy Sci*, 76: 2455-2467.
- Lecanu, L., Ducruet, V., Jouquand, C., Jacques, J., Feigenbaum, A., 2002. Optimization of headspace solid-phase microextraction (SPME) for the odor analysis of surface ripened cheese. *J. Agric. Food Chem*. 50:3810-3817.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci & Technol*. 15: 67-78.
- Lubelski, J., Rink., R., Khusainov, R., Moll, G., Kuipers, O., 2007. Biosynthesis immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci*. 65: 445-476.
- Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T., Peláez, C., 200. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. In. *J. Food Microbiology*. 70:79-88.
- Mireau, I., Olieman, K., Mond, J., Smid, E. J., 2005. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microbial Cell Fact*. 4: 16-24.
- Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P., Nuñez, M., 2003. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw Ewe's milk cheese. *Int. Dairy J*. 13:201-209.
- Murray, J. M., Delahunty, C. M., Baxter, I. A. 2001. Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research Int*. 34:461-471.
- Naidu, A.S. 2010. Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press. pp 818. Estados Unidos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- NMX-F-068-S-1980. Alimentos. Determinación de proteínas.

- NMX-F-387-1982. Alimentos. Leche fluida determinación de grasa butírica por el método de gerber.
- Ochoa, V. 2011. Incorporación de *Lactococcus lactis* UQ2 rif L+ en queso panela y su efecto en la bioconservación y desarrollo de compuestos de sabor. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.
- Pongtharangkul, T., Demirci, A., 2006. Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated batch biofilm reactor. *Biotech. Prog.* 22: 217-224.
- Panizzolo, L. A., Araujo, A. C., Taroco, L.V., Rodríguez, A., Schöpf, G., 2011. Evolución de la proteólisis durante la maduración de quesos Danbo elaborados con distintos cultivos iniciadores. *Innotec.* 6:24-27.
- Panseri, S., Giani, I., Mentasi, F., Bellagamba, F., Caprino, F., Moretti, V.M., 2008. Determination of flavor compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *LWT.* 41:185-192.
- Sanchez-Ponte, M. D. 2003. Maduración acelerada de queso con bacterias lácticas atenuadas térmicamente. *FCV – LUZ.*, 13(4):299-306.
- Settanni, L., Corsetti, A., 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 123-138.
- Settanni, L., Moschetti, G., 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27:691-697.
- Smit G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. 2005. Flavor formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews.* 29:591-610.
- Sobrino-López, A., Martín-Belloso, O., 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int. Dairy J.* 18: 329-343.
- Tramer, J., Fowler, G. G., 1964. Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Fd. Agric.* 15:522-528.
- Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Hugenholtz, J. 2007. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *Int. Dairy J.* 17: 1290-1297.
- Vanserzant, C., Spliistoesser, D. F. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association. 3ra ed., Washintong DC. 75-97.

Walstra, P., Vliet, T. AND Bremer, L.G.B., 1990. On the stability of casein micelles. J. Dairy Sci. 73: 1965-1979.

Yvon, M., Gitton, G., Chambellon, E., Bergot, G., Monnet, V., 2011. The initial efficiency of the proteolytic system of *Lactococcus lactis* strains determines their responses to a cheese environment. Int. Dairy J. 21: 335-345.

X. ANEXOS

Anexo I. Curva estándar de nisina

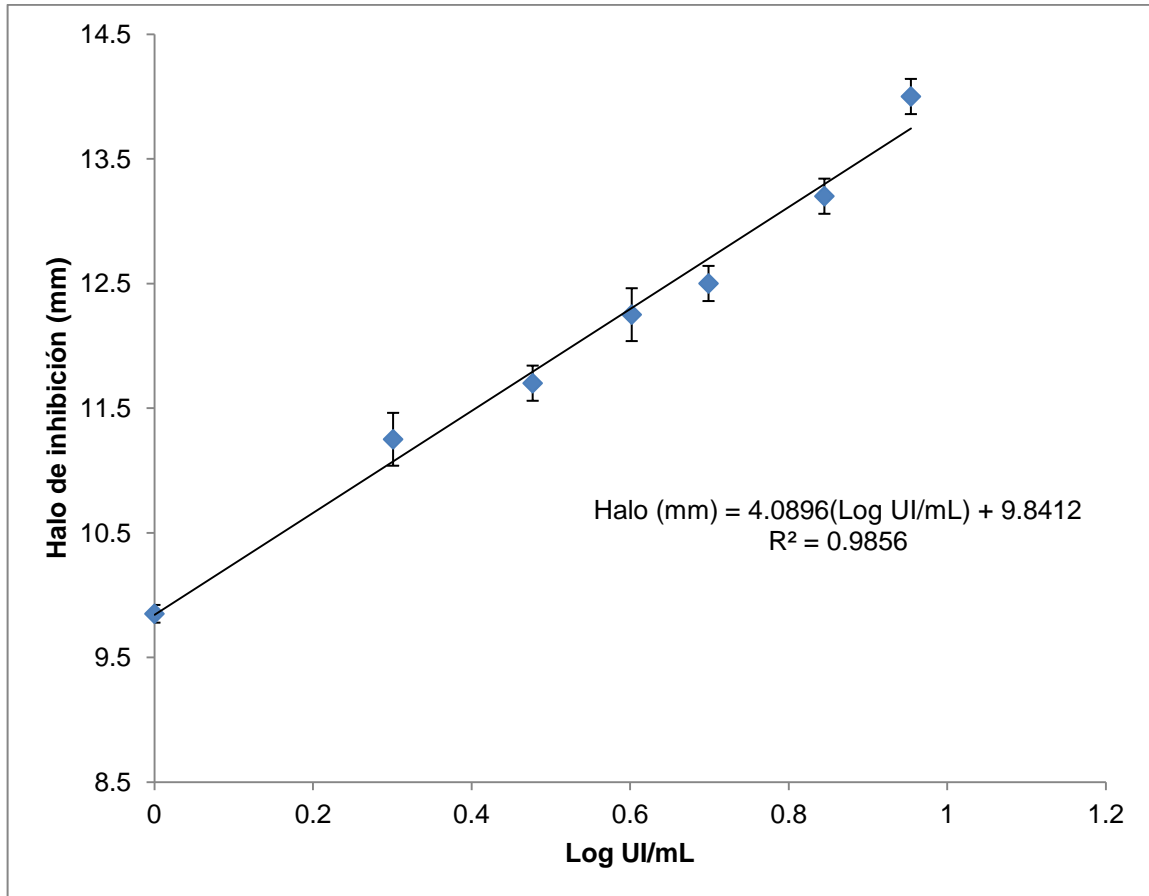


Figura 27. Curva estándar de actividad de nisina

Anexo II. Parámetros microbiológicos

Cuadro 33. Población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ para los quesos inoculados de los diferentes tratamientos del diseño experimental

Tiempo (d)	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g
0	7.69 ± 0.11	7.78 ± 0.06	7.85 ± 0.04	7.87 ± 0.01
7	8.03 ± 0.27	8.28 ± 0.03	7.95 ± 0.06	8.03 ± 0.07
14	8.93 ± 0.08	9.18 ± 0.00	8.58 ± 0.02	9.16 ± 0.00
21	9.15 ± 0.06	9.29 ± 0.01	8.91 ± 0.02	9.17 ± 0.07

Cuadro 34. Actividad de nisina para los quesos inoculados de los diferentes tratamientos del diseño experimental

Tiempo (d)	Tratamiento 3		Tratamiento 4		Tratamiento 5		Tratamiento 6	
	mg/kg	UI/g	mg/kg	UI/g	mg/kg	UI/g	mg/kg	UI/g
0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.28±0.1	11.2±4.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0
7	0.86±0.1	34.4±4.0	0.63±0.2	25.2±8.0	0.48±0.1	19.2±4.0	0.00±0.0	0.00±0.0
14	0.98±0.2	39.2±8.0	0.72±0.2	28.8±8.0	0.55±0.0	22.0±0.0	0.29±0.1	11.6±4.0
21	1.53±0.0	61.2±0.0	1.17±0.0	46.8±0.0	0.90±0.1	36.0±0.0	0.62±0.0	24.8±0.0

Cuadro 35. Cuenta bacteriana total para los quesos de los diferentes tratamientos del diseño experimental

Tiempo (d)	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g	Log UFC/g
0	4.62 ± 0.08	4.42 ± 0.13	7.25 ± 0.05	8.20 ± 0.80	8.02 ± 0.03	8.10 ± 0.03
7	4.42 ± 0.01	4.46 ± 0.04	7.17 ± 0.19	7.24 ± 0.06	8.00 ± 0.06	8.18 ± 0.04
14	4.58 ± 0.26	4.67 ± 0.28	7.79 ± 0.03	7.75 ± 0.01	8.67 ± 0.04	9.03 ± 0.02
21	4.86 ± 0.08	4.88 ± 0.07	7.83 ± 0.05	7.58 ± 0.09	8.71 ± 0.02	9.12 ± 0.01

Cuadro 36. Acidez de los quesos de los diferentes tratamientos del diseño experimental

Tiempo (d)	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
	°D	°D	°D	°D	°D	°D
0	9.14±1.29	7.83±0.49	6.70±0.38	15.84±0.86	12.79±0.43	9.14±3.02
7	22.54 ± 0.43	11.58±1.28	22.54±3.17	31.68±0.86	26.81±1.72	20.71±1.72
14	20.71±0.00	23.76±1.29	29.85±8.09	44.47±0.43	45.69±2.16	27.41±1.29
21	37.16±1.29	43.26±3.88	56.66±3.88	63.97±2.15	67.62±0.43	41.43±1.72

Anexo III. Calificaciones de las evaluaciones sensoriales

Cuadro 37. Mediana de las calificaciones para el atributo sabor en los quesos de los diferentes tratamientos del diseño experimental

Tiempo (d)	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
7	7.00 ± 0.00	8.13 ± 0.09	7.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	4.50 ± 0.35	8.50 ± 0.35
14	7.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	5.75 ± 0.53	8.25 ± 0.18	4.50 ± 0.35	7.88 ± 0.09
21	7.50 ± 0.35	8.25 ± 0.18	6.00 ± 0.71	8.00 ± 0.71	5.88 ± 0.62	6.50 ± 0.35

Cuadro 38. Mediana de las calificaciones para el atributo textura en los quesos de los diferentes tratamientos del diseño experimental

Tiempo (d)	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
7	6.50 ± 0.35	7.86 ± 0.07	6.50 ± 0.35	8.35 ± 0.25	6.00 ± 0.71	8.50 ± 0.35
14	6.88 ± 0.09	8.00 ± 0.00	5.50 ± 0.35	8.00 ± 0.00	6.00 ± 1.41	7.38 ± 0.27
21	6.50 ± 0.35	8.25 ± 0.18	6.00 ± 0.71	8.00 ± 0.71	5.88 ± 0.62	7.00 ± 0.00

Anexo IV. Concentración de los compuestos volátiles identificados por microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (SPME).

Cuadro 39 (a). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 0 (ppb).

No. Cas	Alcoholes			Cetonas				Ácidos Orgánicos		
	3-Metil- 1- Butanol	Hexanol	Fenil Etanol	2-Metil-1- Propanol	2- Heptanona	2- Pentanona	2- Nonanona	3-Hidroxi- 2- Butanona	Ácido Hexanoico	Ácido Octanoico
	123-51-3	111-27-3	60-12-8	78-83-1	110-43-0	107-87-9	821-55-6	513-86-0	142-62-1	124-07-2
T1A	11.41	0.00	0.00	0	0	0.00	0.00	0.00	0	13.99
T1B	0.00	0.00	0.00	0.00	476.34	0.00	54.00	0.00	0.00	12.54
T2A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	31.29
T2B	0.00	0.00	0.00	0.00	31.51	0.00	0.00	0.00	22.17	0
T3A	182.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.14	11.43
T3B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	34.86
T4A	241.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	133.09	0.00
T4B	87.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.74
T5A	166.58	0.00	0.00	0.00	71.72	0.00	0.00	0.00	200.74	332.66
T5B	1804.80	48.45	68.50	34.07	1127.25	32.72	222.17	16.62	26.14	63.58
T6A	78.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T6B	95.86	0.00	0.00	0.00	81.45	0.00	4.60	0.00	0.00	33.61

Cuadro 39 (b). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 0 (ppb).

No. Cas	Ácidos orgánicos				Aldehídos					
	Ácido n-Decanoico o	Ácido Butanoico	Ácido Acético	Ácido Dodecanoico	Hexanal	Nonanal	Heptanal	Benzaldehído	Acetaldehído	3-Metibutanal
	334-48-5	107-92-6	64-19-7	143-07-7	66-25-1	124-19-6	111-71-7	100-52-7	122-78-1	590-86-3
T1A	0	0.00	0.00	0	66.62	24.85	16.14	0.00	0.00	0.00
T1B	0.00	0.00	0.00	21.16	79.37	44.21	0.00	0.00	0.00	0.00
T2A	0.00	0.00	0.00	23.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2B	0.00	0.00	19.08	0	20.41	21.17	0.00	0.00	0.00	0.00
T3A	10.11	0.00	0.00	0.00	80.38	0.00	0.00	15.41	8.22	18.10
T3B	0.00	0.00	0.00	0.00	108.04	38.27	0.00	0.00	0.00	0.00
T4A	205.87	35.27	0.00	38.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T4B	16.37	0.00	0.00	13.77	47.60	8.81	0.00	0.00	0.00	14.86
T5A	33.72	0.00	24.31	53.37	64.83	0.00	0.00	0.00	0.00	47.37
T5B	0.00	0.00	18.45	26.47	76.66	0.00	0.00	123.12	0.00	291.38
T6A	22.73	0.00	0.00	13.87	50.65	10.95	10.25	0.00	0.00	48.25
T6B	0.00	0.00	0.00	24.62	45.79	14.38	0.00	3.19	1.56	10.81

Cuadro 39 (c). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 0 (ppb).

Ésteres										
	Butirato de Metilo	Hexanoato de Metilo	Hexanoato de Etilo	Octanoato de Metilo	Nonanoato de Metilo	Decanoato de Metilo	Undecanoato de Metilo	Decanoato de Etilo	Isopropil miristato	Tetradecanoato de Metilo
No. Cas	623-42-7	106-70-7	123-66-0	111-11-5	1731-84-6	110-42-9	1731-86-8	110-38-3	110-27-0	124-10-7
T1A	38.99	9.9	99.53	0	0	9.52	0.00	0.00	0	0
T1B	26.84	0	161.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.68	0.00
T2A	28.85	13.24	42.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.29	0.00
T2B	23.68	11.97	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.39	0.00
T3A	45.26	14.58	116.90	0.00	0.00	39.87	0.00	0.00	9.62	0.00
T3B	45.28	0.00	218.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.15	0.00
T4A	80.62	0.00	45.18	430.48	13.65	458.42	0.00	0.00	0.00	18.68
T4B	42.48	13.05	44.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T5A	0.00	0.00	160.91	2443.97	103.75	1877.30	17.35	0.00	19.86	19.76
T5B	23.36	0.00	296.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	23.02	17.43
T6A	34.03	12.51	50.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T6B	26.75	12.61	51.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.98	4.52

Cuadro 39 (d). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 0 (ppm).

No. Cas	Esteres			Aromático	Hidrocarburo	Lactona	Compuesto Sulfurado
	Meristolato de Metilo 56219-06-8	14-Metil Pentadecanoato de Metilo 5129-60-2	3-Oxo-2--pentil-ácido ciclopentanoacético de metilo 24851-98-7	Etilbenceno 100-41-4	D-Limoneno 5989-27-5	δ-Decalactona 705-86-2	Sulfuro de Dimetilo 75-18-3
T1A	0.00	0.00	0.00	25.19	0.00	0.00	27.12
T1B	0.00	0.00	0.00	35.15	0.00	0.00	0.00
T2A	0.00	0.00	21.15	0.00	0.00	17.97	0.00
T2B	0.00	28.44	43.93	0.00	0.00	0	66.80
T3A	0.00	0.00	0.00	32.20	0.00	0.00	41.53
T3B	0.00	0.00	55.00	54.17	0.00	0.00	0.00
T4A	9.61	12.81	15.20	0.00	0.00	19.29	0.00
T4B	0.00	0.00	15.30	18.23	0.00	7.68	29.36
T5A	16.21	0.00	0.00	39.84	0.00	18.35	22.75
T5B	0.00	0.00	44.67	42.72	0.00	0.00	0.00
T6A	0.00	0.00	0.00	18.95	0.00	5.59	26.60
T6B	0.00	0.00	39.06	19.55	0.00	13.87	19.70

Cuadro 40 (a). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 7 (ppb).

No. Cas	Alcoholes				Cetonas			Ácidos Orgánicos		
	3-Metil- 1- Butanol	Hexanol	Fenil Etanol	2-Metil-1- Propanol	2- Heptanona	2- Pentanona	2- Nonanona	3-Hidroxi- 2- Butanona	Ácido Hexanoico	Ácido Octanoico
	123-51-3	111-27-3	60-12-8	78-83-1	110-43-0	107-87-9	821-55-6	513-86-0	142-62-1	124-07-2
T1A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	30.03
T1B	0.00	0.00	0.00	0.00	610.12	0.00	87.13	0.00	0.00	0.00
T2A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2B	0.00	0.00	0.00	0.00	64.60	0.00	0.00	0.00	0.00	31.24
T3A	1576.03	39.61	128.12	109.16	0.00	0.00	0.00	96.41	8.98	15.59
T3B	48.23	0.00	132.76	100.59	0.00	0.00	0.00	59.16	19.17	33.47
T4A	1675.83	0.00	63.99	55.32	0.00	0.00	0.00	77.67	15.41	0.00
T4B	519.07	0.00	25.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.60	11.27
T5A	170.40	0.00	0.00	0.00	87.93	0.00	0.00	33.36	618.12	0.00
T5B	2726.20	0.00	57.66	50.69	1027.96	0.00	162.39	13.66	46.34	16.50
T6A	315.64	27.10	0.00	0.00	9.45	0.00	0.00	0.00	0.00	33.89
T6B	96.48	0.00	0.00	0.00	89.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 40 (b). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 7 (ppb).

No. Cas	Ácidos orgánicos				Aldehídos					
	Ácido n-Decanoico 334-48-5	Ácido Butanoico 107-92-6	Ácido Acético 64-19-7	Ácido Dodecanoico 143-07-7	Hexanal 66-25-1	Nonanal 124-19-6	Heptanal 111-71-7	Benzaldehído 100-52-7	Acetaldehído 122-78-1	3-Metibutanal 590-86-3
T1A	0.00	0.00	0.00	0.00	74.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T1B	0.00	0.00	0.00	30.48	77.10	44.08	0.00	0.00	0.00	0.00
T2A	0.00	0.00	0.00	0.00	42.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.93	0.00	0.00	0.00	0.00
T3A	0.00	0.00	12.89	17.47	13.91	0.00	0.00	0.00	0.00	32.08
T3B	14.39	0.00	0.00	0.00	44.19	26.87	0.00	0.00	0.00	0.00
T4A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T4B	0.00	0.00	0.00	9.30	31.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T5A	144.52	46.03	64.27	46.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.38
T5B	0.00	12.16	55.19	29.33	59.92	21.86	0.00	23.65	24.46	68.08
T6A	62.06	0.00	0.00	17.99	23.91	11.33	0.00	0.00	0.00	15.40
T6B	13.57	0.00	11.59	24.22	35.62	17.55	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 40 (c). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 7 (ppb).

No. Cas	Ésteres									
	Butirato de Metilo	Hexanoato de Metilo	Hexanoato de Etilo	Octanoato de Metilo	Nonanoato de Metilo	Decanoato de Metilo	Undecanoato de Metilo	Decanoato de Etilo	Isopropil miristato	Tetradecanoato de Metilo
	623-42-7	106-70-7	123-66-0	111-11-5	1731-84-6	110-42-9	1731-86-8	110-38-3	110-27-0	124-10-7
T1A	37.77	14.06	138.30	0.00	0.00	16.59	0.00	0.00	0.00	0.00
T1B	29.52	56.01	181.79	0.00	0.00	22.77	0.00	0.00	21.65	0.00
T2A	26.94	12.80	67.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	11.23	0.00
T2B	21.63	13.10	11.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.73	0.00
T3A	40.63	12.71	106.13	0.00	0.00	16.84	0.00	0.00	9.71	0.00
T3B	37.24	12.09	126.02	0.00	0.00	19.10	27.43	0.00	11.97	0.00
T4A	0.00	0.00	154.62	16.67	0.00	0.00	0.00	0.00	19.70	0.00
T4B	40.33	8.97	46.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T5A	128.02	480.16	98.71	6086.79	222.04	4157.76	51.45	59.19	17.38	17.00
T5B	18.07	0.00	347.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.46	0.00
T6A	36.61	12.34	40.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T6B	24.03	12.23	52.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 40 (d). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 7 (ppb).

No. Cas	Esteres			Aromático	Hidrocarburo	Lactona	Compuesto Sulfurado
	Meristolato de Metilo 56219-06-8	14-Metil Pentadecanoato de Metilo 5129-60-2	3-Oxo-2--pentil-ácido ciclopentanoacético de metilo 24851-98-7	Etilbenceno 100-41-4	D-Limoneno 5989-27-5	δ-Decalactona 705-86-2	Sulfuro de Dimetilo 75-18-3
T1A	0.00	0.00	0.00	25.19	0.00	0.00	37.62
T1B	0.00	0.00	49.34	35.15	0.00	0.00	36.85
T2A	0.00	0.00	16.73	0.00	0.00	17.47	0.00
T2B	0.00	12.98	37.59	0.00	0.00	14.52	64.08
T3A	0.00	0.00	13.52	32.20	0.00	8.02	68.58
T3B	0.00	0.00	13.77	54.17	0.00	13.46	25.43
T4A	0.00	0.00	30.29	0.00	0.00	18.88	0.00
T4B	0.00	0.00	17.36	18.23	0.00	9.56	46.04
T5A	44.07	22.18	22.99	39.84	0.00	0.00	38.67
T5B	0.00	0.00	42.91	42.72	0.00	11.89	18.23
T6A	0.00	0.00	0.00	18.95	0.00	11.17	43.11
T6B	0.00	0.00	18.36	19.55	0.00	13.01	21.88

Cuadro 41 (a). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 14 (ppb).

No. Cas	Alcoholes			Cetonas				Ácidos Orgánicos		
	3-Metil- 1- Butanol	Hexanol	Fenil Etanol	2-Metil-1- Propanol	2- Heptanona	2- Pentanona	2- Nonanona	3-Hidroxi- 2- Butanona	Ácido Hexanoico	Ácido Octanoico
	123-51-3	111-27-3	60-12-8	78-83-1	110-43-0	107-87-9	821-55-6	513-86-0	142-62-1	124-07-2
T1A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.14	0.00	0.00	10.17
T1B	85.17	0.00	0.00	0.00	758.29	0.00	190.80	17.82	0.00	17.32
T2A	0.00	0.00	0.00	0.00	158.88	0.00	0.00	0.00	142.56	276.45
T2B	14.25	0.00	0.00	0.00	55.96	0.00	0.00	0.00	0.00	13.50
T3A	420.60	0.00	15.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T3B	31.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	36.15
T4A	420.60	0.00	15.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T4B	814.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	12.99	17.38	13.49
T5A	135.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	18.61	135.50
T5B	1478.87	0.00	157.83	46.34	613.92	0.00	191.37	14.14	177.64	216.82
T6A	352.78	0.00	0.00	0.00	9.17	0.00	0.00	0.00	0.00	10.82
T6B	352.37	0.00	51.92	13.30	91.37	0.00	0.00	22.05	13.45	71.61

Cuadro 41 (b). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 14 (ppb).

No. Cas	Ácidos orgánicos				Aldehídos					
	Ácido n-Decanoico 334-48-5	Ácido Butanoico 107-92-6	Ácido Acético 64-19-7	Ácido Dodecanoico 143-07-7	Hexanal 66-25-1	Nonanal 124-19-6	Heptanal 111-71-7	Benzaldehído 100-52-7	Acetaldehído 122-78-1	3-Metibutanal 590-86-3
T1A	0.00	0.00	0.00	0.00	65.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T1B	0.00	0.00	38.60	40.45	22.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2A	79.51	0.00	0.00	49.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2B	0.00	0.00	28.90	21.21	0.00	19.03	0.00	0.00	0.00	0.00
T3A	0.00	0.00	0.00	14.95	52.82	0.00	0.00	0.00	0.00	44.66
T3B	0.00	0.00	0.00	29.64	59.63	30.98	0.00	0.00	0.00	0.00
T4A	0.00	0.00	0.00	14.95	52.82	0.00	0.00	0.00	0.00	44.66
T4B	0.00	0.00	0.00	24.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	38.90
T5A	19.61	0.00	34.75	24.27	28.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T5B	30.65	22.30	79.59	32.05	41.84	0.00	0.00	32.98	0.00	31.90
T6A	44.19	0.00	0.00	26.25	21.83	10.36	0.00	0.00	0.00	12.07
T6B	0.00	0.00	16.16	34.81	29.19	28.54	0.00	12.91	0.00	28.57

Cuadro 41 (c). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 14 (ppb).

Ésteres										
	Butirato de Metilo	Hexanoato de Metilo	Hexanoato de Etilo	Octanoato de Metilo	Nonanoato de Metilo	Decanoato de Metilo	Undecanoato de Metilo	Decanoato de Etilo	Isopropil miristato	Tetradecanoato de Metilo
No. Cas	623-42-7	106-70-7	123-66-0	111-11-5	1731-84-6	110-42-9	1731-86-8	110-38-3	110-27-0	124-10-7
T1A	45.97	17.89	206.18	0.00	0.00	22.96	0.00	0.00	0.00	0.00
T1B	37.00	78.71	198.15	0.00	0.00	30.85	0.00	0.00	22.39	0.00
T2A	216.83	754.23	61.23	2446.74	42.94	1062.15	0.00	0.00	15.80	20.50
T2B	22.86	16.94	14.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.50	0.00
T3A	48.20	18.53	103.15	0.00	0.00	13.97	0.00	0.00	0.00	0.00
T3B	30.52	0.00	147.95	0.00	0.00	26.14	0.00	0.00	13.68	0.00
T4A	48.20	18.53	103.15	0.00	0.00	13.97	0.00	0.00	0.00	0.00
T4B	36.41	0.00	102.83	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.50	0.00
T5A	29.13	0.00	63.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T5B	88.00	173.27	216.52	865.11	25.58	468.70	9.25	38.27	11.92	0.00
T6A	38.78	0.00	47.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T6B	63.08	48.00	80.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.84	0.00

Cuadro 41 (d). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 14 (ppb).

No. Cas	Esteres			Aromático	Hidrocarburo	Lactona	Compuesto Sulfurado
	Meristolato de Metilo 56219-06-8	14-Metil Pentadecanoato de Metilo 5129-60-2	3-Oxo-2--pentil-ácido ciclopentanoacético de metilo 24851-98-7	Etilbenceno 100-41-4	D-Limoneno 5989-27-5	δ-Decalactona 705-86-2	Sulfuro de Dimetilo 75-18-3
T1A	0.00	0.00	10.00	26.47	0.00	0.00	31.60
T1B	0.00	0.00	46.54	33.12	0.00	0.00	32.43
T2A	0.00	0.00	33.31	0.00	0.00	16.35	0.00
T2B	0.00	0.00	36.28	13.92	0.00	14.69	60.25
T3A	0.00	0.00	11.03	38.67	0.00	7.54	53.91
T3B	0.00	0.00	0.00	32.41	0.00	33.77	23.24
T4A	0.00	0.00	11.03	38.67	0.00	7.54	53.91
T4B	0.00	0.00	27.93	0.00	0.00	21.52	0.00
T5A	0.00	11.05	20.81	20.43	0.00	21.85	31.09
T5B	0.00	0.00	40.59	32.45	0.00	10.14	22.47
T6A	0.00	0.00	0.00	22.30	0.00	13.24	49.21
T6B	0.00	0.00	0.00	20.45	0.00	16.70	27.25

Cuadro 42 (a). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 21 (ppb).

No. Cas	Alcoholes			Cetonas				Ácidos Orgánicos		
	3-Metil- 1- Butanol	Hexanol	Fenil Etanol	2-Metil-1- Propanol	2- Heptanona	2- Pentanona	2- Nonanona	3-Hidroxi- 2- Butanona	Ácido Hexanoico	Ácido Octanoico
	123-51-3	111-27-3	60-12-8	78-83-1	110-43-0	107-87-9	821-55-6	513-86-0	142-62-1	124-07-2
T1A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.10	0.00	0.00	13.87
T1B	215.45	0.00	20.19	0.00	771.80	0.00	163.20	43.37	28.17	155.51
T2A	661.34	0.00	0.00	39.16	0.00	0.00	0.00	23.00	50.56	65.84
T2B	60.17	0.00	0.00	16.90	89.46	0.00	0.00	26.82	0.00	8.01
T3A	1239.78	39.30	62.97	85.09	11.04	0.00	0.00	0.00	0.00	8.73
T3B	172.05	0.00	0.00	26.89	39.03	0.00	0.00	12.60	0.00	56.70
T4A	650.09	0.00	0.00	0.00	40.36	0.00	0.00	16.07	47.59	125.13
T4B	462.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	19.85	103.98
T5A	3500.72	0.00	76.45	93.95	28.55	0.00	0.00	13.05	70.89	82.25
T5B	3187.10	0.00	154.82	91.32	29.22	0.00	0.00	16.05	63.75	89.18
T6A	419.56	28.34	0.00	0.00	4.92	0.00	0.00	0.00	3.67	51.89
T6B	171.77	0.00	18.15	0.00	106.52	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 42 (b). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 21(ppb).

No. Cas	Ácidos orgánicos				Aldehídos					
	Ácido n-Decanoico 334-48-5	Ácido Butanoico 107-92-6	Ácido Acético 64-19-7	Ácido Dodecanoico 143-07-7	Hexanal 66-25-1	Nonanal 124-19-6	Heptanal 111-71-7	Benzaldehído 100-52-7	Acetaldehído 122-78-1	3-Metibutanal 590-86-3
T1A	0.00	0.00	0.00	14.88	61.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T1B	15.84	0.00	107.61	31.91	21.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T2B	0.00	0.00	32.87	0.00	0.00	18.75	0.00	0.00	0.00	0.00
T3A	0.00	0.00	0.00	0.00	13.58	19.87	0.00	0.00	0.00	48.87
T3B	0.00	0.00	0.00	22.59	33.35	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T4A	0.00	0.00	0.00	26.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T4B	19.46	0.00	28.29	26.02	31.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T5A	0.00	0.00	86.45	29.39	14.49	14.35	0.00	15.39	0.00	46.82
T5B	0.00	19.01	84.70	24.21	13.52	0.00	0.00	13.32	0.00	48.84
T6A	34.23	0.00	16.84	19.71	18.61	14.34	0.00	0.00	0.00	10.19
T6B	15.86	0.00	21.61	26.46	32.42	25.06	0.00	0.00	0.00	0.00

Cuadro 42 (c). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 21 (ppb).

No. Cas	Ésteres									
	Butirato de Metilo	Hexanoato de Metilo	Hexanoato de Etilo	Octanoato de Metilo	Nonanoato de Metilo	Decanoato de Metilo	Undecanoato de Metilo	Decanoato de Etilo	Isopropil miristato	Tetradecanoato de Metilo
	623-42-7	106-70-7	123-66-0	111-11-5	1731-84-6	110-42-9	1731-86-8	110-38-3	110-27-0	124-10-7
T1A	42.67	13.17	222.47	0.00	0.00	19.70	0.00	0.00	0.00	0.00
T1B	69.76	147.88	198.69	0.00	0.00	31.96	0.00	0.00	19.56	0.00
T2A	42.03	17.43	103.46	48.34	0.00	17.50	0.00	0.00	19.82	0.00
T2B	30.89	20.42	15.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.53	0.00
T3A	46.07	17.23	93.41	0.00	0.00	13.25	0.00	0.00	0.00	0.00
T3B	26.78	0.00	83.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	11.88	0.00
T4A	125.82	329.61	106.35	384.98	0.00	228.12	0.00	0.00	13.02	0.00
T4B	35.15	0.00	106.13	18.81	0.00	0.00	0.00	0.00	14.89	0.00
T5A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.32	0.00
T5B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.18	0.00
T6A	34.32	9.77	45.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
T6B	36.37	21.05	55.46	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	16.45	0.00

Cuadro 42 (d). Concentración de los 37 compuestos volátiles en los diferentes tratamientos al día 21(ppb).

No. Cas	Esteres			Aromático	Hidrocarburo	Lactona	Compuesto Sulfurado
	Meristolato de Metilo 56219-06-8	14-Metil Pentadecanoato de Metilo 5129-60-2	3-Oxo-2--pentil-ácido ciclopentanoacético de metilo 24851-98-7	Etilbenceno 100-41-4	D-Limoneno 5989-27-5	δ-Decalactona 705-86-2	Sulfuro de Dimetilo 75-18-3
T1A	0.00	0.00	10.31	34.66	0.00	0.00	45.95
T1B	0.00	0.00	44.20	32.98	0.00	16.50	40.79
T2A	0.00	0.00	30.15	0.00	0.00	16.72	0.00
T2B	0.00	0.00	45.95	18.31	0.00	17.20	76.50
T3A	0.00	0.00	10.45	0.00	0.00	0.00	56.68
T3B	0.00	0.00	34.03	29.63	0.00	36.62	39.49
T4A	0.00	0.00	28.37	0.00	13.93	17.15	0.00
T4B	0.00	0.00	48.59	27.66	0.00	23.41	58.05
T5A	0.00	0.00	39.30	0.00	0.00	0.00	73.58
T5B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	49.62
T6A	0.00	0.00	0.00	19.02	0.00	12.47	39.09
T6B	0.00	0.00	21.22	20.40	0.00	15.97	35.30