

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

**INCORPORACIÓN DE *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ EN QUESO
PANELA Y SU EFECTO EN LA BIOCONSERVACIÓN Y
DESARROLLO DE COMPUESTOS DE SABOR**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

Q en A. Ana Violeta Ochoa Rico

Dirigido por:

Blanca E. García Almendárez

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 2011
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Posgrado en Alimentos del Centro de la República
(PROPAC)
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

INCORPORACIÓN DE *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ EN QUESO PANELA Y SU EFECTO EN LA
BIOCONSERVACIÓN Y DESARROLLO DE COMPUESTOS DE SABOR

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Ana Violeta Ochoa Rico

Dirigido por:

Blanca E. García Almendárez

SINODALES

Dra. Blanca E. García Almendárez
Presidente


Firma

Dr. Carlos Regalado González
Secretaría


Firma

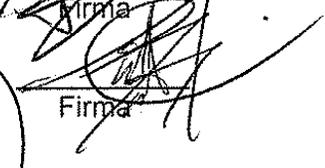
Dr. Pedro Vázquez Landaverde
Vocal

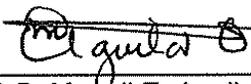

Firma

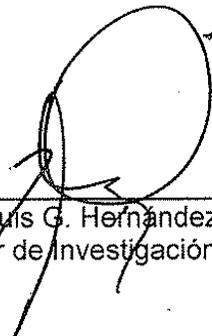
Dra. Silvia L. Amaya Llano
Suplente


Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente


Firma


Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Directora de la Facultad de Química


Dr. Luis G. Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Los quesos frescos son los más consumidos en nuestro país. Existen reportes en otros países en quesos de este tipo donde se les ha incorporado cultivos protectores a quesos en un afán por mantener su calidad. Diversos estudios sugieren que bacterias ácido lácticas, en particular las del género *Lactococcus* son importantes en el desarrollo de compuestos de sabor. En la bioconservación de alimentos se han utilizado compuestos antimicrobianos naturales como nisina, la cual puede aplicarse en los alimentos directamente o agregando la cepa productora. En el presente trabajo se estudió el efecto de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ en el desarrollo de compuestos de sabor, así como la bioconservación que brinda al ser utilizado como cultivo protector en la elaboración de queso fresco tipo panela. Se elaboró un queso pasteurizado con y sin inóculo así como su control sin pasteurizar, en ellos se evaluó el desarrollo de microorganismos indicadores. Se analizó pH, producción de nisina y población de *L. lactis* UQ2 rif L⁺, en el queso elaborado con leche pasteurizada y sin pasteurizar. El queso elaborado con leche pasteurizada con inóculo presentó una producción máxima de nisina al día 7 de 1836 UI/g, una población de 2.2×10^8 ufc/g en un pH de 5.2. Se analizó la formación de compuestos de sabor utilizando un cromatografo de gases acoplado a masas, mediante la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza. Del análisis se obtuvieron 38 compuestos que se diversifican en 8 grupos químicos diferentes. Fueron evaluados mediante un análisis estadístico de componentes principales, observando que el queso elaborado con leche pasteurizada con inóculo y sin inóculo son diferentes. Dentro de los 38 compuestos se encontraron 4 característicamente producidos por *Lactococcus lactis* entre ellos el hexanal, 3-metil butanal, 3-metil 1 butanol y 2 metil propanol. De igual forma se realizó un análisis proximal y sensorial del producto. El queso adicionado del cultivo protector elaborado con leche pasteurizada mantiene su estabilidad microbiológica gracias al efecto bioprotector del cultivo adicionado por otro lado se desarrolla un conjunto de compuestos de sabor y aroma que resultan agradables al consumidor.

(Palabras clave: Bioconservación, queso fresco y compuestos de sabor)

SUMMARY

Fresh cheeses are the most consumed in our country. There are reports in other countries where they incorporated protective culture in cheeses in an effort to maintain their quality. Studies suggest that lactic acid bacteria in the genus *Lactococcus* are particularly important in the development of flavor compounds. In food bioconservation natural antimicrobial compounds as bacteriocin nisin, which can be applied directly in food or by adding the producing strain has been used. The following project studies the effect of *L. lactis* UQ2 rif L⁺ in the development of flavor compounds as well as the bioconservation produced to be used as protective culture in the manufacturing of panela type cheese. Cheese was produced using pasteurized milk with and without protective culture and their control with unpasteurized milk; the development of indicator organisms. The pH was analyzed, as well as nisin production and population of *L. lactis* UQ2 rif L⁺ in cheese made from pasteurized and unpasteurized milk was evaluated in them. The cheese made with pasteurized milk and added with protective culture showed a maximum production of nisin in day 7 of 1836 IU/g, a population of 2.2×10^8 CFU/g at pH 5.2. The formation of flavor compounds was analyzed using a headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method in combination with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The analysis showed as result, 38 compounds that are diversified in 8 different chemical groups. They were evaluated by statistical analysis of principal components, observing that the pasteurized cheese made with inoculum and uninoculated are different. Among the 38 compounds there were found 4 characteristically produced by *Lactococcus lactis* including hexanal, butanal, 3-methyl, 1-butanol 3-methyl and 1-propanol 2-methyl. Likewise, an analysis of the proximal and sensory product was conducted. The addition of protective culture in cheese made with pasteurized milk maintains its microbiological stability due to the bioprotector effect; on the other hand it develops a set of flavor compounds and aroma pleasant to the consumer.

(Keywords: Bioconservation, fresh cheese and flavor compounds)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios por llenar mi vida de dicha y bendiciones.

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, por los regaños y recomendaciones en su momento, por la paciencia y por estar pendiente de mí en todo momento. De igual forma aprovecho para decirles que son un ejemplo a seguir que el amor que muestran por cada uno de nosotros es admirable. Ya que teniendo poco siempre han buscado la estabilidad de cada uno de nosotros anteponiendo la suya por esto y por muchas cosas más gracias.

Agradezco a mis hermanos por la compañía y apoyo brindado, especialmente a Brenda y Omar por haber traído al mundo a sus pequeños hijos que son unos angelitos que llenan mi vida de mucha alegría.

Agradezco a mis amigos Mir, Evelyn, Naye, Indy, Chivís, Luis, Coco, Lolís, Rey, Lety, Daly, David, Fer, Norma por mencionar algunos que me apoyaron mucho en mi estancia en Querétaro, ya que fueron y serán para mí como mi segunda familia, por su apoyo comprensión y ayuda brindada en todo momento. De igual forma aquellas amistades que se debilitaron en el camino quiero decirles que agradezco el apoyo brindado y que espero que algún día podamos llegar a recuperar la amistad.

Agradezco a mi novio Arturo Mendoza que me escucho y apoyo en los momentos de estrés y desesperación, y que si bien no inicio conmigo me ayudo a concluir este proyecto con gran estabilidad emocional y mucha alegría, lo cual también agradezco.

Agradezco a mis maestros por la oportunidad, disposición y ayuda brindada, especialmente a la Dra. Blanca García y a el Dr. Carlos Regalado.

Agradezco el apoyo a CONACYT, ya que me permitió concluir este proyecto satisfactoriamente, brindándome estabilidad económica a lo largo de estos dos años lo cual hizo posible enfocarme de lleno al proyecto.

Y a todos aquellos que han quedado en los recintos más escondidos de mi memoria pero que fueron partícipes gracias.

ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Conservación de alimentos	3
2.2. Sistemas de conservación biológica	4
2.3. Nisina	4
2.3.1 Mecanismo de acción	6
2.4. Aplicación de bacteriocinas en la bioconservación	7
2.5. <i>Lactococcus lactis</i>	7
2.6. Cultivo protector	8
2.7. Empleo de cultivos protectores en elaboración de queso	9
2.8. Queso	10
2.8.1 Definición	10
2.8.2 Clasificación de los quesos	11
2.8.3 Quesos frescos	12
2.8.4 Especificaciones microbiológicas	12
2.8.5 Conservadores	13
2.9. Brotes asociados al consumo de queso por <i>L. monocytogenes</i>	14

2.10	Características que determinan la calidad del queso	15
2.10.1	Sabor y aroma del queso	17
2.10.2	Lipólisis en queso	18
2.10.3	Influencia de bacterias ácido lácticas en la calidad del queso	18
2.11	Determinación de compuestos de sabor en queso	20
III.	JUSTIFICACIÓN	22
IV.	HIPOTESIS	23
V.	OBJETIVOS	24
5.1	Objetivo general	24
5.2	Objetivos específicos	24
VI.	METODOLOGÍA	25
6.1	Materiales	25
6.1.1	Material biológico	25
6.1.2	Antimicrobianos	25
6.2.	Soluciones y medios de cultivo	25
6.3	Métodos	28
6.3.1	Elaboración de queso panela	28
6.4	Análisis Microbiológico	31
6.4.1	Activación de cepas microbianas	31
6.4.2	Método de recuento bacteriano Miles-Misra	32
6.4.3	Recuento total de bacterias	32
6.4.4	Recuento de hongos y levaduras	33
6.4.5	Determinación de coliformes fecales	33
6.4.6	Recuento de <i>Lactococcus lactis</i> UQ2 rif L ⁺	34
6.4.7	Extracción de nisina en queso	34
6.5	Análisis fisicoquímicos	35

6.6	Análisis proximales	36
6.7	Análisis de compuestos volátiles mediante HS-SPME	38
6.8	Análisis sensorial del queso	40
VII.	RESULTADOS	41
7.1	Análisis microbiológico	41
7.1.1	Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ en leche	41
7.1.2	Producción de nisina en queso por <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺	42
7.1.3	Cinética de producción de nisina, dinámica poblacional y pH	45
7.1.4	Desarrollo de microorganismos indicadores	47
7.1.5	Cuenta total de bacterias ácido lácticas (BAL)	48
7.2	Análisis proximal de los quesos elaborados	49
7.2.1	Determinación de grasa y proteína	49
7.2.2	Determinación de humedad	50
7.3	Análisis fisicoquímico	51
7.3.1	Determinación de pH y actividad de agua (a_w)	51
7.4	Análisis sensorial	54
7.4.1	Prueba hedónica	54
7.5	Análisis de compuestos volátiles	62
7.5.1	Comportamiento de compuestos de sabor	62
VIII.	CONCLUSIONES	77
IX.	BIBLIOGRAFÍA	79
X.	ANEXOS	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Contenido de humedad en diferentes tipos de queso	12
2 . Especificaciones microbiológicas en quesos frescos	13
3. Límites máximos de conservadores adicionados en quesos	13
4. Recuento de coliformes fecales, hongos y levaduras como índice de calidad sanitaria, en los quesos tipo panela elaborados	48
5. Determinación de grasa y proteína de leche y queso	50
6. Actividad de agua (a_w), en queso tipo panela a lo largo de un periodo de 30 días	53
7. Notas de olor identificadas para 38 compuestos encontrados en mayor concentración en la matriz del queso (a)	63
8. Notas de olor identificadas para 38 compuestos encontrados en mayor concentración en la matriz del queso (b)	64
9. Loadings para el análisis de componentes principales (ACP).....	71
10. Número correspondiente al compuesto que se observa en el gráfico de estrella	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la nisina	5
2. Interacción de la nisina con el lípido II para la formación de poros	6
3. Degradación de los componentes del queso involucrados en la formación de componentes del sabor	15
4. Muestreo en el espacio de cabeza de compuestos volátiles en queso	20
5. Esquema general, parte experimental.....	28
6. Elaboración de queso tipo panela adicionado del cultivo protector.....	30
7. Método de recuento bacteriano Miles-Misra	32
8. Cromatógrafo de gases 7890A acoplado a un espectrometro de masas 5975C (GC-MS) y equipado con un auto-muestreador MPS2	39
9. Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ en leche pasteurizada, muestra la dinámica poblacional y pH	41
10. Producción de nisina por <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ , utilizando leche pasteurizada como medio de cultivo.....	42
11. Producción de nisina en la matriz de los quesos pasteurizado con inóculo (P-CI) y sin pasteurizar con inóculo añadido (SP-CI)	43
12. Halos de inhibición de <i>Micrococcus luteus</i> NCIB 8166, causados por la acción bactericida de la nisina presente en la muestra de los quesos P-CI y SP-CI.....	44
13. Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ , pH y actividad de nisina en queso elaborado con leche pasteurizada (P-CI)	45
14. Recuento de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ , en medio adicionado con rifampicina y purpura de bromocresol (PBC) en queso P-CI	46
15. Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ , pH y actividad de nisina en queso elaborado con leche sin pasteurizar e inoculado (SP-CI).....	47
16. Dinámica de crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) en queso P-CI y SP-CI	49

17. Contenido de humedad a través del tiempo en los diferentes quesos	51
18. Desarrollo del pH de los diferentes quesos tipo panela.	52
19. Evaluación del nivel de agrado del queso P-CI mediante una prueba hedónica, con 50 panelistas no entrenados para cada tiempo.	55
20. Evaluación del agrado del producto mediante una prueba hedónica en queso pasteurizado sin inóculo (P-SI)	56
21. Evaluación del sabor del producto mediante una prueba hedónica en queso P-CI.....	57
22. Evaluación del sabor del producto mediante una prueba hedónica del queso P-SI	58
23. Evaluación del aroma desarrollado en el queso P-CI.....	59
24. Evaluación del aroma desarrollado en el queso P-SI.....	60
25. Respuesta del consumidor en base a los atributos aroma, sabor y agrado de la pregunta: ¿Compraría el producto? del queso P-CI (A) y su control P-SI (B).....	61
26. Cromatograma correspondiente a los diferentes tratamientos en el día 14.....	65
27. Análisis de componentes principales (ACP), tendencia de 38 compuestos identificados para los diferentes tipos de quesos	70
28. Presencia y concentración de 38 compuestos a lo largo del tiempo (días 0, 7, 14, 21 y 30), para los diferentes quesos elaborados	72

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la gran demanda del consumidor de adquirir productos frescos, sin la presencia de aditivos químicos y con larga vida de anaquel, ha llevado a la comunidad científica a la investigación de nuevas alternativas para la conservación de alimentos. A pesar de la puesta en práctica en la industria de programas de calidad para la mejora de instalaciones y procedimientos de control durante la elaboración de los alimentos, el número de enfermedades producidas por microorganismos se encuentra presente, puesto que la calidad microbiológica del alimento depende de diferentes factores.

Respondiendo a esta necesidad se deben tomar medidas que permitan asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos satisfaciendo la demanda del consumidor. Diferentes estudios sobre la conservación de alimentos con cantidades mínimas de conservadores químicos ha llevado al estudio de bacteriocinas como cultivos iniciadores en productos fermentados.

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son originadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores. Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias taxonómicamente relacionadas. Su uso han llamado la atención como sustituto potencial de conservadores químicos, ya que son producidos por bacterias ácidos lácticas (BAL), consideradas benéficas para la salud. Estos compuestos pueden ser utilizados para la bioconservación del alimento o para la reducción o eliminación de ciertos microorganismos causantes del deterioro y algunos patógenos.

En algunas comunidades de ciertos países se elige no pasteurizar la leche ya que conserva en el producto sabores y olores agradables, o no se realiza por falta del equipo mínimo suficiente para el proceso. Lo cual viola la norma NOM-091-SSA1-1994 establecidas por la Secretaria de Salud (SSA).

La leche y los productos lácteos son un componente crucial en la dieta, si estos productos son consumidos sin pasteurizar presentan un serio riesgo a la salud ya que pueden estar contaminados con microorganismos patógenos (Barry, 2009). El consumo de leche sin pasteurizar y productos elaborados con leche a base de ella se han visto involucrados en enfermedades como: infecciones estreptocócica beta hemolítica, campilobacteriosis, gastroenteritis por *E. coli* enterotoxigenica, enterohemorrágica y enteroinvasiva, yersiniosis, brucelosis, fiebre tifoidea y listeriosis (FDA, 2011). Lo anterior puede evitarse al utilizar leche pasteurizada y diferentes medidas que mantienen la calidad microbiológica del alimento por mayor tiempo. Sin embargo, algunos consumidores prefieren productos que se han elaborado con leche sin pasteurizar debido a que la flora asociada le brinda sabores y olores característicos. El queso elaborado con leche pasteurizada pierde estos sabores característicos y por lo tanto se expone al rechazo del consumidor (Renyé *et al.*, 2008).

Se ha considerando el uso de co-cultivos o cultivos protectores para la elaboración de productos lácteos tradicionales elaborados con leche pasteurizada, lo cual representa un reto para la comunidad científica, ya que se busca que un cultivo protector desarrolle en el producto las característica de quesos artesanales, siendo doblemente efectivo, brindando características sensorialmente aceptables y protegiendo al alimento mediante la producción de agentes antimicrobianos como nisina.

La nisina fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la conservación del alimento. De igual forma se emplea como aditivo en productos lácteos para prevenir el crecimiento de microorganismos deterioradores y patógenos principalmente por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Dentro de los quesos frescos encontramos al queso panela el cual es elaborado en nuestra cultura con leche cruda de vaca, lo cual es uno de los problemas principales de contaminación microbiana (Martins *et al.*, 2010).

El consumidor lo prefiere ya que cuenta con aromas y sabores característicos agradables, generados por la flora presente en la leche sin pasteurizar. Las bacterias ácido lácticas son las que participan aumentando la diversidad de sabores en el queso (Alvarado *et al.*, 2005).

En respuesta a la demanda del consumidor se busca mantener la calidad microbiológica del queso utilizando leche pasteurizada, al igual cultivos protectores de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas, utilizando la tecnología de barreras múltiples, para conservar y mantener tanto la calidad microbiológica como características sensoriales.

2.1. Conservación de alimentos

La tecnología de barreras múltiples también llamada, métodos combinados, procesos combinados, o tecnología de barreras, busca mediante una serie de técnicas establecidas como factores de conservación (barreras), mantener la calidad microbiológica del alimento. Estas barreras pueden ser la temperatura, actividad de agua (a_w), pH, entre otras.

El concepto de barreras múltiples se ha aplicado en una gran variedad de alimentos; frutas, verduras, productos de panadería, lácteos, pescado, etc. Varios factores para conservar los alimentos se siguen estudiando e implementando como la producción de bacteriocinas, el uso de empaque activos, altas presiones, tratando de mantener la vida útil del alimento por un periodo mucho más largo (vida de anaquel). La aplicación de este concepto ha sido muy exitoso, ya que el uso de barreras múltiples en el alimento logra la estabilidad microbiana y seguridad al consumidor (Leistner y Gorris, 1995).

En países en vías de desarrollo este tipo de tecnologías son aplicadas con particular interés, principalmente en alimentos frescos y mínimamente procesados. El efecto de barrera nos indica que un alimento es estable y seguro, si estas barreras no son sobrepasadas por los microorganismos presentes. A partir de la comprensión del efecto de barrera se ha desarrollado la tecnología de barreras antimicrobianas (Leistner, 2000).

2.2 Sistemas de conservación biológica

La bioconservación se define como el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), sus metabolitos, o ambos para proveer o asegurar la calidad y seguridad de los alimentos que no son considerados fermentados. La capacidad de las BAL de conservar el alimento de manera biológica han despertado el interés en su investigación ya que puede sustituir los antimicrobianos químicos o disminuir su uso, brindándole al alimento estabilidad microbiológica, controlando el crecimiento de microorganismos deterioradores y bacterias patógenas (Montville y Wintkowski, 2001).

Algunas cepas de BAL asociadas con alimentos fermentados pueden producir péptidos antimicrobianos, denominados bacteriocinas. Las bacteriocinas ofrecen la posibilidad de manipular el ecosistema microbiano de un alimento, protegiéndolo de la contaminación, o previniendo el crecimiento de bacterias patógenas específicas, dentro de las bacteriocinas encontramos a la nisina (Cotter *et al.*, 2005).

2.3 Nisina

La nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS.

Es una de las bacteriocinas mas estudiadas con actividad antimicrobiana principalmente contra bacterias Gram positivas como *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*. La bacteriocina nisina generalmente no es activa contra bacterias Gram negativas, hongos y virus (Martins *et al.*, 2010).

La nisina es un péptido de 34 aminoácidos (Figura 1), de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones postraduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen 5 variantes de esta bacteriocina, sin embargo las más utilizadas en alimentos son la nisina A y la nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina por asparagina en la nisina Z.

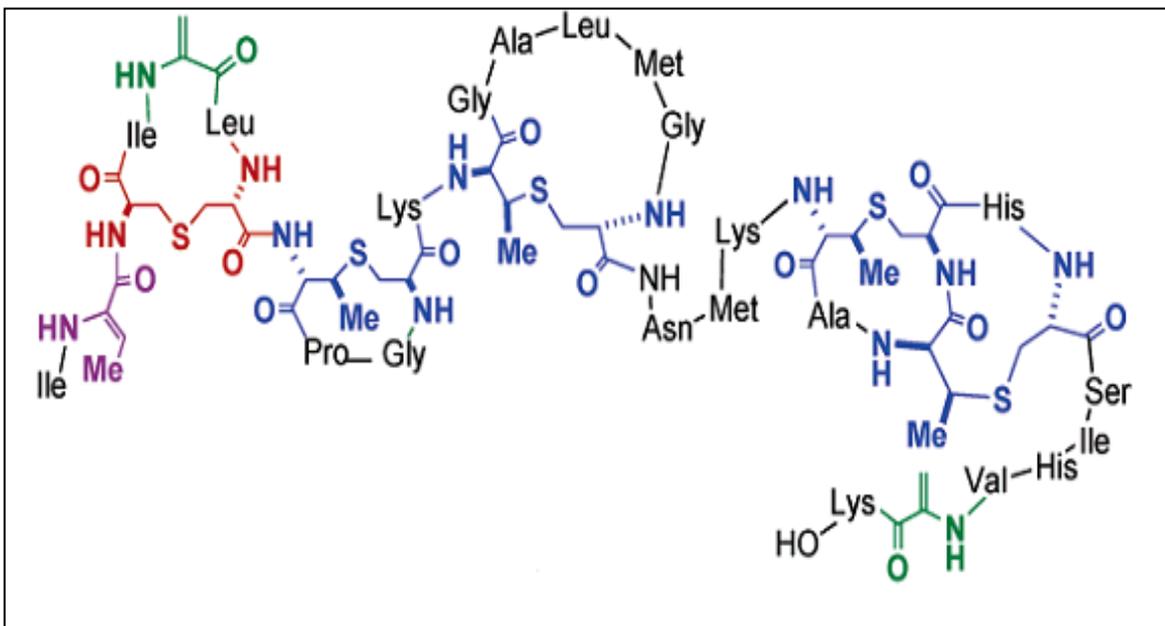


Figura 1. Estructura de la nisina (Chatterjee *et al.*, 2005)

La nisina es estable en condiciones ácidas; su solubilidad aumenta al aumentar la temperatura y disminuir el pH. Se ha demostrado que la nisina es rápidamente inactivada en el intestino por las enzimas digestivas y no puede detectarse en la saliva de humanos diez minutos después de haber consumido un líquido que la contenga (Davidson *et al.*, 2005).

2.3.1 Mecanismo de acción

La nisina ha sido mundialmente usada como conservador de alimentos, no genera resistencia significativa en los organismos sensibles a ella. Estudios recientes han demostrado que su actividad antimicrobiana se debe a un mecanismo dual, que consiste en anclarse al Lípido II, un intermediario esencial de la biosíntesis de la pared celular; seguido de la creación de poros en la membrana celular, las moléculas de lípido II son rodeadas de nisina, formándose poros. Como resultado, la biosíntesis de la pared celular es interrumpida, y los poros causan un flujo de sustancias hacia el exterior de la membrana, con lo que el potencial de la misma se dispersa.

La capacidad de formar poros se basa en la unión de la nisina con la molécula precursora de la pared celular, Lípido II (Figura 2). Los grupos amida de los extremos N-terminales de los anillos A y B de la nisina, forman una estructura en forma de caja al unirse al pirofosfato del Lípido II. Esta unión se presenta en otros lantibióticos que interactúan con el Lípido II. El extremo C terminal de la nisina se inserta en la membrana en dirección perpendicular con la bicapa, resultando poros estables de 2-2.5 nm de diámetro, que están formados por ocho moléculas de nisina y cuatro de Lípido II (Chatterjee *et al.*, 2005).

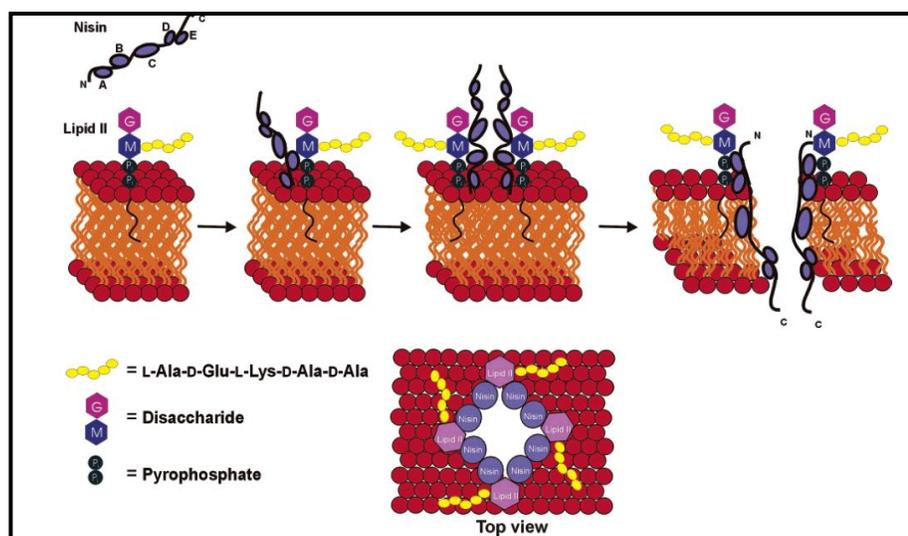


Figura 2. Interacción de la nisina con el lípido II para la formación de poros (Chatterjee *et al.*, 2005)

2.4 Aplicación de bacteriocinas en la bioconservación

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimentaria debido a que pueden ser utilizadas como conservadores naturales, cepas productoras de nisina han sido empleadas para desarrollar sistemas de cultivos protectores (Rodríguez *et al.*, 2000).

Se han utilizado en los últimos años cepas productoras de nisina como cultivos protectores para conservar el queso, y evitar el desarrollo de esporas de *Clostridium botulinum*. En leche y en productos lácteos cepas productoras de nisina como *Lactococcus lactis* han mostrado capacidad para destruir *Bacillus tuberculosis*, recientemente el enfoque principal es la capacidad para destruir *Listeria monocytogenes* en alimentos. La aplicación de nisina como aditivo en alimentos es permitida en 45 países. Existen otras bacteriocinas que no son permitidas en alimentos sin embargo, muestran potencial para la conservación por ejemplo: pediocina A muestra efecto anti-botulismo, y pediocina PA-1/AcH efecto anti-*Listeria* en productos lácteos y cárnicos. Sin embargo, existen factores extrínsecos que pueden afectar la actividad de la bacteriocina. Las bacteriocinas de la Clase I y II son resistentes al calor, pero pueden ser inactivadas por las enzimas proteolíticas del alimento (Stiles, 1996).

2.5 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis, es una BAL mesófila capaz de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad, se utilizan diversos medios para su cultivo (Salminen y Von Wright, 1993).

En estudios recientes sobre la flora asociada en queso fresco, utilizando leche pasteurizada y sin pasteurizar para su elaboración, se encontró que la cepa *Lactococcus lactis* está presente para ambos quesos, pudiendo contribuir con las características sensoriales del queso. Otras cepas que fueron identificadas molecularmente fueron *Leuconostoc mesenteroides* y *Enterococcus faecium*, de

las cuales se ha reportado su capacidad para desarrollar características sensoriales asociadas con el queso tradicional (Renyen *et al.*, 2008).

Lactococcus lactis UQ2, es una cepa aislada de un queso panela, productora de nisina A (García-Almendárez *et al.*, 2008). *L. lactis* UQ2 podría ser usado como cultivo protector para mejorar la calidad de quesos frescos, además de contribuir a mejorar las características sensoriales del producto (García-Parra *et al.*, 2009).

En estudios previos se ha observado el crecimiento de *L. lactis* UQ2, utilizando leche como medio de cultivo, alcanzando una población máxima de 10^7 UFC/mL y una producción entre 3 y 5 UI/mL de nisina (García-Parra *et al.*, 2010).

Por su baja producción de nisina se realizó una modificación por transconjugación de *L. lactis* UQ2, la cual es aceptada por la legislación de la Comunidad Europea, para ser utilizadas sin perder su grado alimenticio. La conjugación puede llevarse a cabo mediante la transferencia de trasposones o plásmidos. Se han obtenido organismos mejorados genéticamente que son utilizados en la industria láctea, esta técnica ha sido aplicada en bacterias ácido lácticas para obtener cepas mejoradas, un claro ejemplo son aquellas cepas con capacidad de resistencia a fagos (García-Parra *et al.*, 2010).

Lactococcus lactis NCDO712 contiene un plásmido, el pLP712 con un peso de 56.5 kb, proporciona la habilidad de utilizar las proteínas de la leche, así como de llevar a cabo el metabolismo de la lactosa. Este plásmido fue transferido por conjugación a la cepa nativa *L. lactis* UQ2. La cepa modificada se denominó *Lactococcus lactis* UQ2 rif^{L+} (García-Parra *et al.*, 2010).

2.6 Cultivo protector

Los principales problemas por resolver (o mejorar) son todavía los antiguos: reducir el deterioro, evitar enfermedades transmitidas por alimentos y preservar o

desarrollar el aroma, sabor y apariencia en los alimentos. Las BAL tienen mucho que ofrecer dentro de la conservación y generación del sabor los alimentos (Hansen, 2002).

Una de las necesidades primordiales en la elaboración de los alimentos es su conservación. El empleo de compuestos producidos naturalmente es una alternativa para productos artesanales, ya que estos compuestos pueden actuar como antimicrobianos, en algunos casos son derivados de la flora asociada de estos productos, lo cual permite conservar sus propiedades sensoriales.

Un cultivo protector puede mantener la calidad e inocuidad del alimento brindándole mayor vida de anaquel. En ellos encontramos a los conservadores biológicos, los cuales podrían reemplazar a los conservadores químicos, considerando que tienen la ventaja de ser de origen proteico y que al biodegradarse no forman compuestos secundarios. Las bacterias que hasta el momento se han utilizado como cultivos protectores son algunas BAL, ya que la producción de bacteriocinas de algunas de ellas así como la acidez desarrollada constituye en factor de conservación de productos lácteos (Martins *et al.*, 2010).

Estos microorganismos proporcionan sabor y textura a los alimentos, además se han utilizado desde hace muchos años en alimentos fermentados sin mostrar ningún efecto adverso a la salud del consumidor (Stiles, 1996).

2.7 Empleo de cultivos protectores en elaboración de queso

El empleo de cultivos protectores en los últimos años ha tenido un gran auge, en el afán de mantener la calidad del alimento y características sensoriales. Para ejemplificar lo anterior se muestran los siguientes ejemplos: *Lactococcus lactis* LAC309 cepa aislada de productos de la región de Nigeria, es de importancia ya que es productora de nisina. Su espectro de inhibición fue analizado mostrando efecto contra cepas de *Listeria monocytogens*, *Clostridium*

butyricum, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Fue aplicado en queso fresco Wara propio de la región de Nigeria, como cultivo protector para evitar el desarrollo de esporas de *Bacillus licheniformis* 553/1. Éste microorganismo es el principal problema en este tipo de quesos, a pesar de que la leche se somete a un proceso de pasteurización a 80°C por 10 min, el cual elimina células vegetativas, pero no actúa de igual manera contra esporas. Se reporta una reducción de 3 log UFC/g al tercer día, con un buen efecto como cultivo protector (Raheem y Saris, 2009).

El queso Dommiati es típico de Egipto y se consume tanto en fresco como madurado. Es elaborado con leche de vaca o de búfalo, salado en concentraciones de 5 al 14% lo cual depende de la estación y del tiempo de maduración. Este tipo de queso es sensible a la contaminación por esporas y bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes*, *Bacillus* y *Staphylococcus aureus*. Diferentes cepas de *Lactococcus lactis* fueron empleadas para la bioconservación de queso, ya que son productoras de nisina. Sin embargo, pueden verse involucradas en la disminución de la acción de cultivos iniciadores. La combinación de cepas productoras de nisina y cepas resistentes a nisina garantizan una adecuada formación de los cultivos iniciadores. Después de tres meses de maduración se reportan los niveles de nisina en un rango de 204 a 324 UI/g, lo cual garantiza la bioconservación del alimento durante el tiempo de almacenamiento así como mayor vida de anaquel con buena calidad microbiológica (Ayard, 2009).

2.8 Queso

2.8.1 Definición

Producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, microorganismos lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por

calentamiento, drenada, presada 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 de acuerdo a su proceso: fresco, madurado o procesado (NOM-121-SSA1-1994).

Según el Codex Alimentarius (1999), el queso se define como un producto lácteo elaborado con la cuajada de leche entera, parcial o totalmente descremada de vaca o de otra especie animal, por la coagulación de la caseína con el cuajo (quimosina o renina), otras enzimas, microorganismos lácticos, ácidos orgánicos, etc., y la adición o no de cultivos iniciadores, aditivos y condimentos.

2.8.2 Clasificación de los quesos

Los quesos se clasifican por el proceso de elaboración en: frescos (sin maduración, sin adición de fermento), quesos madurados (con maduración y adición de fermento), quesos fundidos (procesados a partir de la fusión de diferentes variedades de quesos) (Codex Alimentarius, 1999).

De acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994, los quesos se clasifican por su proceso en frescos, madurados y procesados. Dentro de los frescos encontramos; frescales (panela, canasto, sierra, rancho, fresco, blanco, enchilado adobado), de pasta cocida (oaxaca, asadero, mozzarella, del morral, adobera), acidificados (cottage, crema, doble crema, petit suisse, neufchatel). Los quesos pueden clasificarse por (a) el contenido de humedad (Cuadro 1) y (b) el proceso de elaboración.

Cuadro 1. Contenido de humedad en diferentes tipos de queso (Codex Alimentarius, 1999)

Clases	Humedad de quesos descremados % (p/p)
Frescos	60 – 80
Blandos	55 – 60
Semiduros	42 – 55
Duros	20 – 42

2.8.3 Quesos frescos

Queso fresco, producto que cumple con lo señalado en el punto 2.8.1 y se caracterizan por ser productos de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración (método de conservación que mantienen el producto a una temperatura máxima de 7°C) (NOM-121-SSA1-1994).

2.8.4 Especificaciones microbiológicas

De acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994, estos parámetros incluyen microorganismos indicadores, deterioradores y patógenos (Cuadro 2). Los quesos frescos o frescales son de consistencia desde untable hasta rebanable, de aroma y sabor característico sin olores y sabores ajenos. Si durante el muestreo los resultados del análisis microbiológico detectan la presencia de *Listeria monocytogenes*, se ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia de dicho microorganismo.

Cuadro 2 . Especificaciones microbiológicas en quesos frescos

Microorganismos	Frescos	Madurados	Procesados
	Límite	Máximo	
Coliformes fecales (NMP/g)	100	50	
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	1000	100	Menos de 100
Hongos y levaduras (UFC/g)	500	500	100
<i>Salmonella</i> en 25 g	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i>	Negativo	Negativo	Negativo

2.8.5 Conservadores

De acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994, los conservadores sólo son permitidos en queso tipo procesado (Cuadro 3).

Cuadro 3. Límites máximos de conservadores adicionados en quesos

Quesos	Límite máximo %
Madurados	
Acido sórbico o propiónico o sus sales de sodio o potasio (sólo en superficie de quesos)	0.1
Natamicina o Pimaricina (sólo en la superficie de los quesos).	0.002
Nitrato de sodio o potasio (sólo para quesos de pasta).	0.005
Procesados	
Acido propiónico y sus sales de sodio o calcio, mezclados o individualmente	0.3
Acido sórbico o sus sales de sodio o potasio, mezclados o individualmente	0.3
Nisina	0.00125

2.9 Brotes asociados al consumo de queso por *L. monocytogenes*

El queso fresco se ha visto involucrado en brotes en ya que es un producto altamente perecedero. El efecto de nisina contra *L. monocytogenes* ha sido ampliamente demostrado. Por tal su adición en leche para la elaboración de quesos como ricotta, Latino-Americano, queso blando y fresco es efectivo contra la contaminación por *L. monocytogenes*, conservado su calidad microbiológica así como extendiendo su vida de anaquel (Davies *et al.*, 1997).

Listeria monocytogenes es un microorganismo patógeno ampliamente distribuido en el medio ambiente, frecuentemente detectado en alimentos mínimamente procesados o listos para el consumo. Ha sido causa de numerosos brotes de listeriosis en Estados Unidos, Canadá y Europa. Es de gran importancia para la industria de alimentos debido a su ubicuidad (Harmark *et al.*, 1997).

Cada año en Estados Unidos aproximadamente 2500 personas contraen enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), de las cuales 500 de esas personas mueren. La listeriosis causa sólo 0.02% de ETA's, pero es origen del 27.6% de muertes, producidas por el consumo de alimentos. Personas inmunocomprometidas, recién nacidos, embarazadas, niños tienen mayor riesgo de contraer serias infecciones por *L. monocytogenes* (McDonald *et al.*, 2005).

Los quesos blancos y de pasta blanda frescos son productos mínimamente procesados y con corta vida de anaquel. Este tipo de productos han sido asociados con brotes de listeriosis (Martins *et al.*, 2010).

Existen diferentes reportes de brotes en quesos frescos que nos lleva a la búsqueda de nuevas alternativas para mantener por mayor tiempo la vida de anaquel de productos frescos así como mantener su calidad microbiológica. En quesos frescos británicos se examinaron 222 muestras de productos importados y descubrieron que 10% de ellos contenía *L. monocytogenes* en cifras que oscilaban entre 10^2 y 10^5 UFC/g. Diferentes estudios indicaron que hasta 10% estaban

contaminados con *L. monocytogenes* y que la prevalencia de este patógeno varía entre tipos de quesos. En quesos de blandos, el pH se acerca a niveles neutros, lo que estimula el crecimiento de *L. monocytogenes* (Pini y Gilbert, 1988).

2.10 Características que determinan la calidad del queso

Los pasos básicos de la transformación de la leche en queso consiste en la coagulación, desuerado y maduración. Durante la coagulación, la modificación de la caseína es posible por la acción proteolítica de enzimas o por bacterias ácido lácticas. El catabolismo de los aminoácidos libres es resultado de una serie de compuestos volátiles, como el amoníaco, aminas, aldehídos, fenoles, indoles, y alcoholes, contribuyen para dar sabor a queso (Garden *et al.*, 2002, 2005).

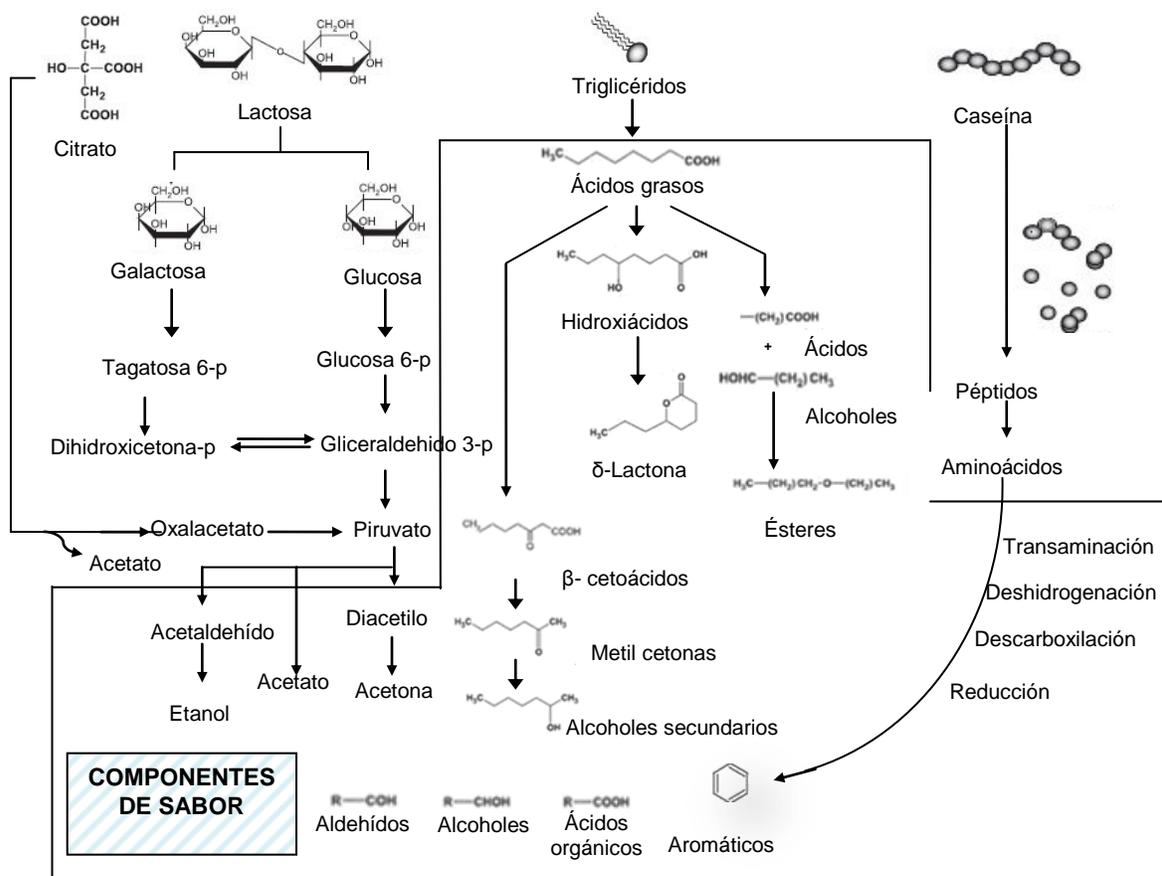


Figura 3. Degradación de los componentes del queso involucrados en la formación de componentes del sabor (Marilley *et al.*, 2004)

Los ácidos grasos libres formados por la hidrólisis de los triglicéridos así como los ésteres resultantes de su reacción con alcoholes contribuyen al sabor. Específicamente las caseínas son degradadas en péptidos y aminoácidos los cuales son precursores de compuestos volátiles aromáticos (Garde *et al.*, 2007).

Las reacciones anteriormente descritas son responsables de los cambios que se producen durante la maduración. Factores como el tiempo de maduración, pH y concentración de sal también afectan la velocidad de maduración. Aminas, aldehídos, alcoholes y amonio, derivados de la degradación de aminoácidos, son importantes en el desarrollo del sabor del queso al igual que la formación de ácidos grasos libres. Los compuestos volátiles como metil cetonas, tioésteres y lactonas resultan del catabolismo de los ácidos grasos libres juegan un gran papel en el sabor del queso.

La proteólisis es la más importante reacción bioquímica y juega un papel vital en el desarrollo de textura y sabor. Las enzimas proteolíticas proporcionan una mezcla de aminoácidos así como cambios directos en el sabor del queso. Los aminoácidos son precursores de compuestos volátiles de aroma, los cuales son degradados a compuestos como aminas, aldehídos, alcoholes y amonio compuestos que participan en la formación de sabor y aroma (Figura 3). La hidrólisis de proteínas juega un papel importante durante la actividad proteolítica lo cual conduce a cambios de textura en la matriz del queso.

Se cree que el catabolismo de los aminoácidos es logrado por BAL, las cuales son responsables de la formación de aroma en queso cheddar. Los aminoácidos son catabolizados por dos diferentes vías; una conduce a la formación de compuestos azufrados, mientras que la otra se inicia por reacciones de transaminación, vía principal de la degradación de aminoácidos por BAL. Estas reacciones conducen a la formación de α -cetoácidos los cuales comienzan a degradarse en componentes de aroma (Marilley *et al.*, 2004).

2.10.1 Sabor y aroma del queso

Los componentes específicos del sabor y aroma del queso son difíciles de distinguir, ya que se hallan en una mezcla equilibrada y compleja. La proteína es casi insípida, pero tiene tanta influencia como la materia grasa, ambas diluyen, suavizan y mezclan íntimamente los diversos sabores. Los productos finales de la proteólisis son sápidos; las peptonas son amargas, por lo que no deben ser demasiado abundantes. Los aminoácidos libres desempeñan un gran papel son causa de sus diversos sabores. Algunos tienen un sabor azucarado: glicina, alanina, serina etc., otros amargo: leucina, lisina, triptófano entre otros. La tirosina es insípida y la cistina tienen un singular sabor a caucho; los diácidos (aspártico y glutámico) tienen un sabor a caldo. El sulfuro de hidrógeno (H_2S), siempre presente como trazas, se considera como un componente de aroma. Los productos de degradación de la lactosa: ácidos volátiles (acético, propiónico, butírico, etc.), cetonas (diacetilo), ésteres, son sápidos y odorantes. El ácido láctico imparte un sabor refrescante a los quesos frescos.

La hidrólisis de la lactosa produce moléculas de glucosa y galactosa, donde la glucosa pasa a piruvato. El piruvato es iniciador de formación de cadenas-cortas componentes del sabor tal como diacetilo, acetona, acetato, acetaldehído y etanol. La proteólisis contribuye directamente a los sabores del queso por la liberación de péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos son productos de la transaminación, deshidrogenación, descarboxilación y reducción. Participa en la formación de una amplia variedad de compuestos aromáticos como ácido fenil acético, *p*-cresol, metano tiol, dimetil disulfuro, 3 metil-butirato, 3-metil 2-butanona, 2-metil propionato, 2-metil 1-propanal, 2-metil butirato y 2-metil butanal (Marilley., *et al.*, 2004).

2.10.2 Lipólisis en queso

La grasa en la leche es esencial para el desarrollo de sabor. Los lípidos en queso pueden ser oxidados o hidrolizados, la oxidación es poco probable por el bajo potencial redox en quesos. La hidrólisis de los triglicéridos de la leche forma ácidos grasos de cadena corta e intermedia (C4:0–C8:0 y C10:0–C14:0 respectivamente), estos junto con la formación de compuestos volátiles, están directamente relacionados con el sabor de queso. Los ácidos grasos libres de cadena larga (mayor a 14 átomos de carbonos), juegan un menor papel en el sabor del queso (Delgado *et al.*, 2009).

Los ácidos grasos de cadena corta tienen un impacto considerable en el sabor. Sin embargo, la intensa lipólisis en queso es indeseable por el desarrollo de rancidez. Los ácidos grasos reaccionan con grupos de alcohol para formar ésteres como butanoato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de etilo, octanoato de etilo, etil decanoato y hexanoato de metilo (Marilley *et al.*, 2004).

La degradación lipolítica de triglicéridos de la grasa de la leche, conduce a la formación de aminoácidos libres los cuales son catabolizados a compuestos volátiles como metil cetonas, tioesteres y lactonas (Azarnia, 2006).

Los ácidos grasos libres no son los únicos componentes del aroma, pero también son precursores de una serie de reacciones catabólicas, para formación del sabor y componentes del aroma como metil-cetona, lactonas, ésteres, alcanos y alcoholes secundarios (Delgado *et al.*, 2009).

2.10.3 Influencia de bacterias ácido lácticas en la calidad del queso

Las bacterias ácido lácticas juegan un importante papel en el desarrollo del sabor ya que participan en la hidrólisis de la caseína formando pequeños péptidos y aminoácidos los cuales son precursores de los componentes del sabor. La incorporación de cepas productoras de nisina han mostrado lisis celular así como

liberación de enzimas intracelulares, las cuales se han visto involucradas con la mejora del sabor en quesos (Sallami *et al.*, 2004).

El uso de nisina y lacticina producida por *Lactococcus lactis* presentó una lisis temprana en queso hispánico con un incremento significativo en la formación de compuestos volátiles. Sin embargo, la presencia de cultivos iniciadores y protectores no es suficiente para explicar la formación de sabor en queso elaborado a base de leche sin pasteurizar. La flora nativa juega un papel importante en el sabor del queso (Garde *et al.*, 2007).

La nisina inhibe un amplio rango de bacterias patógenas y esporas en alimentos demostrando amplia aplicación en la industria. La habilidad lítica de las bacteriocinas tiene una amplia aplicación en la aceleración de maduración del queso. La lisis se produce por cultivos iniciadores y da como resultado enzimas como lactato deshidrogenasa (LDH) y dipeptidil prolina aminopeptidasa (PepX) los cuales producen el rompimiento de la caseína en pequeños péptidos y aminoácidos en el queso.

Ensayos en la elaboración del queso usando *L. lactis* subsp. *lactis* DPC3286 productora de lactococcina ABM, utilizada como cultivo iniciador, muestran el incremento en la lisis celular, aumentando la producción de enzimas y sobre todo reduciendo el amargor comparado con el queso control. Sin embargo el problema que puede ser encontrado con el uso de estas bacteriocinas es la velocidad con la que pueden acidificar (Guinane *et al.*, 2005).

En la búsqueda del desarrollo de productos innovadores para satisfacer las necesidades del consumidor, es necesaria la identificación de los compuestos involucrados en la formación de características sensoriales de productos tradicionales. En el caso de quesos el uso de leche sin pasteurizar brinda un buen sabor al queso. Sin embargo, se exponen a riesgos potenciales por contaminación por patógenos (Cayot *et al.*, 2007).

2.11 Determinación de compuestos de sabor en queso

El sabor es definido como la combinación de aroma y sabor, en donde la bioquímica del sabor es inseparable de la bioquímica del queso. El resultado del sabor único del queso es consecuencia de complejas reacciones (Randazzo *et al.*, 2008).

Notables esfuerzos se han hecho para la caracterización de perfiles de sabor en diferentes variedades de queso. La cromatografía de gases (CG) es la más comúnmente utilizada para la determinación de compuestos volátiles en quesos. Generalmente los componentes volátiles de sabor en queso se encuentran presentes en trazas y se requiere de su aislamiento y concentración para su análisis mediante CG. El método de microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (conocido por sus siglas en inglés como HS-SPME, headspace solid-phase microextraction) está basado en la adsorción del analito en una fibra cubierta de sílice, que puede ser introducida en la muestra o expuesta sobre ella. Este método no utiliza solventes para su extracción y es de relativamente bajo costo. Los compuestos que se adsorben en la fibra son térmicamente desorbidos en la columna del cromatógrafo de gases por inserción de la fibra del SPME dentro del puerto inyector (Figura 4) (Chin *et al.*, 1996).

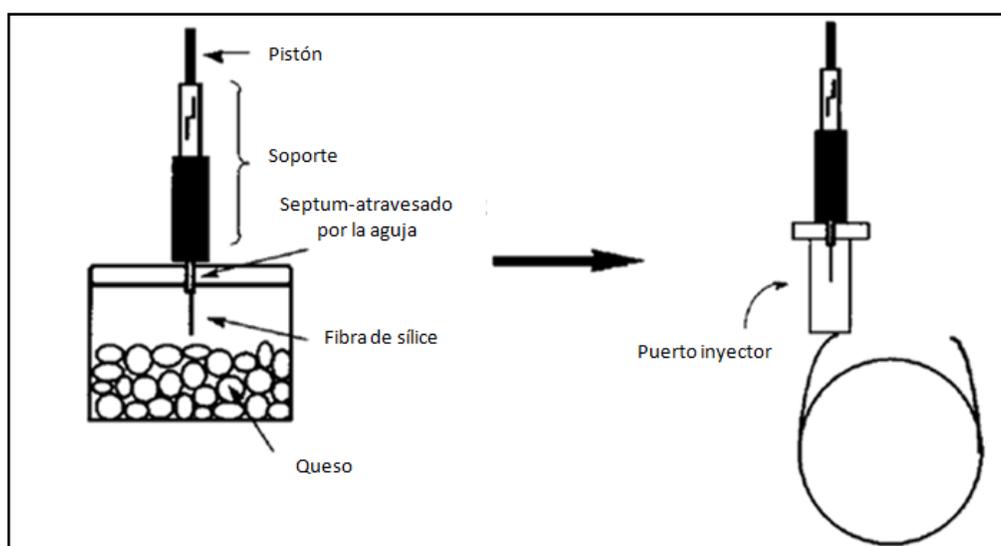


Figura 4. Muestreo en el espacio de cabeza de compuestos volátiles en queso (Chin *et al.*, 1996)

La SPME se ha utilizado ampliamente para extraer los componentes volátiles de los alimentos lácteos, como queso, leche en polvo, leche con chocolate, fórmulas infantiles y leche líquida procesada. La leche fresca de bovino se distingue por su sabor delicado, que puede ser empañado por los sabores desagradables de diferentes compuestos. El mal sabor es directamente responsable de rechazo del producto por el consumidor, por lo tanto, su medición cuantitativa ha atraído mucho interés. Tratamientos térmicos aplicados a la leche, en particular el tratamiento UHT promueve el desarrollo de compuestos derivados térmicamente, causa del mal sabor, entre los cuales encontramos aldehídos, metil cetonas y varios compuestos azufrados (Burbank y Quian, 2005; Vázquez-Landaverde *et al.*, 2007).

Los estudios para la optimización de SPME en el queso se han centrado en la adecuada selección de las fases sólidas, tiempo de exposición de la fibra, la influencia de la temperatura de absorción, la porción de la muestra y el volumen del espacio de cabeza. Sin embargo, se ha demostrado que para incrementar la reproducibilidad y sensibilidad del análisis de compuestos volátiles en queso, necesario un tratamiento previo de la muestra para mejorar la obtención de los compuestos volátiles (Jae-Hwan *et al.*, 2003).

La adición de NaCl en la preparación de la muestra mejora la efectividad de la solubilidad del analito. La agitación generalmente reduce el tipo de extracción. Se ha observado que la adición de 25% de NaCl incrementa significativamente el área de los picos, produciendo una disminución de la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos por competencia con moléculas de agua, lo cual se conoce como insolubilización por aumento en la concentración de sal (“salting out”) (Januszkiewicz *et al.*, 2008; Jae-Hwan *et al.*, 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

En la elaboración de queso tipo panela frecuentemente se utiliza leche sin pasteurizar la cual le brinda al producto sabores y olores característicos. Sin embargo, el consumidor desconoce el riesgo potencial al que se expone al consumir este tipo de productos. Al utilizar leche pasteurizada y diferentes medidas como el uso de barreras múltiples se mantienen la calidad e inocuidad del alimento por mayor tiempo.

Se ha considerando el uso de co-cultivos o cultivos protectores para la elaboración de productos lácteos tradicionales elaborados con leche pasteurizada, lo cual representa un reto para la comunidad científica, ya que se busca que un cultivo protector confiera la característica de los quesos artesanales, siendo doblemente efectivo, por una parte brindando características sensorialmente aceptables y por otra, protección al alimento mediante la producción de agentes antimicrobianos como nisina.

El uso de *Lactococcus lactis* UQ2 rif^{L+}, cepa productora de nisina capaz de utilizar la lactosa como fuente de carbono, adicionada como cultivo protector podría favorecer la bioconservación de queso tipo panela y desarrollar compuestos de sabor, ayudando a la aceptación del consumidor.

IV. HIPOTESIS

La cepa *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ productora de nisina al incorporarse a queso panela como cultivo protector, es capaz de favorecer la bioconservación y el desarrollo de compuestos de sabor, fomentando así la aceptación del consumidor

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Incorporar *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ en queso panela y evaluar su efecto en la bioconservación y desarrollo de compuestos de sabor.

5.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la producción de nisina por *L. lactis* UQ2 rif L⁺, utilizando leche como medio de cultivo.
- ✓ Elaborar queso fresco tipo panela adicionando como cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L⁺, a partir de leche pasteurizada y sin pasteurizar.
- ✓ Evaluar el desarrollo de *L. lactis* UQ2 rif L⁺, microorganismos indicadores y producción de nisina así como realizar análisis proximal y fisicoquímico durante la vida de anaquel del queso.
- ✓ Evaluar el comportamiento de formación de compuestos de sabor en queso adicionado del cultivo protector, durante la vida de anaquel.
- ✓ Realizar análisis sensorial de queso fresco tipo panela incorporado del cultivo protector.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Materiales

6.1.1 Material biológico

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

La quimosina fue la enzima utilizada para la hidrólisis parcial de la caseína de la leche, de la marca Qualact (México) de fuerza 1:7500, (1 L de cuajo coagula 7 500 L de leche).

6.1.2 Antimicrobianos

- Nisina (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA), rifampicina y ampicilina (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

6.2. Soluciones y medios de cultivo

Diluyente de peptona al 0.1%: Se pesó 0.1 g de peptona bacteriológica (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), por cada 100 mL de agua destilada, se distribuyó en frascos de vidrio y esterilizó en autoclave.

Tween 20 al 50%: Se disolvió Tween 20 (Hycel, México) en agua destilada en partes iguales 1:1, se esterilizó en autoclave.

Solución de ampicilina trihidratada (20 g/L): Pesar 0.1 g de ampicilina (Sigma) y diluir en 5 mL de agua destilada, esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.45 µm de tamaño de poro (Durapore, Millipore, Irlanda).

Solución de rosa de bengala (50 mg/L): Pesar 50 mg de rosa de bengala (Merck, Darmstadt, Alemania) para 1 L de medio agar papa dextrosa (Bioxon, Cuautitlán, México), disolver en la mínima cantidad de agua destilada y esterilizada (1 mL), esterilizar por filtración.

Solución Ringer: Pesar 0.9 g de cloruro de sodio, 0.042 g de cloruro de potasio (Sigma), 0.024 g de cloruro de calcio anhidro y 0.020 g de bicarbonato de sodio (Sigma), y aforar a 100 mL.

Solución de ácido tartárico (10% p/v): Pesar 10 g de ácido tartárico (Sigma), agregar 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.

Agar MRS al 1%: Para 100 mL, se disolvieron 5.5 g de caldo MRS (Oxoid), 1 g de agar bacteriológico (Bioxon, Cuautitlán, México) en 100 mL de agua destilada, se calentó hasta su dilución completa, se ajustó el pH del medio a 6.5 ± 0.2 , se distribuyó en tubos de ensayo y esterilizó en autoclave.

Agar assay al 1%: Para 100 mL, se disolvieron 1 g de peptona bacteriológica (Oxoid), 0.3 g de extracto de carne (Bioxon, Cuautitlán, México), 0.3 g de cloruro de sodio (Sigma), 0.15 g de extracto de levadura (Bioxon, Cuautitlán, México), 0.1 g de azúcar moscabado (Dillis, Técnica Mexicana de Alimentación, México), y 1 g de agar bacteriológico. En 100 mL de agua destilada, se mezcló y calentó hasta disolver, se ajustó a un pH final a 7.5 ± 0.2 , se esterilizó en autoclave.

Agar papa dextrosa (Bioxon): Para 1000 mL se pesaron 39 g y se disolvieron en de agua destilada, se llevó a un pH de 5.6 ± 0.2 , se puso a ebullición durante un min, seguido de esterilización en autoclave a 121 °C por 15 min. Se agregó a temperatura ambiente 2 mL de solución de ampicilina, 0.052 mL/L de rosa de bengala esterilizada en frío y se llevó a un pH de 3.5 ± 0.2 agregándole 14 mL de ácido tartárico (10% p/v) esterilizado en frío.

Medio de cultivo lactosa púrpura de bromocresol con rifampicina (BPC): peptona 0.5 % (p/v), extracto de carne 0.3 % (p/v), lactosa o glucosa 1 % (p/v) (Sigma), púrpura de bromocresol 0.004 % (p/v) (Merck), rifampicina 200 µg/mL (Sigma), agar 2 % (p/v). Este medio fue utilizado para identificar las cepas transconjugantes resistentes a rifampicina.

Caldo lauril triptosa (Difco): Para 1000 mL se pesaron 35.6 g se disolvieron de agua destilada, se llevó a un pH de 6.8 ± 0.2 . Se adicionaron 10 mL del medio en tubos de ensaye en los cuales previamente se colocó una campana de fermentación. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.

Caldo lactosa bilis verde brillante (Merck): Para 1000 mL se pesaron 40 g se disolvieron de agua destilada, se llevó a un pH de 7.2 ± 0.2 . Se adicionaron 10 mL del medio en tubos de ensaye en los cuales previamente se colocó una campana de fermentación. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.

6.3 Métodos

La parte experimental del proyecto se ilustra mediante un diagrama general (Figura 5), que comienza con la elaboración del producto (queso tipo panela) adicionado de un cultivo protector. Al producto se le realizaron diferentes análisis: microbiológico, fisicoquímico, proximal, así como la evaluación de la formación de compuestos de sabor durante el periodo de vida de anaquel y aceptación del consumidor.

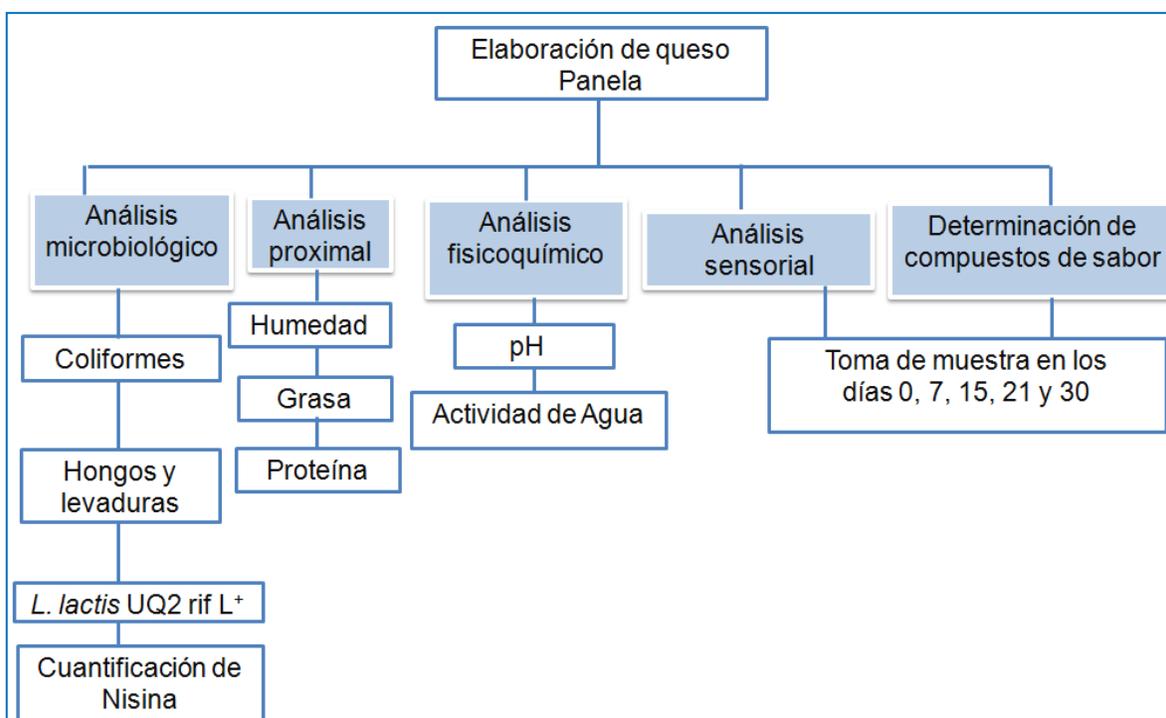


Figura 5. Esquema general, parte experimental

6.3.1 Elaboración de queso panela

En primer lugar se llevó a cabo la recepción de la leche, la cual se mantuvo a 4°C hasta su proceso. Se sometió a pasteurización lenta (63°C por 30 min), terminado el proceso de pasteurización se bajó la temperatura a 30°C en este momento se agregó el inóculo al 1% (v/v), se dejó reposar por 30 min para

asegurar crecimiento de *L. Lactis* UQ2 rif L⁺, transcurrido este tiempo se agregó el cloruro de calcio (0.4 mL/L; Baker, Xalostoc, México).

Posteriormente, se adicionó el cuajo microbiano, 0.05 g/L (Qualact, México), se agitó constantemente para lograr su completa incorporación. Se dejó reposar por 20 min favoreciendo la formación de la cuajada, para posteriormente por medio de las liras realizar el corte de manera horizontal y vertical, se dejó reposar 10 min más para lograr un desuerado lento del grano, manteniendo una temperatura de 32°C. En seguida se agitó lentamente para favorecer el desuerado, aumentando poco a poco la velocidad de agitación, con el fin de obtener un grano firme.

Se procedió a la eliminación parcial del suero (3/4 partes), y salado empleando NaCl (Baker, Xalostoc, México) 0.6% (p/v) (respecto al volumen inicial de leche), seguido de un desuerado total. La pasta obtenida fue colocada en moldes, en donde se continuó el desuerado por autoprensado durante 12 h a 4 °C, se desmoldo y se empacó (Figura 6).

Se elaboró queso tipo panela utilizando leche pasteurizada con adición y sin adición de un cultivo protector y su control sin pasteurizar. Obteniendo cuatro diferentes tratamientos: el primero utilizando leche pasteurizada y con la adición del cultivo protector (P-CI), el segundo utilizando leche pasteurizada y sin adición del inóculo (P-SI), el tercero utilizando leche sin pasteurizar y con la adición del inóculo (SP-CI) y el cuarto utilizando leche sin pasteurizar y sin la adición del inóculo (SP-SI).



Figura 6. Elaboración de queso tipo panela adicionado del cultivo protector

6.4 Análisis Microbiológico

6.4.1 Activación de cepas microbianas

La activación se realizó a partir de conservas bacterianas Gram positivas, almacenadas a -70°C en el ultra-congelador, las cuales se colocaron en tubos con 3 mL de caldo estéril específico para cada microorganismo, se incubaron posteriormente a la temperatura y el tiempo óptimo según correspondió.

Para la activación de *L. Lactis* UQ2 rif L⁺, se tomó del ultra-congelador la conserva, se colocó en medio M17 (Oxoid) suplementado con lactosa (α -Lactosa monohidratada $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}\cdot\text{H}_2\text{O}$, Sigma) al 10% (p/v), el tubo fue incubado a 30°C por un lapso de 24 h. La segunda resiembra se realizó en leche bronca esterilizada y se incubó por 12 h a 30°C ; la tercera resiembra se realizó en el mismo medio ahora suplementado con $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt), 0.5/0.1 g/L respectivamente. La cuarta resiembra se realizó en suficiente leche bronca estéril para inocularse posteriormente en la leche pasteurizada (no se adicionaron sales en este paso) y se incubó por 12 h a 30°C . El inóculo se adicionó al 1% (v/v) en las diferentes resiembras y en la leche pasteurizada empleada para la elaboración del queso.

Para la activación de *Micrococcus luteus* NCIB 8166, microorganismo indicador sensible a nisina, se usó medio Assay (Tramer y Fowler, 1964; British Standard 4020, 1974). La cepa se tomó del ultra-congelador (-70°C), se colocó en un tubo con 3 mL de caldo Assay, se incubó a 30°C por 48 h. Posteriormente se sembró en tubos inclinados con agar Assay y se incubó 30°C por 48 h, del tubo se obtuvo con ayuda de solución Ringer $\frac{1}{4}$ una suspensión concentrada del microorganismo, el cual se mantuvo a 4°C .

6.4.2 Método de recuento bacteriano Miles-Misra

Se prepararon una serie de diluciones de la suspensión bacteriana. Se tomaron 100 μL de la suspensión concentrada en un microtubo con 900 μL de agua peptonada al 0.1% (Figura 7). Se homogenizaron en el vórtex, y de este tubo se tomaron 100 μL y se vaciaron a otro tubo con 900 μL de diluyente de peptona, se homogenizaron, y se repitió el procedimiento hasta obtener las diluciones deseadas (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

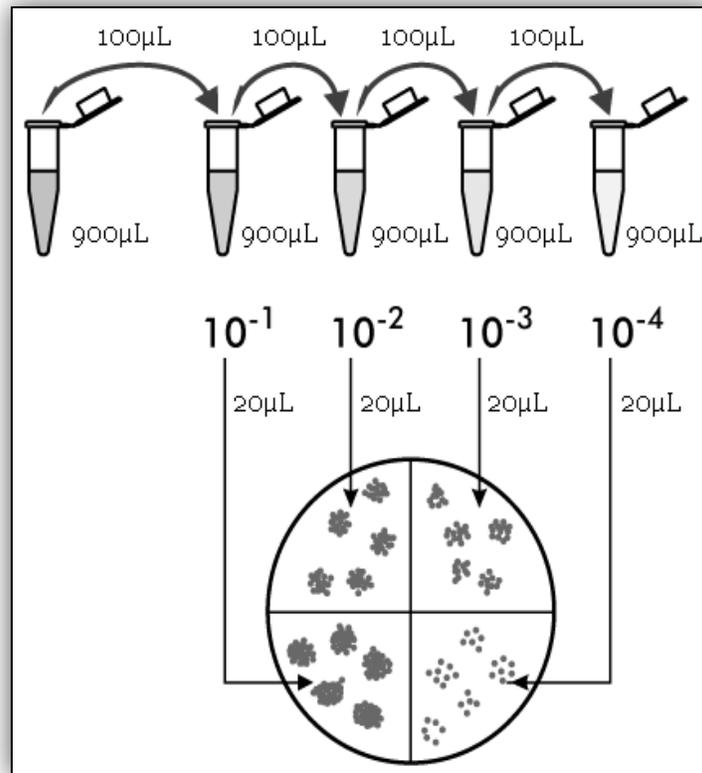


Figura 7. Método de recuento bacteriano Miles-Misra

6.4.3 Recuento total de bacterias

Para el recuento de microorganismos se colocaron 10 g de muestra en un frasco de dilución, y se agregaron 90 mL de peptona de caseína al 0.1% (p/v). Las muestras se homogenizaron y posteriormente se diluyeron en peptona de caseína, tomando 1 mL de la primera dilución la cual se diluyó en 9 mL de agua peptonada

estéril y se homogenizó. Este procedimiento se realizó tantas veces como fue necesario, hasta obtener las diluciones deseadas.

6.4.4 Recuento de hongos y levaduras

La cuenta de hongos y levaduras se realizó en agar papa dextrosa (PDA). Se colocó 1 mL de la dilución deseada en una caja petri estéril, en seguida se agregan 20 mL de medio, se homogenizó y dejó solidificar para incubar posteriormente a 22°C durante 5 días (NMX-F-255-1978).

6.4.5 Determinación de coliformes fecales

Prueba presuntiva. Inocular con 1 mL de la primera dilución en tres tubos que contienen 10 mL de caldo lauril triptosa, se realizó lo mismo con la segunda y tercera dilución, para al final tener nueve tubos de lauril triptosa inoculados, tres para cada dilución, se incubaron durante 48 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Los tubos se examinaron a las 24 ± 2 h y observó si existía acumulación de gas en la campana Durham y se re-incubaron 24 h más. La presencia de gas en cualquier cantidad, dentro de 48 h da positiva la prueba.

Prueba confirmatoria. Se agitaron suavemente los tubos de caldo lauril sulfato triptosa que resultaron positivos. Se transfirieron de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo de la prueba presuntiva, a tubos con caldo lactosa bilis verde brillante y agua peptonada. Los tubos fueron incubados a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en un baño de agua y se observó si existía producción de gas a las 24 y 48 h.

Realizar la prueba de indol, se adicionó un tubo de agua peptonada de 2 a 3 gotas de reactivo de Kovac (Merck). El resultado se determinó de acuerdo con la tabla de número más probable (Anexo E), tomando como base el número de tubos en que se observó producción de gas de acuerdo a la NOM-112-SSA1-1994.

6.4.6 Recuento de *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺

El medio utilizado para el recuento de la población de *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ fue realizado en agar de purpura de bromocresol (BPC). El conteo se realizó mediante la técnica de Miles-Misra, se incubó a 30 °C por 48 h (García-Parra *et al.*, 2010).

6.4.7 Extracción de nisina en queso

Para la determinación de nisina se pesaron 40 g de la muestra de queso en un matraz Erlenmeyer de 500 mL los cuales se disolvieron en 160 mL de ácido clorhídrico 0.02 N, se ajustó el pH a 2 con HCl 0.5 N, se calentó el extracto por 5 min en baño maría a ebullición, al finalizar se neutralizó la muestra con NaOH 0.5 N a pH 6.5 (paso empleado ya que la cepa es productora de igual forma de ácido láctico el cual interfiere en la cuantificación de nisina, es por esto que se realiza una neutralización). Se ajustó el volumen con agua destilada a 210 mL. La muestra se centrifugó a 11000 rpm por 30 min a 4°C, al finalizar se retiró la capa de grasa de la superficie y se decantó el líquido, la pastilla se desechó. El sobrenadante se clarificó y esterilizó mediante una membrana de 0.45 µm de tamaño de poro (Durapore, Millipore, Irlanda), obteniendo extracto de nisina. El ajuste del pH se realizó debido a que se tuvo dificultad por precipitación de la proteína y no se observaba separación de fases, aunque esto no lo menciona la técnica (BS 4020, 1974), por lo cual también se modificó la velocidad y tiempo de centrifugación como se indica arriba.

La concentración de nisina fue determinada de acuerdo al BS 4020 (1974), mediante pruebas de difusión en agar. Para la preparación del medio se utilizaron cajas petri (14 cm de diámetro) se adicionaron 40 mL de medio (agar assay 1%), previamente suplementado con 50 µL de Tween 20 al 50% (v/v) (Hycel) e inoculado con 400 µL de *Micrococcus luteus* (cultivo ajustado a una densidad óptica A₆₅₀ de 0.3). Una vez solidificado el agar, se realizaron fosas de 4 mm de diámetro utilizando un horador estéril del No. 4. Dentro de la fosa se colocaron

60 µL del extracto de nisina. La caja fue incubada a una temperatura de 30°C durante 48 h. La zona de inhibición se midió en mm y la concentración obtenida fue calculada mediante una curva estándar de nisina (Bhunia y col., 1988).

La curva estándar de nisina, se realizó colocando diferentes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 UI/mL de nisina, en leche descremada a un pH de 6.5 (British Standard 4020, 1974). Previamente se preparó una solución patrón de de nisina con una concentración de 1000 UI/mL (Anexo A).

6.5 Análisis fisicoquímicos

6.5.1 Determinación de humedad

Se tomaron muestras de queso de 2 g las cuales se colocaron a peso constante en un horno (Binder, Tuttlingen, Alemania) a 100 °C por 1 h. Transcurrido éste tiempo se colocaron en un desecador, se pesaron, y se pusieron nuevamente en el horno por 30 min, para luego enfriar y pesar. Esto se realizó hasta obtener un peso constante (NOM-116-SSA1-1994). Mediante diferencia de pesadas se obtuvo el porcentaje de humedad, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{G_0 - G_1}{G_0} \right) \times 100$$

Donde: G_0 = peso de muestra húmeda

G_1 = peso de muestra seca

6.5.2 Determinación de actividad de agua

Se realizó utilizando el equipo Aqua Lab CX-2, el cual se calibró con una solución saturada de KCl $A_w=0.843$ a 25 °C. Una vez calibrado se colocó una capa

delgada de muestra de aproximadamente 1.0 g en la celda y se procedió a toma de la lectura.

6.5.3 Medición de pH

Se determinó empleando un potenciómetro (Corning), 1 g de muestra triturada se homogenizó con 10 mL de agua destilada recientemente hervida y a temperatura ambiente, se procedió a tomar la lectura (NMX-F-099-1970).

6.6 Análisis proximales

6.6.1 Determinación de grasa

Se pesaron exactamente 3.0 g de muestra y colocaron en el portamuestra del butirómetro, se le adicionaron lentamente por la pared 10 mL de ácido sulfúrico con una densidad de 1.52 g/mL, agua caliente a 35-40°C (el volumen del agua dependió del butirómetro) y 1 mL de alcohol isoamílico. Se tapó el butirómetro y se agitó hasta la disolución del coágulo invirtiendo varias veces con el fin de evitar la proyección del tapón. Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min, se realizó la lectura observando la columna transparente de la grasa separada (NMX-F-100-1984).

6.6.2 Determinación de proteína

Se peso un gramo de muestra molida y homogenizada, se colocó dentro del tubo de digestión, se adicionaron 10 g de sulfato de potasio (Baker), 60 mg de sulfato de cobre (Baker) y 15 mL de ácido sulfúrico (Baker) concentrado, este último se adicionó haciéndolo resbalar por las paredes del matraz.

Se colocó el tubo de digestión dentro del digestor, el cual se precalentó a 100°C, se incrementó la temperatura paulatinamente hasta 400 °C. El tiempo de

digestión cambió dependiendo del sistema de remoción de vapores, de 45 min a 2 h, la temperatura no excedió los 410 °C.

Se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 40 °C, se agregaron 100 mL de agua destilada, resbalándola por las paredes del matraz, mezclando con precaución debido a que es una reacción altamente exotérmica. Se colocó el tubo de digestión en el destilador de proteínas y un vaso de precipitado 25 mL de ácido sulfúrico 0.2 N utilizando 2 gotas de rojo de metilo como indicador. Se encendió el destilador y se adicionaron lentamente 50 mL de hidróxido de sodio al 50% (p/v). Se destiló la muestra hasta obtener aproximadamente 200 mL de destilado. Se efectuó la titulación con hidróxido de sodio 0.2 N, hasta el vire del indicador de amarillo a rosa-rojo. Se anotó el número de mL gastados de HCl (NMX-F-098-1976).

Cálculos:

$$\% \text{ de Nitrogeno} = \frac{(Va - Vb) * 0.014 * 100}{P}$$

Va = volumen de ácido sulfúrico gastado en la titulación, en mL

Vb = Volumen de ácido sulfúrico gastado en la titulación del blanco

P = masa o peso de la muestra, en gramos.

0.014 = miliequivalente del nitrógeno.

$\% \text{ de proteína} = (\% \text{ de } N) (\text{factor})$

$\text{Factor} = 6.38$, para productos lácteos.

6.7 Análisis de compuestos volátiles mediante HS-SPME

Se realizaron tres réplicas de cada proceso de elaboración de queso, y cada queso fue analizado por triplicado en cada uno de los días 0, 7, 14, 21 y 30. Para la preparación de la muestra se pesaron 30 g de queso tipo panela y se adicionaron 60 mL de agua destilada deodorizada (Jae-Hwan et al., 2003; Verzera et al., 2004), se homogenizó con ayuda de un ultra-turrax (T25 basic IKA-WERKE), por un lapso de 1 min a 21500 rpm hasta obtener una pasta homogénea. Se colocó en viales previamente esterilizados con 0.5 g de NaCl (J. T. Baker), en los cuales se colocó 2 g de la pasta y 0.01 g de solución de Mentol al 0.01% en metanol (pureza del 99%, Sigma Adrich) como estándar interno. Los viales se sellaron con ayuda de una engargoladora (Hand crimper), la muestra se congeló a -17°C hasta su análisis.

La extracción de compuestos volátiles se llevó a cabo utilizando la técnica HS-SPME modificada de la técnica de Verzera et al., 2004. Para la extracción de los compuestos se utilizó un automuestreador MPS2 (Gerstel Inc., Maryland, EUA) con una fibra 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 500 rpm. La extracción se llevó a cabo durante 1 h a 45°C y con una agitación constante de 500 rpm. Una vez transcurrido el tiempo los compuestos fueron desorbidos de la fibra en el puerto inyector por 5 min a 250°C en el modo “splitless”.

Los compuestos volátiles fueron analizados usando un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, Inc., Wilmington), acoplado a un detector de espectrometría de masas. Se utilizó una columna capilar HP-5 (60 m x 0.32 mm de diámetro, 0.52 µm de espesor de fase, Agilent Technologies Inc., California, EUA). El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 40°C por 5 min (inicial), posteriormente con una velocidad de 3°C/min incremento a 70°C consecutivamente incremento a 92°C con una velocidad de 1.5 °C/min por ultimo

con una velocidad de 30°C/min incremento a 250°C donde se mantuvo durante 5 min. El gas de arrastre utilizado fue Helio (pureza 99.999%), a flujo constante dentro de la columna de 1 mL/min.

Se acoplo la salida del cromatógrafo a un detector de espectrometría de masas cuadrupolar modelo 5975C (Agilent Technologies, Inc., California, EUA). Se utilizó el modo de impacto electrónico, 70 eV, temperaturas de línea de transferencia, fuente y cuadrupolo de 280°C, 230°C y 150°C respectivamente, y un rango de masas de 33 a 750 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 (Figura 8).



Figura 8. Cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, Inc., California, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas 5975C (Agilent Technologies, Inc., California, EUA), equipado con un auto-muestreador MPS2 (Gerstel Inc., Maryland, EUA)

6.8 Análisis sensorial del queso

Se elaboró una hoja de respuestas para observar la aceptación del consumidor del queso tipo panela (Anexo C). Se hicieron dos quesos, uno adicionado del cultivo protector y un control sin cultivo. Se efectuó una prueba sensorial utilizando una escala hedónica (que va desde un “me gusta mucho” a un “me disgusta mucho”), mediante la cual se fue evaluando la aceptación de aroma, sabor y agrado. La evaluación sensorial se realizó durante un lapso de 21 días a los 0 d, 7 d, 14 d, y 21 d. La evaluación se realizó con un panel no entrenado de 50 personas y fue realizada por duplicado.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis microbiológico

7.1.1 Cinética de crecimiento de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ en leche

Se evaluó la adaptación del microorganismo en leche, ya que es la materia prima para la elaboración del queso, previo a la elaboración del producto. Se realizó una cinética de crecimiento en leche bronca esterilizada a 112 °C por 15 min, el inóculo se adicionó al 1% v/v. Se incubó a 30 °C por un lapso de 24 h, tomando muestra cada 2 h las primeras 12 h y una muestra final a las 24 h. En los resultados se observa una máxima población de 9.7×10^9 UFC/mL a las 8 h (Figura 9), de igual forma en el mismo tiempo se presenta la máxima producción de nisina de 997 UI/mL (Figura 10).

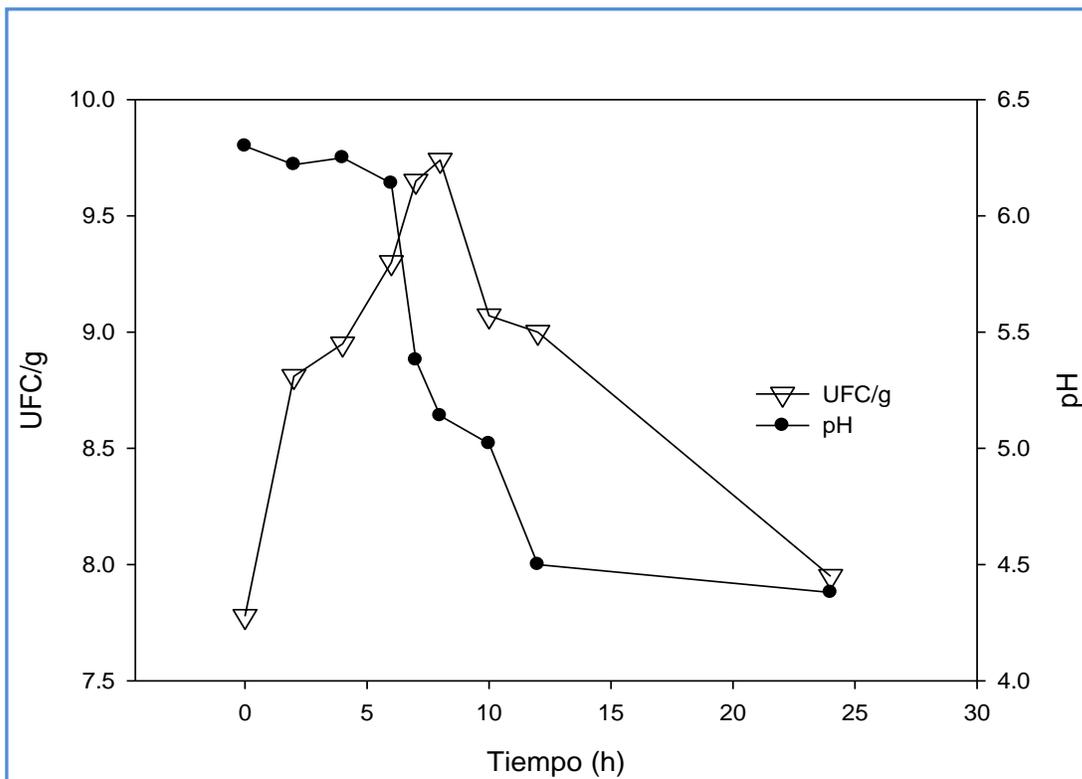


Figura 9. Cinética de crecimiento de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ en leche pasteurizada, muestra la dinámica poblacional y pH

García-Parra y col. (2009) reportaron para la cepa *L. lactis* UQ2 una producción máxima de 3-4 UI/mL a las 6 h. Por su baja producción, se realizó la modificación por transconjugación y la cepa se denominó *L. lactis* UQ2 rif L⁺ (García-Parra *et al.*, 2010). Reportando una producción máxima de 200 UI/mL en 12 h a un pH de 4.75, utilizando una marca de leche comercial como medio de cultivo. En el presente estudio la producción de nisina fue de 997 UI/mL resultó 4 veces mayor, es importante señalar la diferencia en el medio de cultivo, ya que en el presente estudio se utilizó leche bronca esterilizada a 112°C por 15 min

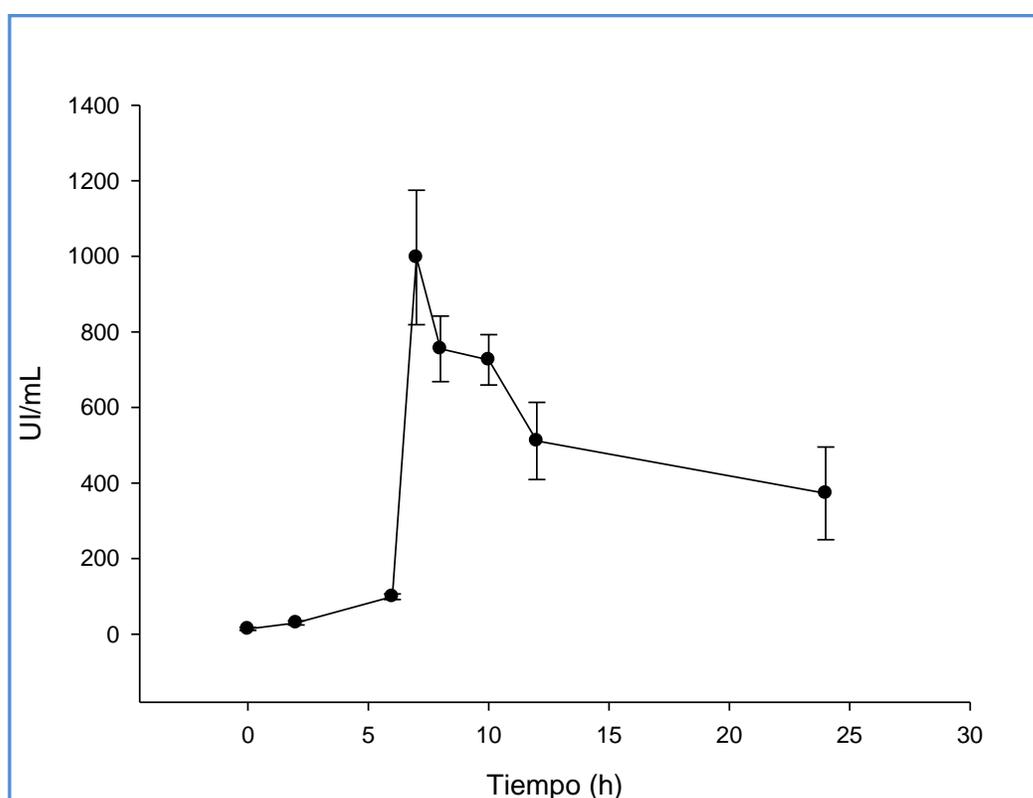


Figura 10. Producción de nisina por *L. lactis* UQ2 rif L⁺, utilizando leche pasteurizada como medio de cultivo

7.1.2 Producción de nisina en queso por *L. lactis* UQ2 rif L⁺

Se evaluó la producción de nisina por *L. lactis* UQ2 rif L⁺ a través del tiempo dentro de la matriz del queso elaborado con leche pasteurizada (P-CI) y sin pasteurizar (SP-CI) (Figuras 11 y 12, respectivamente). El queso P-CI muestra la

máxima producción de nisina en el día 7, siendo de 1,836.8 UI/g; en contraste, el queso SP-CI muestra su máxima producción en el día 21 siendo de 1,297.8 UI/g. Esta diferencia se atribuye a que existe menor cantidad de flora asociada presente en el queso P-CI con respecto al queso SP-CI, la cual podría estar compitiendo con el cultivo iniciador reduciendo la producción de nisina en el queso.

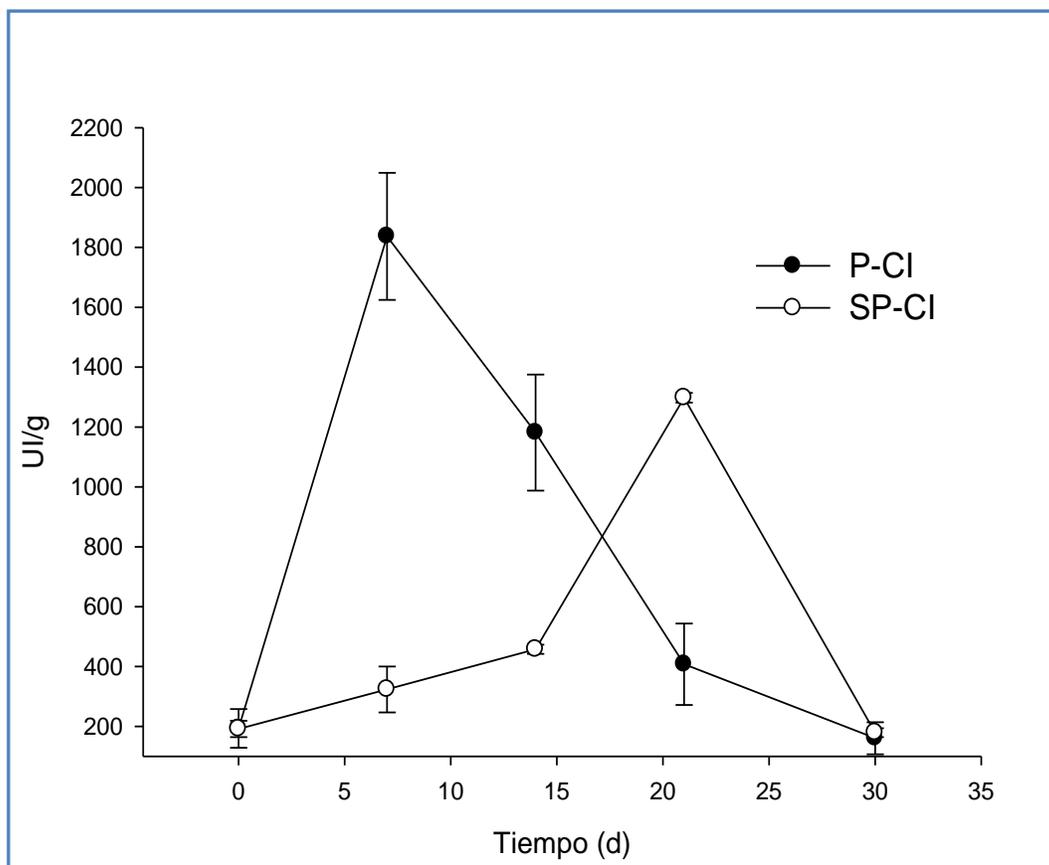


Figura 11. Producción de nisina en la matriz de los quesos pasteurizado con inóculo (P-CI) y sin pasteurizar con inóculo añadido (SP-CI)

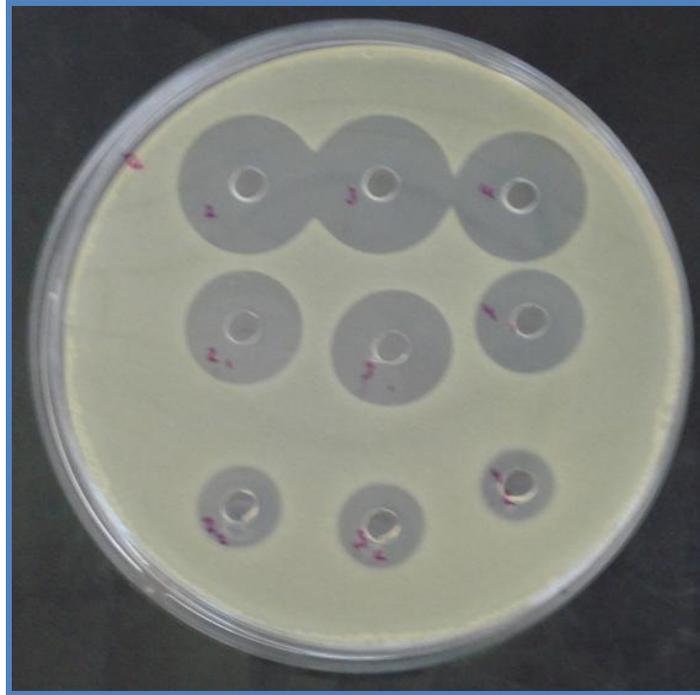


Figura 12. Halos de inhibición de *Micrococcus luteus* NCIB 8166, causados por la acción bactericida de la nisina presente en la muestra de los quesos P-CI y SP-CI

La Norma Oficial Mexicana para quesos fresco, procesados y madurados NOM-121-SSA1-1994, establece para quesos procesados una adición máxima de 0.00125% en peso de nisina (500 UI/g). Sin embargo, no existe una norma para la producción de nisina en queso fresco por la incorporación de un cultivo protector, por tal motivo, la producción obtenida en el queso P-CI de 1,836.8 UI/g, resulta 3.6 veces mayor que la reportada por la norma NOM-121-SSA1-1994.

Ayard (2009) reportó una producción máxima de nisina de 204 a 324 UI/g en queso típico de Egipto, el cual se consume tanto fresco como madurado empleando diferentes cepas de cepas de *Lactococcus lactis*, concluye que la producción de nisina en grandes cantidades garantiza la bioconservación del alimento durante el tiempo de almacenamiento, brindado mayor vida de anaquel y buena calidad microbiológica. La concentración de nisina reportada es entonces cerca del 18% de la encontrada en nuestro queso pasteurizado con inóculo (P-CI)

Raheem y Saris (2009) reportaron una producción máxima de nisina en queso fresco Wara propio de la región de Nigeria, adicionando *Lactococcus lactis* LAC309, obtuvieron una producción máxima de nisina de 3740 UI/g, siendo aproximadamente el doble de la encontrada en este trabajo para el queso P-CI, lo cual brinda al queso un buen efecto protector. Cabe aclarar que no se cuenta con legislación mexicana para los niveles máximos de nisina en quesos frescos.

7.1.3 Cinética de producción de nisina, dinámica poblacional y pH

Se observó el comportamiento del pH, producción de nisina y dinámica poblacional de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ (realizada en medio selectivo PBC) en queso P-CI, a lo largo de un periodo de 30 días (Figuras 13 y 14). Se observa una máxima población de 3.0×10^8 UFC/g en el día 14. Sin embargo, la máxima producción de nisina de 1,836.8 UI/g la observamos en el día 7 con una población de 2.2×10^8 UFC/g y a un pH de 5.2.

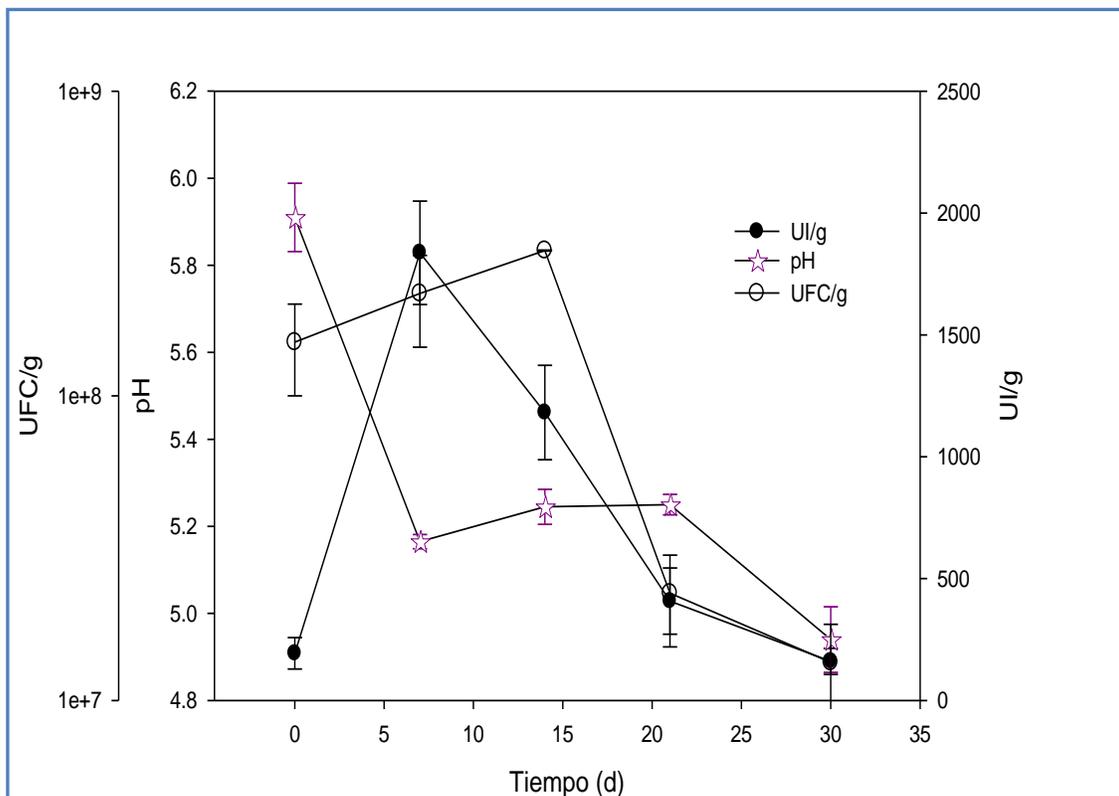


Figura 13. Cinética de crecimiento de *L. lactis* UQ2 rif L⁺, pH y actividad de nisina en queso elaborado con leche pasteurizada (P-CI)

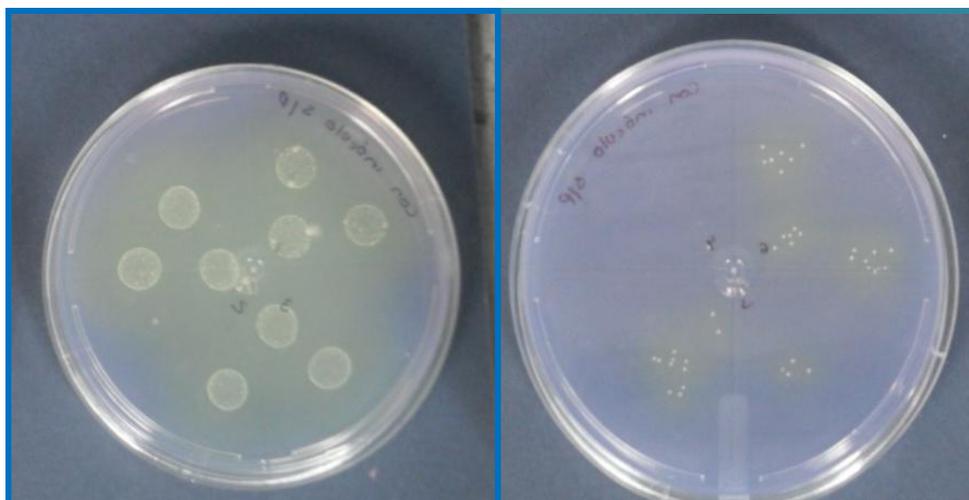


Figura 14. Recuento de *L. lactis* UQ2 rif L⁺, en medio adicionado con rifampicina y púrpura de bromocresol (PBC) en queso P-CI

De igual forma se evaluó la dinámica poblacional de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ comportamiento del pH, producción de nisina y en queso SP-CI, por un periodo de 30 días (Figura 15). Se observa la máxima población 7.2×10^8 UFC/g en el día 14. Sin embargo, la máxima producción de nisina de 1,297.8 UI/g la observamos en el día 21 con una población de 6.3×10^7 UFC/g y a un pH de 4.1.

En ambos procesos P-CI y SP-CI se observa que la máxima producción de nisina ocurre al menor valor de pH, excepto para el día 30 en P-CI. La ventaja que muestra el queso P-CI es que la máxima producción de nisina (1,836.8 UI/g) se observa en el día 7, la cual muestra un descenso a través del tiempo llegando al día 30 a un valor de 160.6 UI/g. Sin embargo, se mantienen elevados títulos de nisina por mayor tiempo, respecto a lo observado en el queso SP-CI ya que muestra su máxima producción (1,297.8 UI/g) en el día 21, pero en un lapso de 9 días desciende el título de nisina a 179.9 UI/g, similar a lo observado en el queso P-CI. Ambos quesos, P-CI y SP-CI, mantienen altos títulos de nisina (>300 UI/g) entre los 7 y 21 días de almacenamiento.

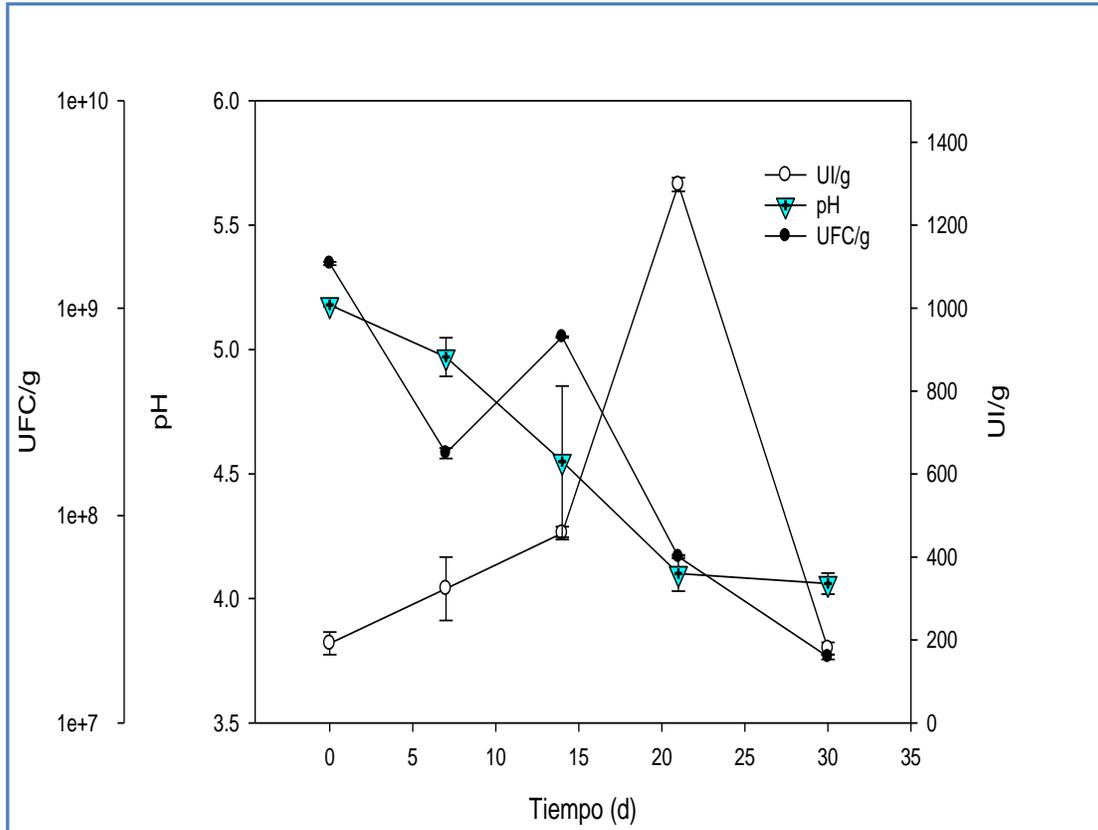


Figura 15. Cinética de crecimiento de *L. lactis* UQ2 rif L⁺, pH y actividad de nisina en queso elaborado con leche sin pasteurizar e inoculado (SP-CI)

7.1.4 Desarrollo de microorganismos indicadores

Se observa el recuento de microorganismos evaluados como estándar de calidad sanitaria (Cuadro 4). Los quesos P-CI y P-SI mantienen su calidad microbiológica a lo largo de 30 días. Sin embargo, a los 30 días el queso P-CI muestra una población de hongos y levaduras de 60 ± 6 UFC/g lo que resulta 6 veces menor a lo observado en el queso P-SI de 360 ± 57 UFC/g. Es posible que el cultivo de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ le brinde un efecto bioprotector, ya que se mantiene la calidad microbiológica del queso tipo panela pasteurizado a lo largo de los 30 días analizados. A partir del día 15 el único proceso que viola la norma NOM-121-SSA1-1994 es aquel queso SP-SI con una población de hongos y levaduras de 540 ± 14 UFC/g y 120 NMP/g de coliformes fecales (mostrados en negritas en el

Cuadro 4), contrario a lo observado en el queso SP-CI, ya que a pesar de mostrar una población relativamente alta de 290 ± 14 UFC/g para hongos y levaduras y 39 NPM/g para coliformes fecales, mayor a lo observado para cualquier tratamiento con leche pasteurizada, no viola la norma. Cabe mencionar que los quesos sin pasteurizar solo fueron utilizados como control.

Cuadro 4. Recuento de coliformes fecales, hongos y levaduras como índice de calidad sanitaria, en los quesos tipo panela elaborados

Tiempo (d)	Tratamientos	Hongos y Levaduras UFC/g	Coliformes Fecales NMP/g
0	Pasteurizada - Con inóculo (P-CI)	60 ± 1	<10
	Sin pasteurizar - Con inóculo (SP-CI)	220 ± 10	39
	Pasteurizada - Sin inóculo (P-SI)	60 ± 20	<10
	Sin pasteurizar - Sin inóculo (SP-SI)	360 ± 30	75
15	Pasteurizada - Con inóculo (P-CI)	60 ± 20	<10
	Sin pasteurizar - Con inóculo (SP-CI)	290 ± 10	39
	Pasteurizada - Sin inóculo (P-SI)	60 ± 6	<10
	Sin pasteurizar - Sin inóculo (SP-SI)	540 ± 10	120
30	Pasteurizada - Con inóculo (P-CI)	60 ± 6	<10
	Sin pasteurizar - Con inóculo (SP-CI)	300 ± 70	64
	Pasteurizada - Sin inóculo (P-SI)	360 ± 60	<10
	Sin pasteurizar - Sin inóculo (SP-SI)	590 ± 40	120

7.1.5 Cuenta total de bacterias ácido lácticas (BAL)

Se evaluó la dinámica de crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) en los diferentes tiempos a lo largo de 30 días de almacenamiento. El queso P-CI alcanza una población de 1.2×10^9 UFC/g, similar a la alcanzada en el queso SP-CI (Figura 16). La razón de observar menor cantidad de BAL en el queso SP-CI, puede deberse a la competencia de la flora asociada con el cultivo protector, la cual no se presenta de igual forma en el queso P-CI.

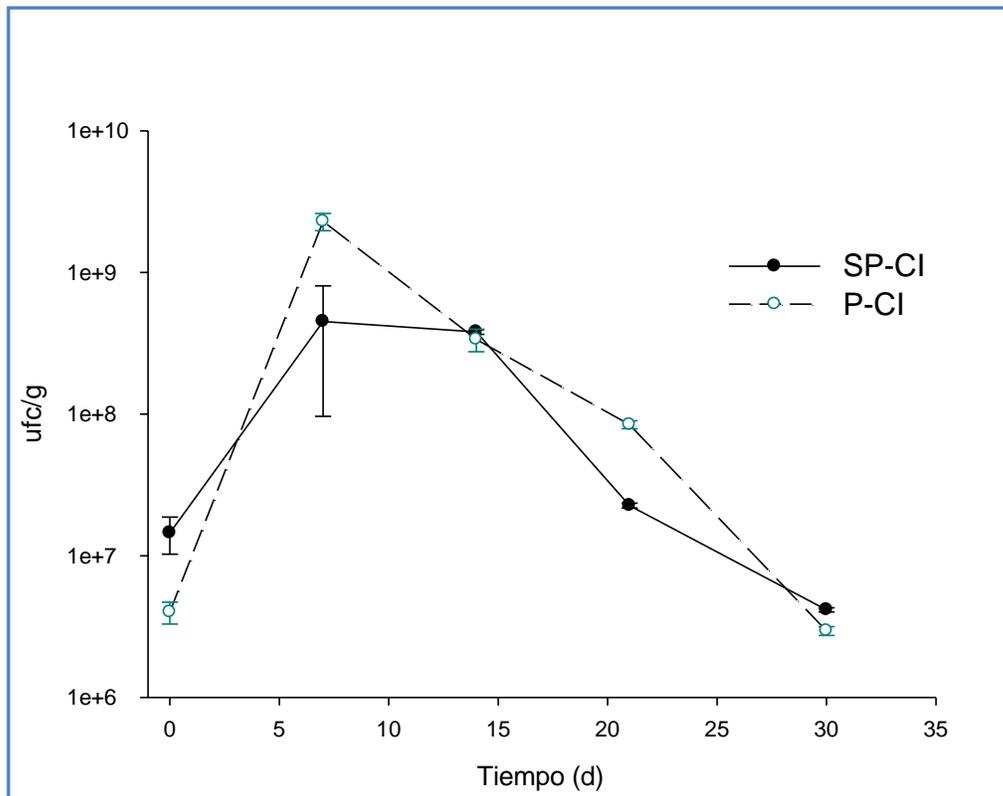


Figura 16. Dinámica de crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) en queso P-CI y SP-CI

7.2 Análisis proximal de los quesos elaborados

7.2.1 Determinación de grasa y proteína

Diferentes métodos en la elaboración de queso afectan el curso de la proteólisis durante su maduración. Los procesos de calentamiento causan interacciones entre proteínas del suero y las micelas de caseína, alterando la accesibilidad de las micelas para la proteólisis enzimática. La concentración de aminoácidos libres encontrados en queso depende si fue elaborado con leche pasteurizada o cruda. Se han reportado para queso elaborado con leche pasteurizada bajos contenidos de nitrógeno soluble y aminoácidos libres (Mendia *et al.*, 2000). En lo que respecta a la grasa y proteína de los diferentes quesos elaborados, los resultados observados fueron similares para todos los procesos. El

porcentaje en peso de grasa en leche es de 2.7 ± 0.1 para el queso P-CI y 2.9 ± 0.2 para el queso SP-CI mostrando una variación del 2% respecto al P-CI. El porcentaje en peso de proteína en leche es de 3.3 ± 0.2 para los diferentes quesos elaborados. En lo que respecta al porcentaje de grasa en el queso P-SI es de 18.5 ± 0.3 y de 23.5 ± 0.3 para el queso SP-SI, 5% mayor respecto al P-SI. Respecto al porcentaje de proteína se observó 16.2% para el queso P-SI y 18.6% para el queso SP-SI, 2% mayor que el P-SI (Cuadro 5).

Cuadro 5. Determinación de grasa y proteína de leche y queso

Tratamiento	Leche	Queso	Leche	Queso
	Grasa (% p/p)		Proteína (% p/p)	
Pasteurizado - Con inóculo (P-CI)	2.7 ± 0.1	21.0 ± 2.1	3.3 ± 0.2	17.6
Sin pasteurizar -Con inóculo (SP-CI)	2.9 ± 0.2	22.5 ± 0.3	3.3 ± 0.2	17.5
Pasteurizado -Sin inóculo (P-SI)	2.8 ± 0.3	18.5 ± 0.3	3.3 ± 0.2	16.2
Sin pasteurizar -Sin inóculo (SP-SI)	2.7 ± 0.2	23.5 ± 0.3	3.3 ± 0.2	18.6

7.2.2 Determinación de humedad

Se puede observar en los días 0, 15 y 30 como es que se comportan los tratamientos a través del tiempo respecto a su contenido humedad (Figura 17). El queso P-CI inicia con un % humedad en peso, de 63.4 ± 0.72 y finaliza con una humedad de $61.2\pm 1.5\%$. El queso P-SI inicia con una humedad de $64.3\pm 0.1\%$ y finaliza con un % humedad de 64.1 ± 0.2 . El queso SP-SI inicia con humedad del $55.1\pm 1.1\%$ y finaliza con $57.1\pm 1.4\%$ de humedad. El queso SP-CI inicia con humedad del $57.4\pm 0.7\%$ y finaliza con $58.4\pm 0.9\%$ de humedad. En general el porcentaje de humedad en los quesos elaborados no muestra grandes cambios. Sin embargo, la textura observada visualmente decir los comentarios de la evaluación sensorial a través del tiempo en los quesos adicionados del cultivo

protector origina cambios significativos lo cual podría ser debido a la proteólisis parcial que el cultivo protector propicia en la matriz de los quesos.

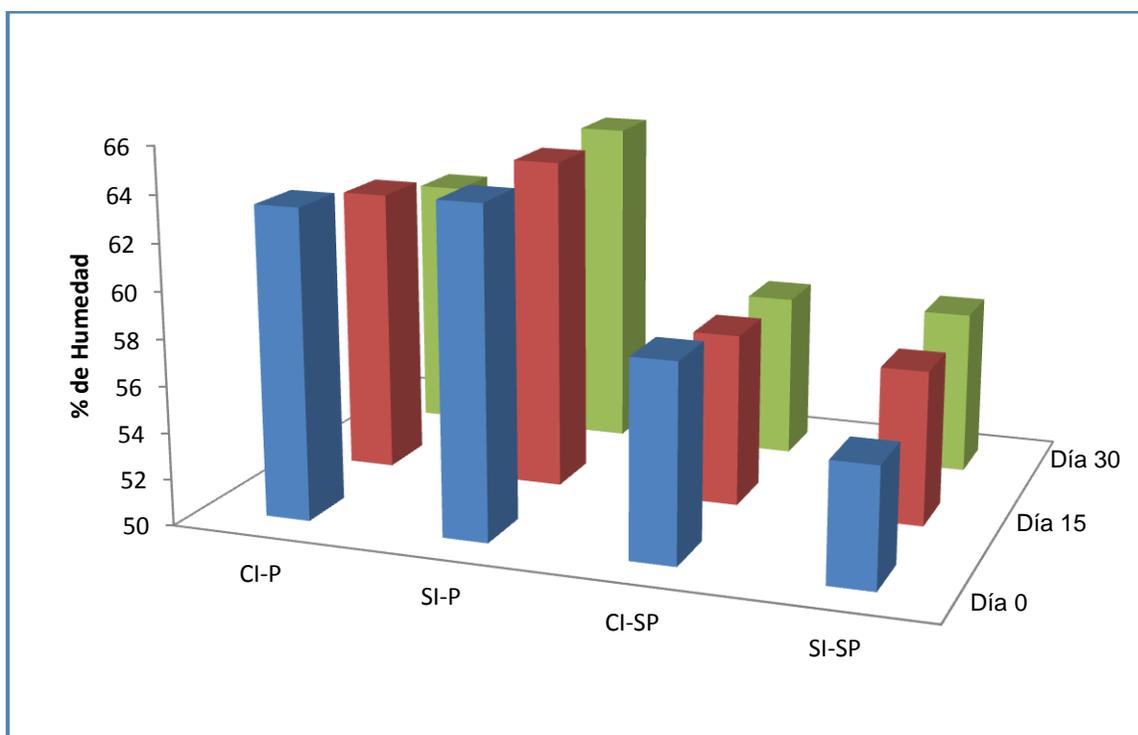


Figura 17. Contenido de humedad a través del tiempo en los diferentes quesos: sin pasteurizar-sin inóculo (SP-SI), pasteurizado-sin inóculo (P-SI), sin pasteurizar-con inóculo (SP-CI) y pasteurizado-con inóculo (P-CI).

7.3 Análisis fisicoquímico

7.3.1 Determinación de pH y actividad de agua (a_w)

Dentro de la matriz del queso el menor pH alcanzado fue para el queso SP-CI el cual inicia en un pH de 5.1 ± 0.1 y finaliza en 4.1 ± 0.1 , lo cual puede ser debido a que se suma la acidez causada por la flora asociada con la del inóculo adicionado (Figura 18). El resultado obtenido es similar al observado (pH inicial 5.0 ± 0.1 y final 4.7 ± 0.1) en el queso SP-SI, lo cual se atribuye de igual forma a la flora asociada presente debido a la ausencia de tratamiento térmico. Contrario al queso P-SI, el cual mantiene un pH de $6.5-6.9 \pm 0.2$, el pH alcanzado en el queso

P-CI, disminuyó de 5.9 ± 0.4 a 4.9 ± 0.1 , si bien sólo es una unidad respecto al queso P-SI. Sin embargo, le brinda características diferentes por la interacción en la matriz del queso panela. La acidez encontrada a lo largo del proceso determina propiedades importantes en el queso ya que brinda sabores y olores característicos, además de una textura parcialmente modificada.

Guinane *et al.* (2005) reportaron para una cepa de *Lactococcus Lactis* subsp. *lactis* DPC3286 productora de nisina, el desarrollo de mayor proteólisis en la matriz del queso lo cual redujo el amargor, por hidrólisis de los péptidos amargos. Sin embargo, el crecimiento de BAL afecta la velocidad de acidificación.

Por lo anterior, se puede observar que la adición de un cultivo protector puede mejorar características de sabor, textura y microbiológicas dentro del queso. Sin embargo, es importante vigilar la velocidad de acidificación que el microorganismo produce en el queso ya que puede afectar la aceptación del consumidor.

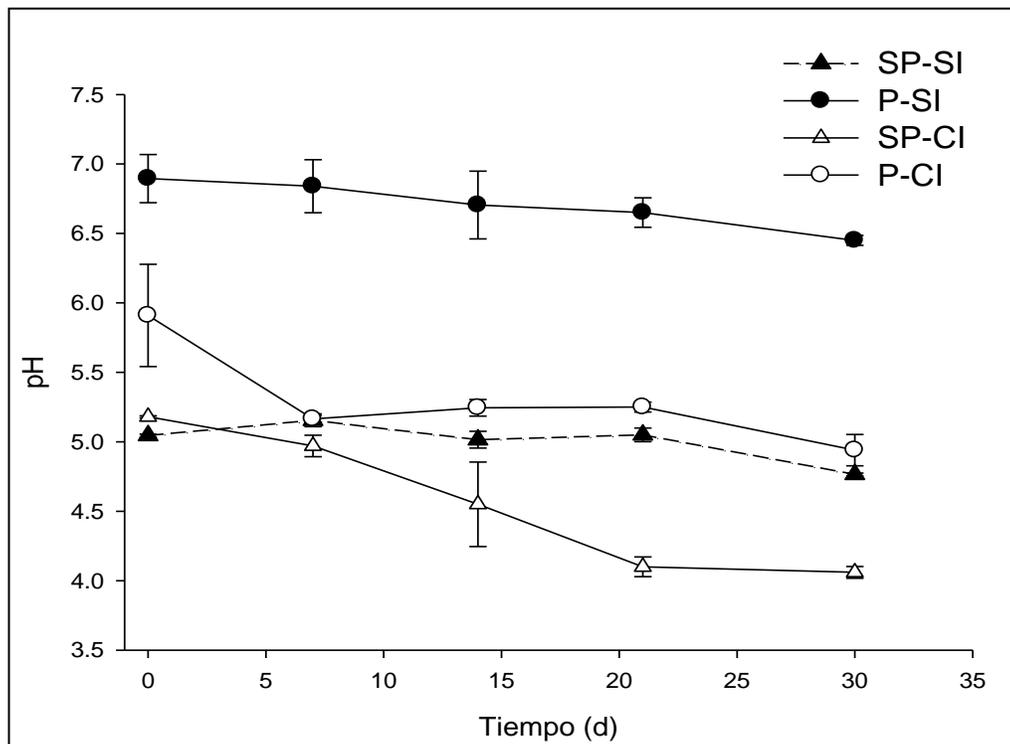


Figura 18. Desarrollo del pH de los diferentes quesos tipo panela

Respecto a la actividad de agua (a_w) se observa que fluctúa entre 0.91 ± 0.10 y 0.93 ± 0.07 , nos indica que tenemos un alimento con un elevado contenido de a_w (Cuadro 6). En el tiempo de análisis existe una reducción, lo cual no limita el desarrollo de los microorganismos, ya que levaduras, hongos, bacterias deterioradoras y patógenas desarrollan a $a_w > 0.80$ (Jay, 2000), valor que está dentro del rango de a_w que se obtuvo en los diferentes quesos panela a lo largo de los 30 días de almacenamiento.

Cuadro 6. Actividad de agua (a_w), en queso tipo panela a lo largo de un periodo de 30 días

Tiempo (d)	Tratamientos	a_w
0	Pasteurizada - Con inóculo (P-CI)	0.92 ± 0.10
	Sin pasteurizar - Con inóculo (SP-CI)	0.92 ± 0.10
	Pasteurizada - Sin inóculo (P-SI)	0.91 ± 0.98
	Sin pasteurizar - Sin inóculo (SP-SI)	0.92 ± 0.09
15	Pasteurizada - Con inóculo (P-CI)	0.92 ± 0.10
	Sin pasteurizar - Con inóculo (SP-CI)	0.92 ± 0.10
	Pasteurizada - Sin inóculo (P-SI)	0.93 ± 0.07
	Sin pasteurizar - Sin inóculo (SP-SI)	0.91 ± 0.10
30	Pasteurizada - Con inóculo (P-CI)	0.91 ± 0.09
	Sin pasteurizar - Con inóculo (SP-CI)	0.91 ± 0.10
	Pasteurizada - Sin inóculo (P-SI)	0.91 ± 0.10
	Sin pasteurizar - Sin inóculo (SP-SI)	0.91 ± 0.10

7.4 Análisis sensorial

7.4.1 Prueba hedónica

Para evaluar la aceptación del consumidor de este alimento tan complejo, se realizó una evaluación sensorial utilizando un panel no entrenado de 50 personas en los días 0, 7, 14 y 21. En base los parámetros evaluados el consumidor definió si compraría el producto (Anexo C).

El queso elaborado sin la adición del inóculo (P-SI), es un queso panela similar al comercial, dando pauta a que el consumidor pueda evaluar la diferencia entre un queso tipo panela adicionado de un cultivo protector y un queso panela elaborado mediante un proceso tradicional.

Se observó el agrado del consumidor, a través del tiempo, del queso pasteurizado con inóculo (P-CI) y un control sin inóculo (P-SI) (Figuras 19 y 20). El queso P-CI en la prueba hedónica, muestra su mayor frecuencia en “agradable” al día 7 al igual que el P-SI. El queso P-CI muestra su mayor aceptación en “muy agradable” con una frecuencia de 16 en el día 7, mientras para el queso P-SI en el día 21 con una frecuencia de 15.5.

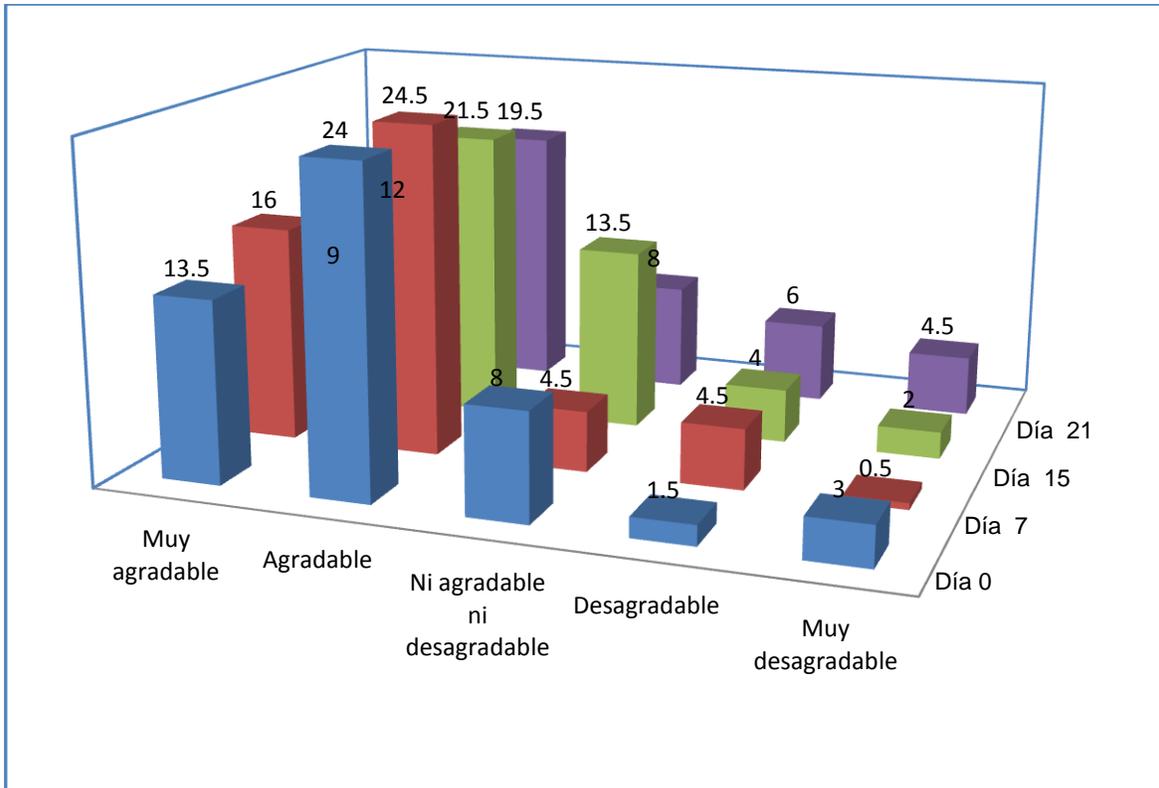


Figura 19. Evaluación del nivel de agrado del queso P-CI mediante una prueba hedónica, con 50 panelistas no entrenados para cada tiempo

El sabor del queso P-CI, se centra a través del tiempo en la escala hedónica en “agradable”, al igual que el queso P-SI (Figuras 21 y 22). Cabe mencionar que conforme transcurre el tiempo de almacenamiento se detectaron cambios de textura en las propiedades del queso adicionado del inóculo las cuales solo fueron observadas, no medidas. Se partió en el día 0 de un queso muy similar a un queso panela. Sin embargo, conforme transcurrió el tiempo la proteólisis que se desarrolló en el queso nos llevo a finalizar con un queso con características muy diferentes a un queso panela. Trabajos recientes muestran que la proteólisis en queso se incrementa con la adición de microorganismos que utilizan la lactosa ya que existe un gen cercano al de la lactasa que codifica para una proteasa, por lo cual además de producir bacteriocinas, se observa una marcada proteólisis, lo cual puede modificar propiedades del queso (Martínez-Cuesta *et al.*, 2001).

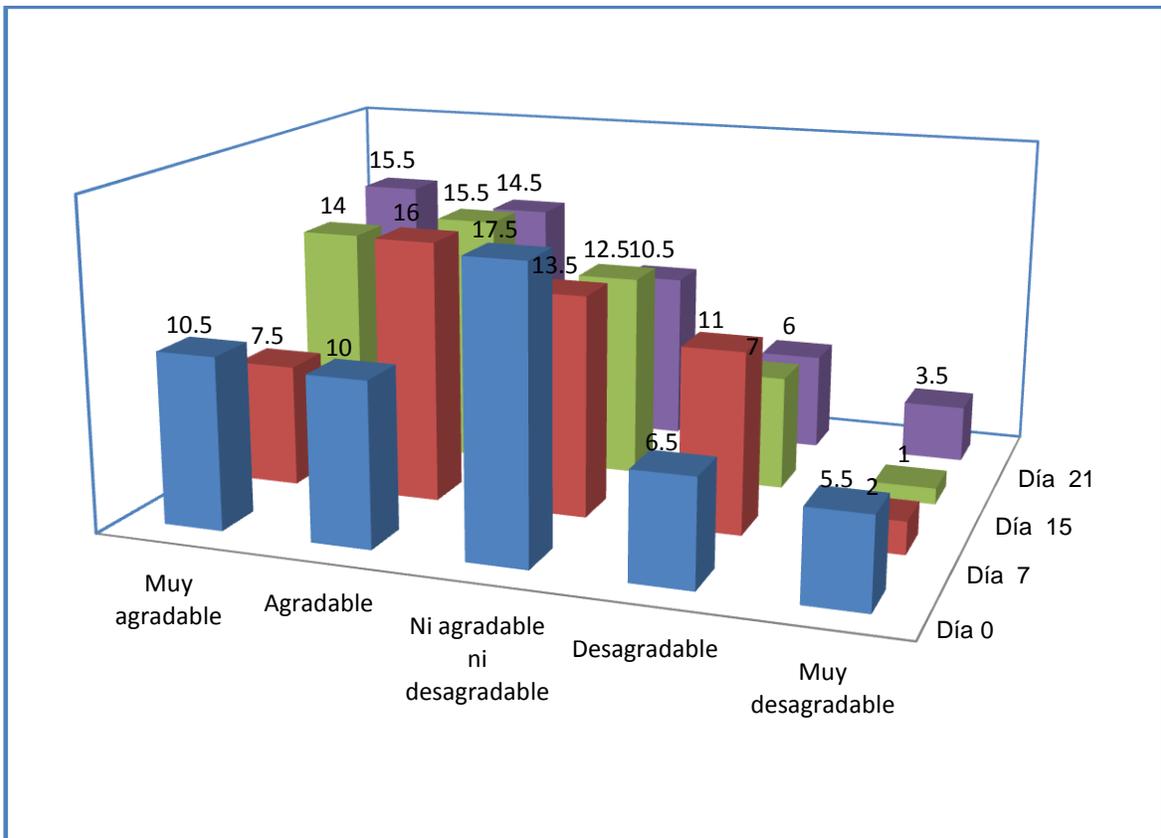


Figura 20. Evaluación del agrado del producto mediante una prueba hedónica en queso P-SI

En la Figura 23 y 24 se evaluó la aceptación del aroma desarrollado en el queso a través del tiempo por el consumidor. En el queso P-CI el aroma se centró dentro de la escala en “agradable” y “ni agradable ni desagradable”. En el día 0 resulta más “agradable” el queso P-CI, que aquel manejado como control P-SI. Sin embargo, en el día 14 el aroma desarrollado en el queso P-CI no resulta tan “agradable” como el control P-SI. En el día 21 el queso P-CI cuenta con un intenso desarrollo del aroma lo cual resulta dentro de la escala en “ni agradable ni desagradable” para el consumidor, ya que como se mencionó anteriormente, las características de textura fueron muy variables, así como el aroma al pasar el tiempo de almacenamiento del queso adicionado del inóculo.

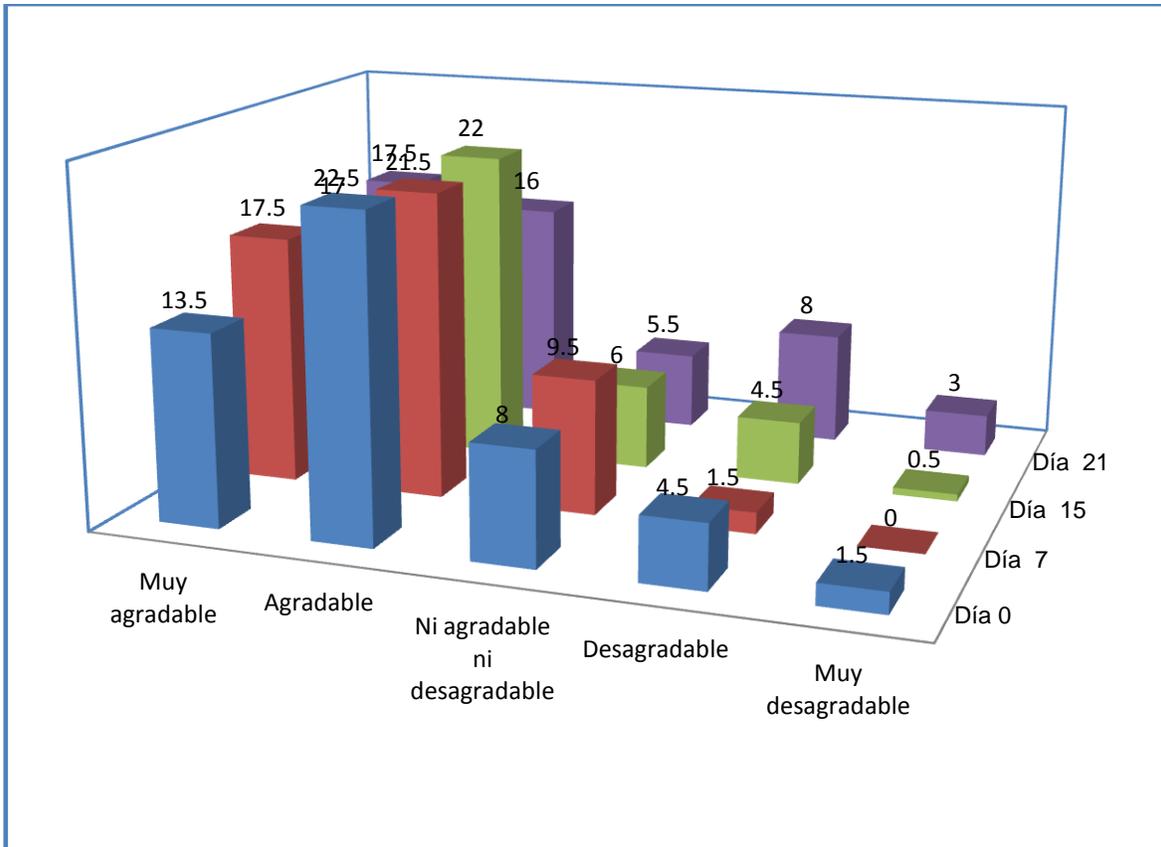


Figura 21. Evaluación del sabor del producto mediante una prueba hedónica en queso P-CI

La aceptación del producto “queso tipo panela con y sin adición del cultivo protector” se muestra en (Figura 25). En el caso del queso adicionado del cultivo protector, más de un 65% de los consumidores que se les dio a probar el producto lo comprarían.

Es importante señalar que el queso P-CI es un nuevo producto que no tiene una contraparte comercial. Teniendo en cuenta que es un nuevo producto con características diferentes, como lo es el cambio notable en su textura comparado con el queso panela, la aceptación se considera como buena.

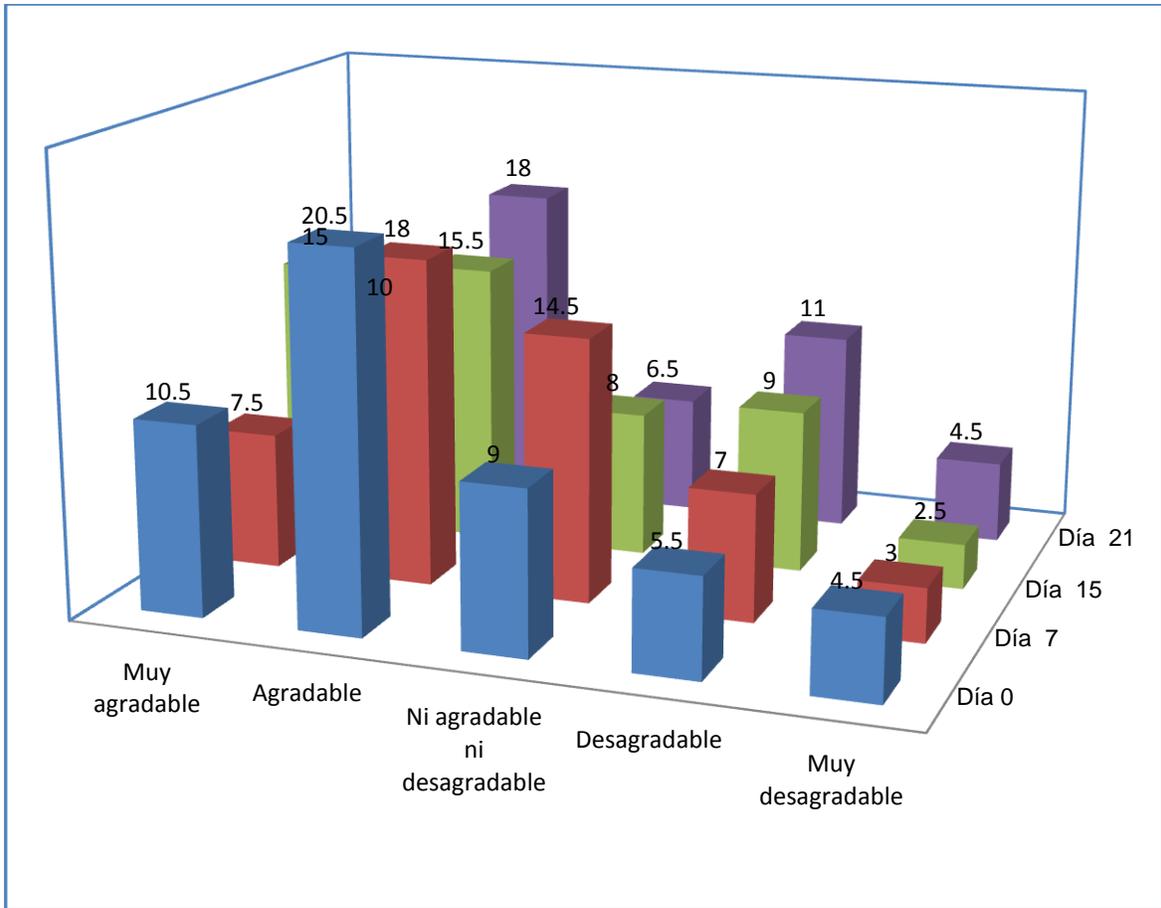


Figura 22. Evaluación del sabor del producto mediante una prueba hedónica del queso P-SI

El sabor es uno de los criterios más importantes de calidad en queso fresco y madurado; la aceptación del consumidor depende principalmente de las cualidades sensoriales, en este contexto el sabor es determinante (Verzera *et al.*, 2004).

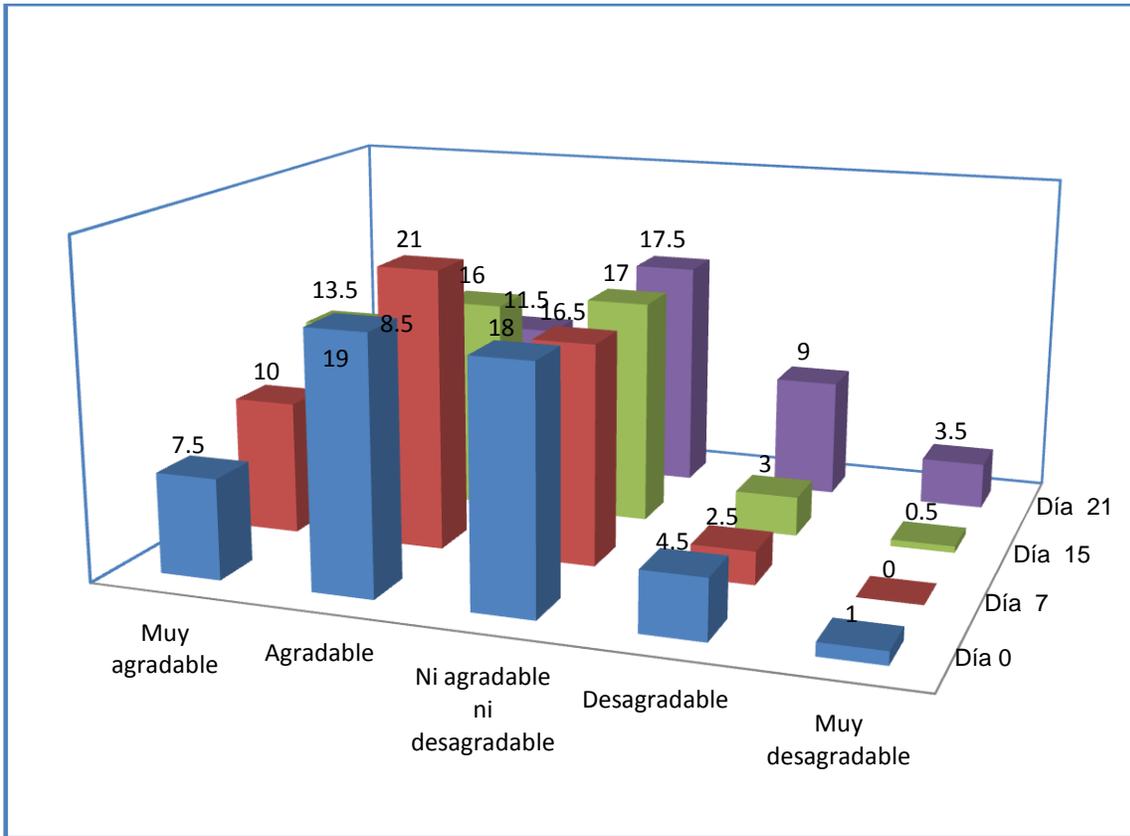


Figura 23. Evaluación del aroma desarrollado en el queso P-CI

Se ha reportado la producción de compuestos de sabor en productos lácteos por microorganismos. El queso es considerado el producto lácteo más complejo comparado con otros productos lácteos. Sin embargo, la contribución en la formación de compuestos de sabor por bacterias ácido lácticas se ha demostrado adicionado cultivos iniciadores y no iniciadores. Es generalmente aceptado en la industria ya que algunos cultivos producen más compuestos de sabor que otros (Urbach, 1995).

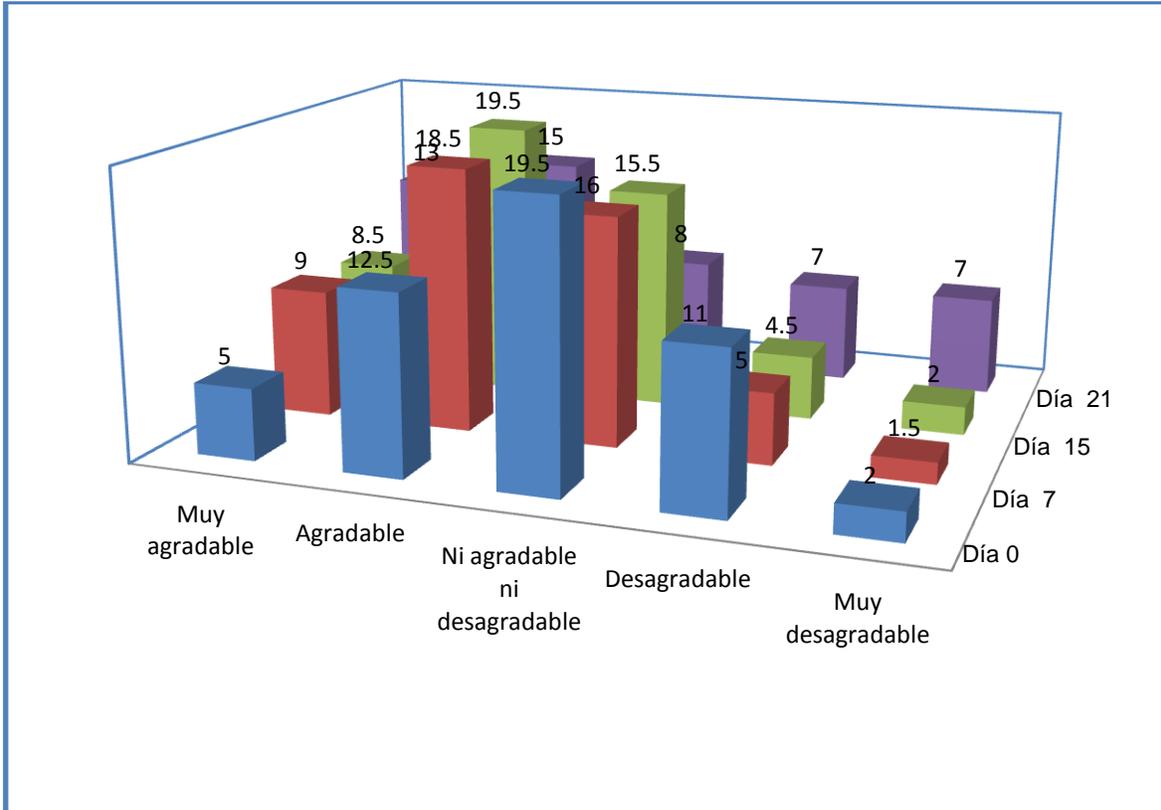


Figura 24. Evaluación del aroma desarrollado en el queso P-SI

La habilidad de las bacterias ácido lácticas (BAL) y otros microorganismos para degradar los aminoácidos en compuestos de aroma es dependiente de la cepa. La aceleración y diversificación del desarrollo del sabor en queso es de interés económico ya que el sabor final de queso determina la elección del consumidor (Yvon y Rijnen., 2001).

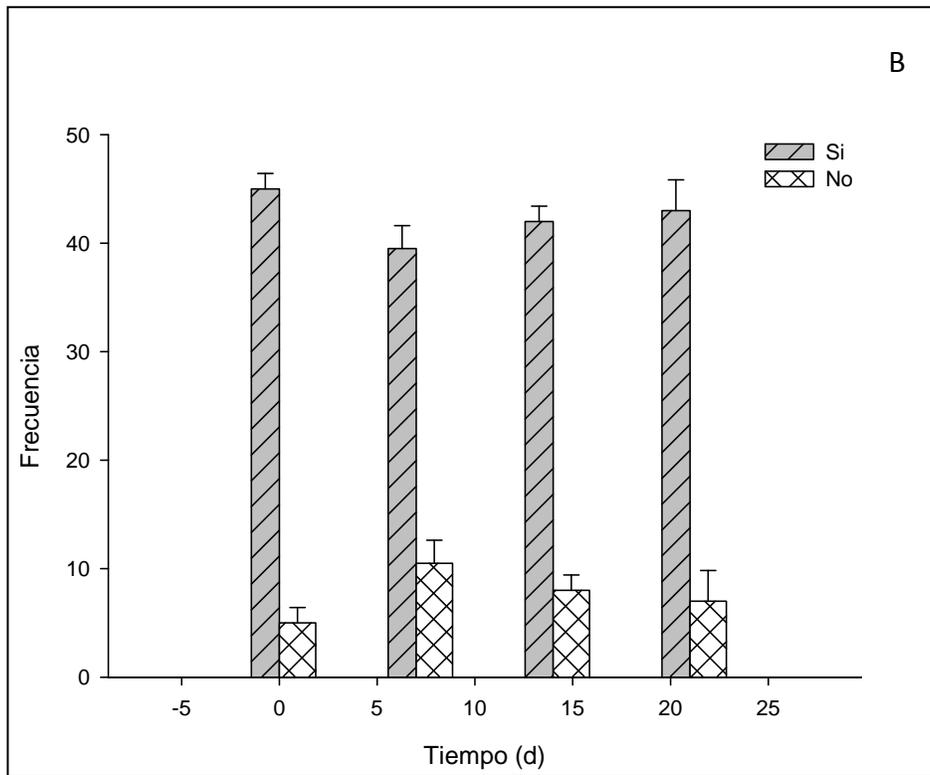
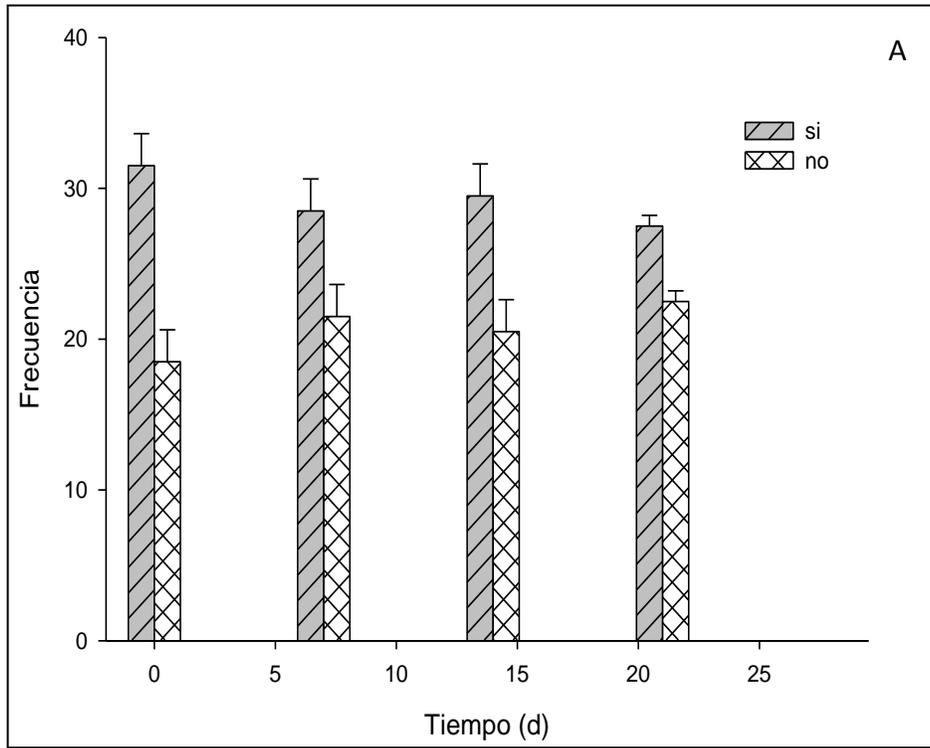


Figura 25. Respuesta del consumidor en base a los atributos aroma, sabor y agrado de la pregunta: ¿Compraría el producto? del queso P-CI (A) y su control P-SI (B)

7.5 Análisis de compuestos volátiles

7.5.1 Comportamiento de compuestos de sabor

En lo que respecta al desarrollo de compuestos de sabor fueron identificados en los diferentes quesos: pasteurizado-con inóculo (P-CI), sin pasteurizar-con inóculo (SP-CI), pasteurizado-sin inóculo (P-SI) y sin pasteurizar-sin inóculo (SP-SI) 38 compuestos (Figura 27). Los cuales diversifican en 8 grupos químicos diferentes; alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos grasos, aromáticos, un hidrocarburo y una lactona (Cuadros 7 y 8).

Se encontraron 4 alcoholes: 3-metil 1-butanol, 1-hexanol, fenil etanol y 2-metil 1-propanol. Numerosas vías metabólicas se encuentran involucradas en la biosíntesis de alcoholes que son encontrados en quesos: el metabolismo de la lactosa, la reducción de metil cetona, el metabolismo de los aminoácidos al igual que la degradación del ácido linoleico y linolénico. La presencia de alcoholes primarios de cadenas ramificadas como el 3-metil-1-butanol, indican la reducción de aldehídos producidos a partir de leucina, compuesto identificado en queso Mozzarella el cual confiere un agradable aroma a queso fresco (Curioni y Bosset, 2002). El 2-metil propanol produce aromas afrutados y alcohólicos (Marilley *et al.*, 2004).

De igual forma se encontraron 6 aldehídos: hexanal, heptanal, nonanal, 3-metil butanal, acetaldehído y benzaldehído. Los aldehídos son compuestos transitorios en queso ya que son rápidamente reducidos a alcoholes primarios incluso oxidados a su correspondiente ácido. Estos compuestos son probablemente originados de la degradación de aminoácidos de cadenas ramificadas ya sea por un proceso enzimático o no enzimático. El 3-metil butanal es derivado del aminoácido leucina, y ha sido identificado como un potente odorante en queso Camembert y Cheddar, presenta olor a malta verde (agrio picante) en altas concentraciones, en bajas concentraciones el olor es afrutado y agradable (Curioni y Bosset, 2002; Burbank y Quian, 2005).

Cuadro 7. Notas de olor identificadas para 38 compuestos encontrados en mayor concentración en la matriz del queso

Alcoholes		
3-metil 1-butanol	123-51-3	Queso, pies ^a , queso fresco ^c
1-hexanol	111-27-3	Verde ^b
fenil etil alcohol	60-12-8	Rosas, floral ^a
2-metil 1-propanol	78-83-1	Plástico ^b
Cetonas		
2-heptanona	110-43-0	Medicinal, frutal ^a
2-nonanona	821-55-6	Asado, quemado ^a
2-pentanona	107-87-9	Asado, dulce ^a
2-undecanona	112-12-9	Queso ahumado, leche caliente ^a , floral ^e
3-hidroxi, 2-butanona	513-86-0	Leche agria ^a
Ácidos		
ácido hexanoico	142-62-1	Palomitas de maíz, corteza de queso ^b
ácido Octanoico	124-07-2	Rancio, corteza de queso ^b
ácido n-Decanoico	334-48-5	Rancio, mantequilla, frutas acidas, leche, queso añejo ^b
ácido Butanoico	107-92-6	Queso ^b , queso, mantequilla ^c
ácido Acético	64-19-7	Pimientos, verde, afrutado, floral, vinagre ^b
ácido heptanoico	111-14-8	Graso, rancio ^b
Aldehídos		
hexanal	66-25-1	Pasto fresco, rancio ^a ligeramente afrutado ^c , verde ^d
heptanal	111-71-7	Citricos, jabón, jamón rancio ^a
nonanal	124-19-6	Plastico, jabón ^a , seboso ^b
3- metil butanal	590-86-3	Rancio, jamón seco curado ^a , malta, herbáceo ^b , malta, queso ^c
acetaldehído	122-78-1	Dulce, miel, floral ^d
benzaldehído	100-52-7	Aceite de almendra amarga, cereza dulce ^c

^aOlivares *et al.*, 2009; ^bCurioni y Bosset, 2002; ^cSmit *et al.*, 2005; ^dKubicková *et al.*, 1990;

^eBurdock, 2010

Cuadro 8. Notas de olor identificadas para 38 compuestos encontrados en mayor concentración en la matriz del queso

Ésteres		
butirato de metilo	623-42-7	Afrutado, fruta madurada , mantequilla ^c
hexanoato de etilo	106-70-7	Afrutado, manzana , melón, queso fresco ^b
octanoato de metilo	111-11-5	Afrutado ^b
decanoato de metilo	110-42-9	Grasa cremosa, jabón, matices de coco ^d
laurato de metilo	111-82-0	
tetradecanoato de metilo	124-10-7	Cebolla, miel ,olor lirio ^d
nonanoato de metilo	1731-84-6	Vino, olor a coco ^d
decanoato de etilo	110-38-3	Manzana , ceroso, afrutado ^d
meristolato de metilo	56219-06-8	
14-metil pentadecanoato de metilo	5129-60-2	
undecanoato de metilo	1731-86-8	
ciclopropanoato de metilo	10152-60-0	
Lactonas		
δ-decalactona	705-86-2	Coco, afrutado, grasa, crema ^d
Aromáticos		
etil benceno	100-41-4	
1,3-dimetil, benceno	620-14-4	
1-etil, 3-metil, benceno	620-14-4	
Hidrocarburo		
D-limoneno	5989-27-5	Cítricos, naranja ^a

^aOlivares *et al.*, 2009; ^bCurioni y Bosset, 2002; ^cSmit *et al.*, 2005; ^dKubicková *et al.*,1990;

^eBurdock, 2010

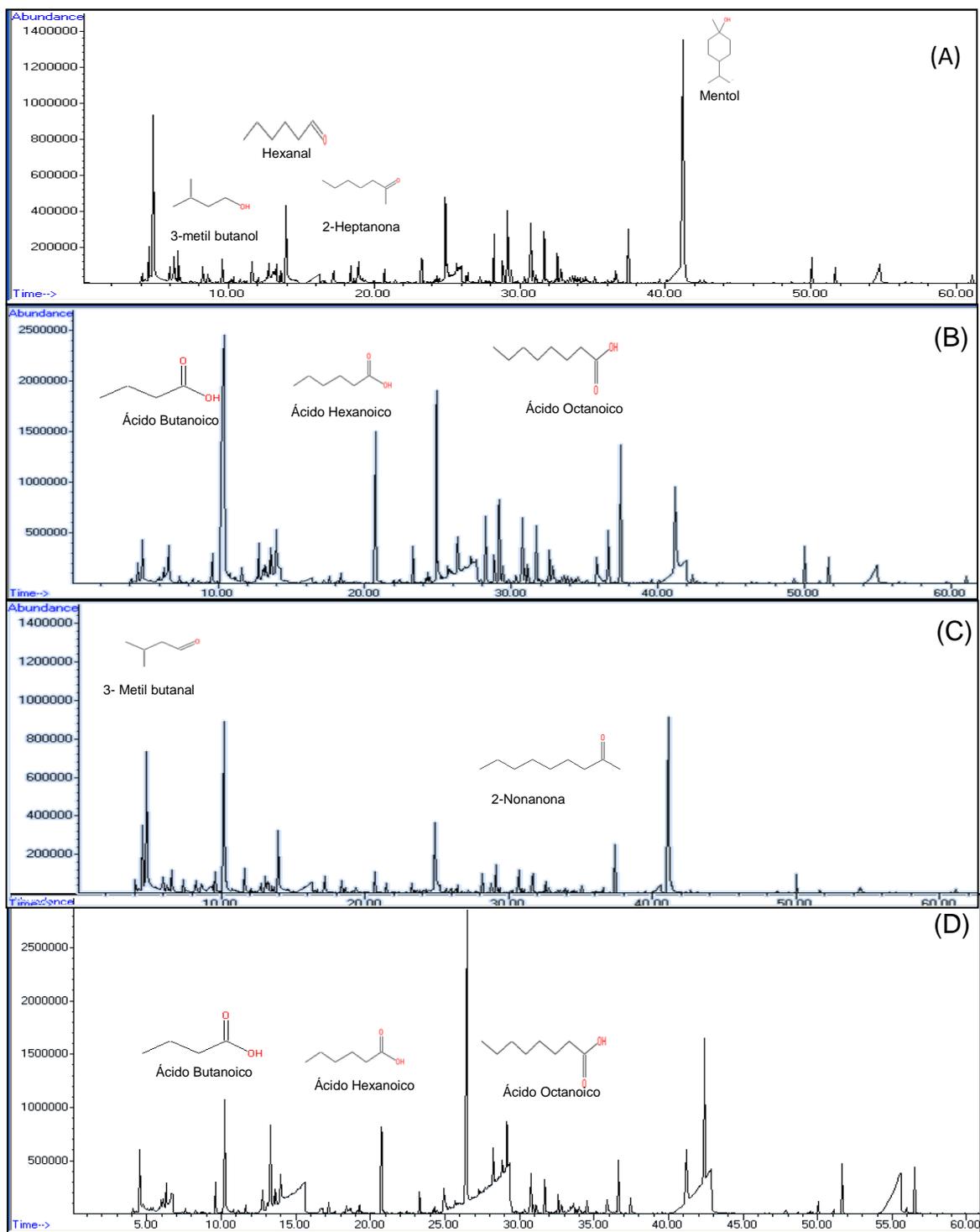


Figura 26. Cromatograma correspondiente a los diferentes tratamientos en el día 14: A) pasteurizado-con inóculo (P-CI), B) sin pasteurizar-con inóculo (SP-CI), C) pasteurizado-sin inóculo (P-SI) y D) sin pasteurizar-sin inóculo (SP-SI)

Consecuentemente, los aldehídos son encontrados en bajas concentraciones, el umbral del sabor es bastante bajo; para 2-metil propanal y 2 y 3-metil butanal, los valores reportados fueron 0.10. 0.13 y 0.06 mg/L, respectivamente (Smit *et al.*, 2009).

Aldehídos lineales como hexanal, nonanal, heptanal, butanal, etc., son considerados completamente comunes en queso, aportan aromas a pasto verde y aromas herbáceos. Sin embargo, estos compuestos pueden ser muy desagradables cuando su concentración excede cierto umbral (Curioni y Bosset, 2002). Garden *et al.* (2001) reportaron que altos niveles de hexanal fueron encontrados en queso Hispánico elaborado con la adición de cultivo protector productor de una bacteriocina.

Los aldehídos son producidos durante el metabolismo de la lactosa pero también puede ser derivado del rompimiento de la treonina, componentes derivados de aminoácidos aromáticos muestran impacto en el aroma del queso. La adición de un cultivo protector *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415 productor de nisina Z contribuye a su formación de aldehídos (Garden *et al.*, 2002). En el queso Domiati, el acetaldehído se ha reportado como de importancia en el sabor (Ayar, 2009). El benzaldehído es caracterizado por su sabor a almendra amarga, y se ha reportado su presencia en queso (Marilley *et al.*, 2004).

Se encontraron también 5 cetonas: 2-heptanona, 2-nonanona, 2-pentanona, 2-undecanona y 3-hidroxi-2-butanona. Las cetonas son constituyentes comunes en la mayoría de los productos lácteos, cuentan con olores típicos y baja percepción en el umbral. Los sabores afrutado, floral y notas a rancio están asociados a varias metil cetonas como 2-octanona, 2-nonanona, 2-undecanona y 2-decanona. Diferentes notas son atribuidas a estos compuestos, 2-heptanona es un importante componente del sabor en queso Emmental, Gorgonzola y queso azul. La 2-nonanona es otra metil cetona predominante en queso Gorgonzola y en queso madurado Ragusano, mientras que la 2-undecanona parece ser un compuesto clave del aroma de queso Camembert (Curioni y Bosset, 2002).

Se identificaron 12 ésteres: butirato de metilo, hexanoato de etilo, octanoato de metilo, decanoato de metilo, laurato de metilo, tetradecanoato de metilo, nonanoato de metilo, decanoato de etilo, meristolato de metilo, 14-metil pentadecanoato de metilo, undecanoato de metilo y ciclopropanoato de metilo.

Los ésteres son compuestos comúnmente encontrados en queso, resultado de la esterificación entre cadenas cortas y medias de ácidos grasos al igual que de alcoholes primarios y secundarios derivados de la fermentación de la lactosa o del catabolismo de amino ácidos. La mayoría de los ésteres encontrados describen notas dulces, afrutadas y florales. Especialmente los etil ésteres son conocidos por su importante papel en la formación de carácter afrutado en queso. Estos compuestos contribuyen al buen sabor en queso ya que minimizan la acidez y amargor que proporcionan los ácidos grasos y las aminas, respectivamente. El hexanoato de etilo juega un importante rol en perfiles de aroma de quesos como: Gorgonzola, Cheddar, Grana, Pecorino y Ragusano (Curioni y Bosset, 2002). Garden *et al.*, (2002) lo reportan como un compuesto producido por la incorporación de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415 productor de nisina Z en queso Hispánico.

Se obtuvieron también 6 ácidos: hexanoico, octanoico, n-decanoico, butanoico, heptanoico y acético. Los ácidos grasos son importantes, o incluso predominantes, componentes de sabor de muchos tipos de quesos. Los cuales, contienen cuatro o más átomos de carbono pueden ser originados de la lipólisis de la grasa de leche o del rompimiento de aminoácidos. La lipólisis puede deberse a la acción de lipasas presentes en la leche, en el caso de queso elaborado con leche sin pasteurizar por la acción de lipasas microbianas. Bacterias ácido lácticas presentes como cultivos iniciadores solo generan débil actividad lipolítica. Ácidos grasos de cadena corta pueden ser originados de cetonas, ésteres y aldehídos por oxidación. Cadenas mayores a 12 átomos de carbono tienen una alta percepción en el umbral, contrario a las cadenas de 4 a 12 átomos de carbono que poseen una baja percepción en el umbral y cada uno cuenta con notas

características. Por ejemplo, el ácido acético y el ácido propiónico cuentan con un típico olor a vinagre. El ácido butanoico, tiene un olor a queso rancio y juega un papel importante en el olor de muchos tipos de quesos como Camembert, Cheddar, Grana Padano, Gruyere, Pecorino, Ragusano y Roncal (Curioni y Bosset, 2002; Randazzo *et al.*, 2008). Diferentes concentraciones de ácido butírico encontradas en queso es en parte debido a la actividad hidrolítica de las lipasas (Marilley *et al.*, 2004).

Se identificó una lactona: δ -decalactona. Las lactonas son ésteres cíclicos en los que el ácido y las funciones del alcohol pertenecen a la misma molécula. La presencia de γ -, δ - (gama y delta) lactonas en queso blando, como Camembert, podría ser importante en el aroma final ya que proporciona notas afrutadas y cuenta con baja percepción en el umbral. La más común encontrada en queso es la δ -decalactona este compuesto es clave en el olor de queso Camembert y Emmental (Curioni y Bosset, 2002).

El queso es una matriz compleja en donde la combinación entre componentes del sabor debe ser considerada. La percepción del umbral de los compuestos es fuertemente dependiente de la matriz y de los componentes del queso ya que pueden modificar la calidad y la percepción que se tiene de los compuestos. Por ejemplo 2-metil propanal y 3-metil butanol tienen un umbral de detección de 100 y 3200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en agua y de 180 y 4750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en leche descremada, respectivamente (Curioni y Bosset, 2002, Marilley *et al.*, 2004).

La diversidad e interacción de la flora asociada en el ecosistema del queso, es uno de los principales factores que contribuyen a su complejo sabor, estas interacciones pueden ser benéficas si resultan en un buen balance del sabor. La comunidad microbiana en un queso es muy compleja, más en el queso elaborado con leche sin pasteurizar que en aquel elaborado con leche pasteurizada, ya que la flora asociada dirige la diferencia entre estos dos tipos de queso. La pérdida de la calidad sensorial en queso subsecuentemente está dada por la pasteurización. En busca de mejorar estas características sensoriales en queso pasteurizado se

han realizado diferentes estudios en relación a la formación del sabor por cepas nativas, en diferentes casos la percepción del sabor producida por cepas nativas fue distinta en dos modelos leche y queso (Peláez y Requena, 2005; Randazzo *et al.*, 2008).

En el presente trabajo el empleo del cultivo protector (*L. lactis* UQ2 rif L⁺), es procedente de *Lactococcus lactis* UQ2 aislado de un queso fresco típico de la región (García-Almendárez *et al.*, 2008). El empleo de este tipo de compuestos en la elaboración de un producto podría semejar olores y aromas asociados con productos típicos de la región (Renyé *et al.*, 2008).

La caseína constituye casi el 80% de las proteínas presentes en la leche. La hidrólisis de caseínas por células de *Lactococcus* es debida a las proteinasas desarrolladas. Los productos que resultan de la hidrólisis de la caseína juegan un papel crucial en el desarrollo de sabor en queso durante su maduración. (Morales *et al.*, 2003).

L. lactis es una de las bacterias ácido lácticas más utilizada como cultivo iniciador en la elaboración de diferentes variedades de queso. El sabor de queso es el resultado del rompimiento de las proteínas de la leche, grasa, lactosa y citrato. Moléculas de sabor pueden ser producidas durante el crecimiento de bacteria ácido lácticas y otros microorganismos (Morales *et al.*, 2001).

Notables avances se han desarrollado en la última década sobre la caracterización de *L. lactis*. Sin embargo, la información acerca de las condiciones de su uso en la elaboración de queso, es esencial para definir las propiedades tecnológicas de la cepa, los estudios son aun escasos aunque algunos trabajos reciente se han ocupado de esto (Morales *et al.*, 2003).

Los 38 compuestos identificados a lo largo del tiempo de almacenamiento de los quesos producidos, se observan en la Figura 27, fueron evaluados mediante un análisis estadístico de componentes principales (ACP). Los diferentes tipos de queso: pasteurizado-con inóculo (P-CI), sin pasteurizar-con inóculo (SP-CI), pasteurizado-sin inóculo (P-SI) y sin pasteurizar-sin inóculo (SP-SI) muestra tendencias diferentes. El queso elaborado P-CI, se encuentra determinado por alcoholes, cetonas y aldehídos, contrario al queso P-SI el cual está determinado por ácidos y ésteres.

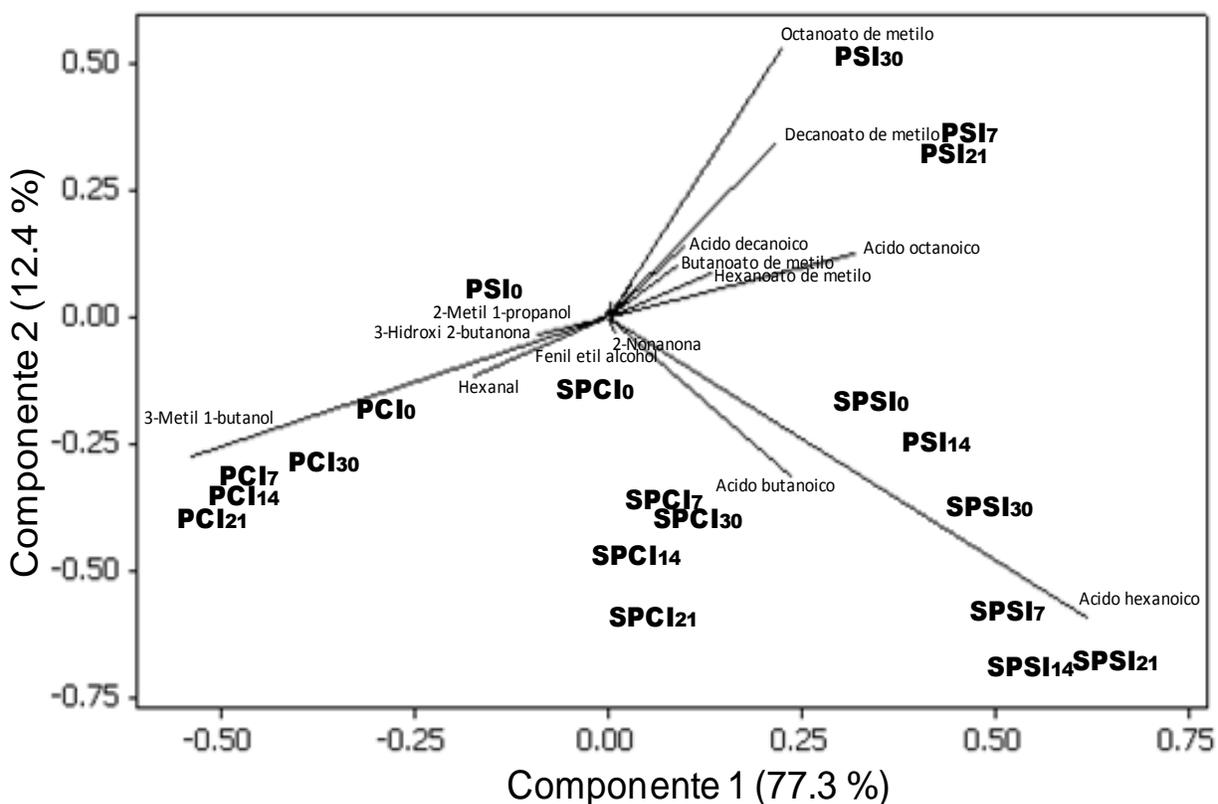


Figura 27. Análisis de componentes principales (ACP), tendencia de 38 compuestos identificados para los diferentes tipos de quesos: pasteurizado-con inóculo (PCI), sin pasteurizar-con inóculo (SP-CI), pasteurizado-sin inóculo (P-SI) y sin pasteurizar-sin inóculo (SP-SI). La matriz de datos se presenta en el Anexo B

Cuadro 9. Coordenadas (“loadings”) para el análisis de componentes principales (ACP), de 38 compuestos volátiles identificados para los diferentes tratamientos: pasteurizado-con inóculo (PCI), sin pasteurizar-con inóculo (SP-CI), pasteurizado-sin inóculo (P-SI) y sin pasteurizar-sin inóculo (SP-SI)

Compuesto	Componente 1 (77.3%)	Componente 2 (12.4%)	Compuesto	Componente 1 (77.3%)	Componente 2 (12.4%)
3-metil butanal	-0.01	-0.003	2-metil propanol	-0.024	-0.013
2-pentanona	0	0.005	ácido butanoico	0.235	-0.314
butirato de metilo	0.089	0.099	ácido acético	0	-0.005
3-metil butanol	-0.538	-0.276	3-hidroxi 2-butanona	-0.092	-0.036
hexanal	-0.173	-0.116	etil benceno	-0.001	0.003
2-heptanona	0.031	0.059	D-limoneno	-0.001	0.008
hexanoato de metilo	0.132	0.083	nonanal	-0.003	0.005
benzaldehido	0	-0.003	decanoato de etilo	0.007	-0.003
ácido hexanoico	0.617	-0.595	nonanoato de metilo	0.002	0.018
fenil etil alcohol	-0.029	-0.017	14-metil pentadecanoato de metilo	0	0.002
octanoato de metilo	0.224	0.529	ácido heptanoico	0.004	0.026
ácido octanoico	0.317	0.126	undecanoato de metilo	0.001	0.006
decanoato de metilo	0.216	0.342	meristolato de metilo	0.001	0.008
ácido n-decanoico	0.097	0.14	ciclopropanoato de metilo	0.001	0.007
δ- decalactona	0.002	0.001	hexanol	-0.002	-0.001
lauroato de metilo	0.016	0.033	1, 3 dimetil benceno	-0.004	-0.001
2-nonanona	0.009	-0.03	heptanal	-0.001	-0.001
tetradecanoato de metilo	0.001	0.008	acetaldehído	-0.002	-0.001
2-undecanona	0	-0.001	1-etil -3-metil-benceno	0.001	-0.001

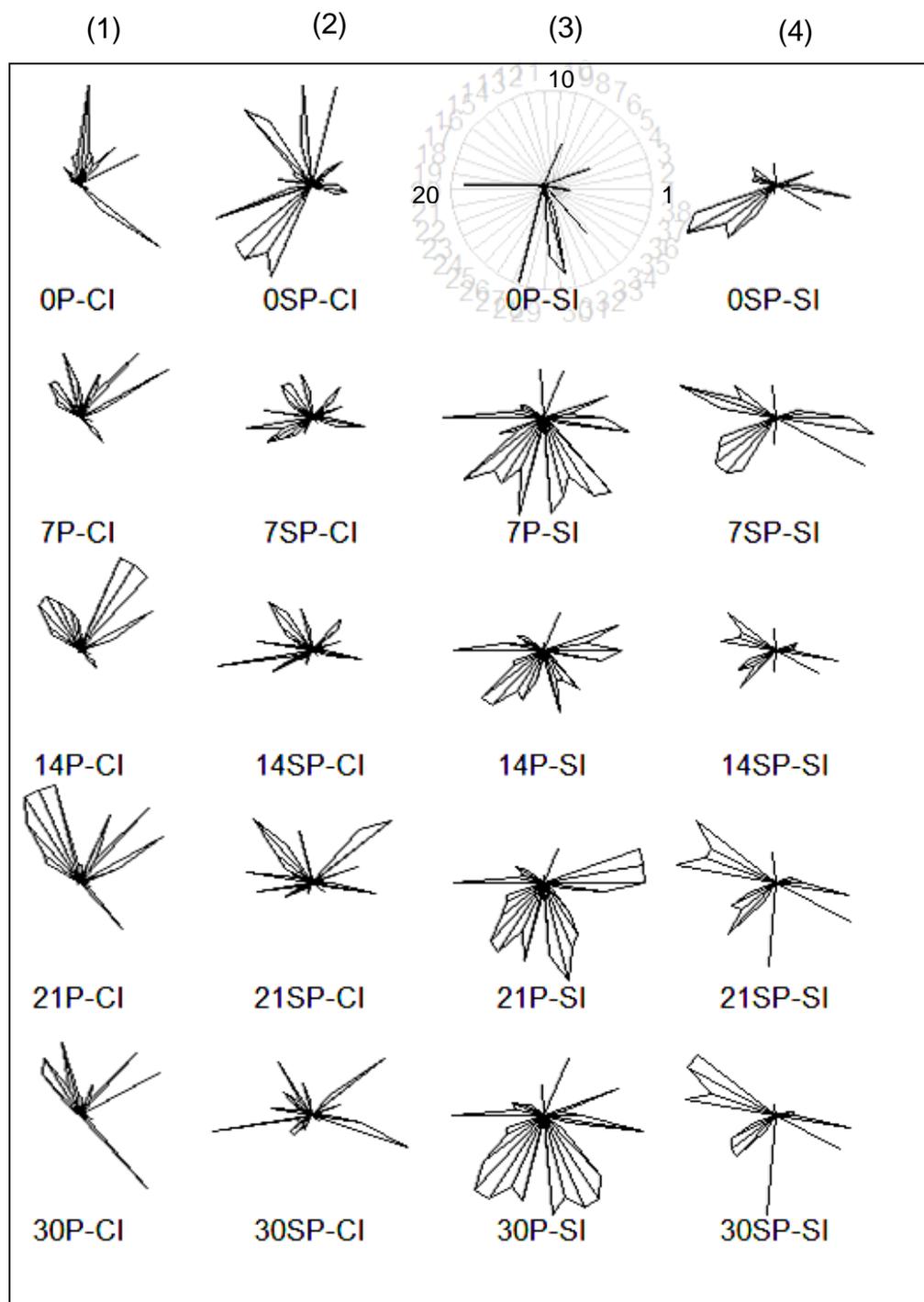


Figura 28. Presencia y concentración de 38 compuestos a lo largo del tiempo (días 0, 7, 14, 21 y 30), para los diferentes quesos elaborados: (1) pasteurizado-con inóculo (P-CI), (2) sin pasteurizar-con inóculo (SP-CI), (3) pasteurizado-sin inóculo (P-SI) y (4) sin pasteurizar-sin inóculo (SP-SI) “El número en la estrella indica el orden de los compuestos”

Cuadro 10. Número correspondiente al compuesto que se observa en el gráfico de estrella

Número ☆	Compuestos	Grupo químico
1	2-heptanona	Cetonas
2	2-nonanona	
3	2-pentanona	
4	3-hidroxi 2-butanona	
5	2-undecanona	
6	hexanal	Aldehídos
7	heptanal	
8	nonanal	
9	3-metil butanal	
10	acetaldehído	
11	benzaldehído	
12	3-metil butanol	Alcoholes
13	1-hexanol	
14	fenil etil alcohol	
15	2-metil 1-propanol	
16	ácido hexanoico	Ácidos
17	ácido octanoico	
18	ácido n-decanoico	
19	ácido butanoico	
20	ácido heptanoico	
21	ácido acético	
22	butirato de metilo	
23	hexanoato de metilo	Ésteres
24	octanoato de metilo	
25	decanoato de metilo	
26	lauroato de metilo	
27	tetradecanoato de metilo	
28	nonanoato de metilo	
29	decanoato de etilo	
30	meristolato de metilo	
31	14- metil pentadecanoato de metilo	
32	undecanoato de metilo	
33	ciclopropanoato de metilo	
34	D-limoneno	Hidrocarburo
35	1,3 dimetil benceno	Aromáticos
36	1-etil 3-metil benceno	
37	etil benceno	
38	δ- decalactona	Lactona

La elaboración del queso con y sin adición del cultivo protector así como el empleo de leche pasteurizada y sin pasteurizar determina la tendencia de formación de los componentes de sabor en la matriz del queso.

La elaboración de queso fresco tipo panela a base de leche pasteurizada resulta en la pérdida de características típicas de dicho producto, en contraste con los quesos que se elaboran a partir de leche cruda. Los cultivos protectores pueden reemplazar la compleja flora presente en la leche cruda por un cultivo estándar que resulta en características uniformes. Diferentes esfuerzos se han hecho para obtener cepas nativas de la microflora presente en leche y quesos artesanales para emplearlos en el uso de queso elaborado con leche pasteurizada recuperando las características típicas de los quesos tradicionales (Mendia *et al.*, 2000).

La formación de compuestos de sabor a través del tiempo para cada tipo de procesamiento del queso se ilustra en la Figura 28. El queso P-CI (columna 1), muestra la tendencia de aparición y concentración de los compuestos más abundantes. En el día 0 se observa la existencia de los compuestos 4, 10 y 34 (3-hidroxi 2-butanona, acetaldehído y D-limoneno, respectivamente), en mayor abundancia. Sin embargo, estos compuestos aumentan o se pierden a través del tiempo como lo muestra el gráfico de estrellas. Esto puede deberse a las complejas reacciones bioquímicas y químicas en la matriz el queso a lo largo del periodo almacenado. El queso P-CI en el día 7 muestra una concentración más equilibrada de los compuestos analizados, encontrándose un grupo de compuestos en mayor abundancia 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16 y 17 (3-hidroxi 2-butanona, 2-undecanona, hexanal, heptanal, nonanal, 1-hexanol, fenil etil alcohol, 2-metil 1-propanol, ácido hexanoico y ácido octanoico), de los cuales el 6, 7, 8, 13, 14 y 15 muestran un incremento a los 14 días. Los compuestos 12, 13 y 14, observados en el día 21 muestran un aumento considerable dominando en el gráfico de estrellas en cuanto a concentración respecto a los otros compuestos. En el día 30 los compuestos 4, 7, 12 y 14 son los que se observan en mayor abundancia.

En la Figura 28 los grupos que determinan la orientación de los picos en el gráfico de estrella a través del tiempo, son los mismos que se observan en el análisis de componentes principales (Figura 27), y que está determinado por la presencia de alcoholes, aldehídos y cetonas. Cabe aclarar que en la Figura 27 se muestran todos los compuestos de sabor detectados en todos los tratamientos.

En la Figura 28, el queso elaborado SP-CI muestra la tendencia a través del tiempo de los compuestos en mayor abundancia. Al inicio (día 0) existe la formación de diferentes compuestos: 4, 5, 6, 9, 12, 14, 15, 22, 24, 25, 26, 27 y 38 (3-hidroxi 2-butanona, 2-undecanona, hexanal, 3-metil butanal, 3-metil butanol, fenil etil alcohol, 2-metil 1-propanol, butirato de metilo, octanoato de metilo, decanoato de metilo, laurato de metilo y tetradecanoato de metilo respectivamente) en elevadas concentraciones, los cuales se mantienen al día 7 aunque en menor concentración. En el día 14 se observa que algunos compuestos ya no se detectan; sin embargo, los que se desarrollan y conservan a lo largo del tiempo son: 3, 5, 12, 14, 15, 16, 19, 21, 23 y 38.

Se han reportado compuestos producidos por una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415-2 productora de una bacteriocina que se encuentran en tratamientos adicionados del cultivo protector elaborados con leche pasteurizada y sin pasteurizar, los cuales son hexanal y 3-metil butanol (Garden *et al.*, 2005). Dentro de los 38 compuestos analizados en este trabajo, se encontraron 4 que se han reportado como producidos por *Lactococcus lactis*, entre ellos el hexanal, 3-metil butanal, 3-metil 1 butanol y 2 metil propanol (Garden *et al.*, 2003).

En la Figura 28 el queso P-SI muestra que los compuestos 24 al 28 y 30 al 34 son los que se observaron en mayor concentración y por tanto son los que determinan la tendencia de los picos en el gráfico a través del tiempo. Estos compuestos son principalmente ésteres, lo cual concuerda con el diagrama

general de todos los compuestos detectados en todos los tratamientos, que se resumen en el ACP de la Figura 27.

El queso SP-SI muestra que los compuestos del 15 al 18 al igual que aquellos del 22 al 26, son los más abundantes y por tanto determinan la tendencia y longitud de los picos a través del tiempo (Figura 28). Los grupos químicos que caracterizan este queso son ácidos y ésteres lo cual concuerda con los compuestos detectados en todos los tratamientos, que se resumen en el ACP de la Figura 27. Debe aclararse que este gráfico solo sirve para observar la tendencia de formación de los compuestos de sabor para todos los tratamientos de manera general y el gráfico de estrellas nos permite observar a través del tiempo qué es lo que está ocurriendo con el desarrollo de dichos compuestos.

De manera general se observó que los quesos elaborados (P-CI, SP-CI, P-SI y SP-SI), llegan a un punto de “máxima homogeneidad” en la formación de los compuestos de sabor, en donde los compuestos disminuyen su concentración con el tiempo de almacenamiento y posteriormente tienden a aumentar conforme pasa el tiempo. En el queso adicionado del inóculo (*L. lactis* UQ2 rif L⁺) tanto pasteurizado como sin pasteurizar se observa dicha “máxima homogeneidad” en el día 7. En los quesos elaborados sin la adición del inóculo tanto pasteurizado como sin pasteurizar se observa dicho fenómeno en el día 14. Esto probablemente ocurra debido a que los 38 compuestos seleccionados determinan el sabor en base a su interacción y concentración en relación con otros compuestos que se desarrollan dentro de la matriz del queso, por lo cual al aumentar o disminuir su concentración, se tiende a un equilibrio del sabor.

El sabor es una de los más importantes atributos del queso, proceso muy complejo originado de la combinación de diferentes aspectos, incluyendo el microbiológico, bioquímico y tecnológico. Los cultivos protectores bien utilizados son llamados la llave del sabor durante la maduración del queso (Ayard et al., 1999, 2000).

VIII. CONCLUSIONES

La adición de *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺, como cultivo protector muestra un buen efecto en la bioconservación del alimento, manteniendo a lo largo del tiempo los estándares microbiológicos establecidos en la norma NOM-121-SSA1-1994, sin embargo produce hasta 3.6 veces más nisina que la permitida por la mencionada norma (500 UI/g) para la superficie de queso procesado. Sin embargo, no existe norma para la cantidad máxima de nisina en queso fresco.

La adición del cultivo protector modificó la textura y el sabor del producto (P-CI). De acuerdo con los parámetros de aroma, sabor y agrado por el consumidor de los quesos P-CI y P-SI, se concluye que la aceptación del queso P-CI es buena a pesar de ser menor que la del queso P-SI ya que no existe contraparte comercial, por las características brindadas por el cultivo.

Mediante la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME), se identificaron 38 compuestos presentes en todas las muestras, encontrándose que diversifican en 8 grupos principales: cetonas, aldehídos, alcoholes, ácidos, ésteres, lactonas, un hidrocarburo y un compuesto aromático.

Dentro de los 38 compuestos seleccionados se encontraron 4 previamente reportados como producidos por *Lactococcus lactis*: hexanal, 3-metil-butanal, 3-metil- 1-butanol y 2-metil-propanol, los cuales podrían estar determinando la orientación del sabor en el queso adicionado del cultivo protector.

El desarrollo de compuestos a través del tiempo es específico para cada tipo de queso. En el queso P-CI y SP-CI se observa una mayor concentración de compuestos al inicio y una concentración equilibrada en el día 7 de donde empieza el aumento en la concentración hasta el día 30, similar a lo encontrado para el queso P-SI y SP-SI en el cual se observa la concentración equilibrada de los compuestos de sabor en el día 14.

La adición de un cultivo protector tiene un efecto bifuncional, por un lado brinda un efecto bioprotector el cual mantiene su estabilidad microbiológica, y por otro lado desarrolla un conjunto de compuestos de sabor y aroma que resultan agradables al consumidor.

Los cultivos protectores como los del género *Lactococcus* tienen un gran futuro en la industria ya que brindan características de sabor y aroma al queso, que son sensorialmente aceptados. Además, cuenta con un valor añadido ya que es productor de nisina, la cual tiene gran potencial biotecnológico como antimicrobiano natural de grado alimenticio.

Una perspectiva del trabajo es encontrar las condiciones adecuadas para obtener un producto con buena calidad microbiológica y con cualidades de sabor y aroma características de un queso, que brinde al consumidor un producto con calidad microbiológica, textura adecuada y un sabor agradable.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado C., García-Almendárez B. E., Martin S. E., Regalado C. 2005. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. *Current Microbiology*. 51: 1-7.
- Ayard E. H. E. 2009. Starter culture development for improving safety and quality of Domiati cheese. *Food Microbiology*. 26: 533-541.
- Ayard E. H. E., Verheul A., De Jong C., Wouters J. T. M., Smit G. 1999. Flavour forming abilities and amino acid requirement of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin. *International Dairy Journal*. 9: 725-735.
- Ayard E. H. E., Verheul A., Wouters J. T. M., Smit G. 2000. Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *International Dairy Journal*. 10: 169-179.
- Azarnia S. 2006. Biotechnological methods to accelerate cheddar cheese ripening. *Critical Reviews in Biotechnology*. 26: 121-143.
- Barry M. 2009. Unpasteurized milk: A continuing public health threat. *Travel Medicine Advisor*. 19:4 17-20.
- Bhunia A., Johnson M., Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidolactic*. *Applied Journal of Bacteriology*. 65: 533-541.
- British Standards Institution. 1974. Methods for the estimation and differentiation of nisin in processed cheese. BS 4020.
- Burbank H. M., Quian M. C. 2005. Volatile sulfur compounds in Cheddar cheese determined by headspace solid-phase microextraction and gas chromatograph-pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1066: 149-127.
- Burdock A. G. 2010. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. Sexta edición. Taylor and Francia Group. Estados Unidos de América. 777-788.
- Cayot N. 2007. Sensory quality of traditional food. *Food Chemistry*. 102: 445-453.
- Chatterjee C., Paul M., Xie L., van der Donk W. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*. 105: 633-683.

- Chin H. W, Bernhard R. A, Rosemberg M. 1996. Solid phase microextraction for cheese volatile compound analysis. *Journal of Food Science*. 61: 1118-1123.
- Codex Alimentarius, 1999. Norma general para Queso – CODEX STAN A-61978.
- Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Food Microbiology*. 3: 777-788.
- Curioni P. M. G. y Bosset J. O. 2002. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*. 12: 959-984.
- Davidson, P. M., y Hoover, D. G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria*. Salminen, S., Von Wright A. (Eds.) Marcel Dekker. New York. 127-159.
- Davidson, P., Sofos, J., Branen, A. 2005. *Antimicrobials in Food*. 3ra. ed., CRC., Boca Raton: 275-287.
- Davies E. A., Bevis H. E. Delves-Broughton. 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Applied Bacteriology*. 24: 343-346.
- Delgado J. F., González-Crespo J., Ladero L., Cava R., Ramírez R. 2009. Free fatty acids and oxidative change of a Spanish soft cheese (PDO “Torta del Cesar”) during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 1721-1728.
- FDA, U. S. Food and Drug Administration. 2011. Investigation operations manual. Exhibits 8-6. <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/IOM/ucm127372.htm>. 10 de Agosto del 2011.
- García-Almendárez B. E., Cann I. K. O., Martin S. E., Guerrero-Legarreta I., Regalado C. 2008. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*. 19: 670-680.
- García-Parra M. D., García-Almendárez B. E., Guevara-Olvera L., Guevara-González R. G., Rodríguez A., Martínez B., Domínguez-Domínguez J., Regalado C. 2011. Effect of sub-inhibitory amounts of nisin and mineral salts on nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 in skim milk. *Food and Bioprocess Technology*. 4: 646-654.
- García-Parra M., Campelo A., García-Almendárez B. E., Regalado R., Rodríguez A., Martínez B. 2010. Enhancement of nisin production in milk by conjugal transfer of the protease-lactose plasmid pLP712 to the wild strain

- Lactococcus lactis* UQ2. International Journal of Dairy Technology. 63: 523-529.
- Garden S., Ávila M., Medina M., Nuñez M. 2005. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on the volatile compounds, odor and aroma of Hispánico cheese. International Dairy Journal. 15: 1034-1043.
- Garden S., Ávila Msu., Fernández-García E., Mediana 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. International Dairy Journal. 17: 717-726.
- Garden S., Carbolnell M., Fernández-García E., Medina M., Nuñez M. 2002. Proteolysis in Hispánico cheese manufactured using a mesophilic starter, a thermophilic starter, and bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* INIA 415. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 50: 6752-6757.
- Guinane C. M., Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. Journal of Applied Microbiology. 98: 1316-1325.
- Hansen E. B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. International Journal of Food Microbiology. 78: 119-131.
- Harmark J. W., Davidson B. E., Hillier A. J., Gordon J. B., Wilcock A., Hickey M. W., Coventry M. J. 1997. Inhibition of *listeria monocytogenes* by piscocolin 126 in milk and camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. Journal of Applied Microbiology. 82: 273-280.
- Jae-Hwan L, Raymond D, Gur-Yoo K, David B. M. 2003. Optimization of solid phase microextraction analysis for the headspace volatile compounds of Parmesan Cheese. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 51: 1136-1140.
- Januszkiewicz J., Sabik H., Azarnia S., Lee B. 2008. Optimization of headspace solid-phase microextraction for the analysis of specific flavor in enzyme modified and natural Cheddar cheese using factorial design and response surface methodology. Journal of Chromatography A. 1195: 16-24.
- Jay, J. M. 2000. Modern Food Microbiology. 6a. ed., Aspen, Gaithersburg. 114-115.
- Kubicková J., Grosch W. 1996. Evaluation of potent odorants of camembert cheese by dilution and concentration techniques. International Dairy Journal. 7: 65-70.

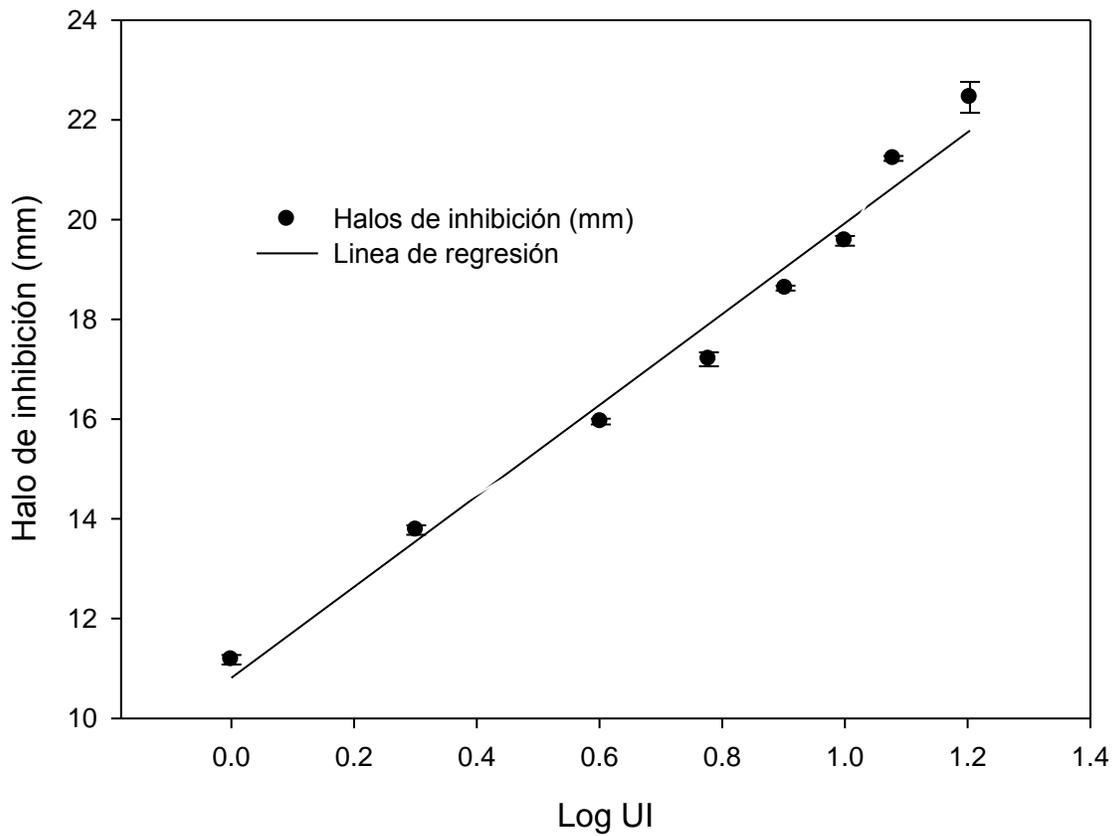
- Leistner L. 2000. Use of combined preservative factors in foods of developing countries. En: Lund, B.M., Baird, P.T., Gould, G.W. (Eds.). The Microbiological Safety and Quality of Food. 41-46.
- Leistner L., Gorris L. 1995. Food preservation by hurdle technology. Trends in Food Science and Technology. 6: 41-46.
- Marilley L., Casey M. G. 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. International Journal of Food Microbiology. 90: 139-159.
- Martínez-Cuesta M. C., Requena T., Peláez C. 2001. Use of a bacteriocin-producing trasconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. International Journal of Food Microbiology. 70: 79-88.
- Martins J. T., Cequeira M. A., Souza B. W., Carmo Avides M. D., Vicente A. A. 2010. Shelf life extension of Ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporation of nisin against *Listeria monocytogenes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58: 1884-1891.
- McDonald, P. D. M., Whitwam, R. E., Boggs, J. D., MacCormack, N. 2005. Outbreak of listeriosis among mexican immigrants as a result of consumption of Illicitly produced mexican-stily cheese. Infectious Diseases Society of America. 677- 682.
- Mendia C., Ibañez F. J., Torre P., Barcina Y. 2000. Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis en ewes' milk cheese. Food Control. Vol. 11: 195-200.
- Montville, T., Winkowski, K. 2001. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.) Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2a Ed. American Society for Microbiology. Washington. 557-572.
- Morales P., Fernández-García E., Gaya P., Nuñez M. 2003. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes milk cheese. International Dairy Journal. 13: 201-209.
- Morales P., Fernnández-García E., Gaya P., Medina M., Nuñez M. 2001. Hydrolysis of caseins and formation of hydrophilic and hydrophobic peptides by wild *lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. Jornal of Applied Microbiology. 91: 907-915.
- NMX-F-098-1976 Determinación de proteínas en alimentos. Abril 04 del 2011.

- NMX-F-099-1970. Método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Abril 04 del 2011.
- NMX-F-100-1984. Alimentos lácteos. Determinación de grasa butírica en quesos. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. Abril 04 del 2011.
- NMX-F-255-1978. Mexicana de Bienes y Servicios. Método de conteo de hongos y levaduras en Alimentos. Junio 04 de 2011.
- NOM-091-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Junio 04 del 2011.
- NOM-112-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. Abril 04 del 2011.
- NOM-121-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Abril 04 del 2011.
- Olivares A., Navarro J. L., Flores M. 2009. Establishment of the contribution of volatile compounds to the aroma of fermented sausages at different stages of processing and storage. *Food Chemistry*. 115:1464-1472.
- Peláez C., Requena T. 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*. 15: 831- 844.
- Pini P. N, Gilbert R. J. 1988. The occurrence in de UK of *Listeria* species in raw chicken and soft food. *International Journal of Food Microbiology*. 6: 317-26.
- Raheem, D., Saris, P. 2009. Inhibition of toxicogenic *Bacillus licheniformis* 553¹ in Nigerian Wara soft cheese by nisin-producing *Lactococcus lactis* LAC309. *International Journal of Food Science and Technology*. 44: 246-250.
- Randazzo C. L., Pitino I., De Luca S., Scifò G. O., Caggia C. 2008. Effect of wild strain used as started cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siliciano cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 122: 269-278.
- Renye J. A., Somkuti G. A., Vallejo-Cordoba B., Van Hekken D. L., González-Cordova A. F. 2008. Characterization of the microflora isolated from queso fresco made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Safety*. 28: 59-75.

- Rodríguez E., Arques J.L., Gaya P., Tomillo J., Nuñez M., Medina M., 2000. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semihard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. *Milchwissenschaft* 55: 633-635.
- Sallami L. Kheadr E. E. Fliss I. Vuilleumard J. C. 2004. Impact of autolytic and proteolytic lactobacilli and nisin-producing culture on proteolysis and sensory characteristics in cheddar cheese. *Journal of Food Science*. 69: 24-32.
- Salminen S., Von Wright A. 1993. Lactic acid bacteria. Marcel Dekker. USA. 97: 104-150.
- Smit B. A., Engels W. J. M., Smit G., 2009. Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and biotechnology*. 81: 987-999.
- 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.
- Stiles M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 331-345.
- Tramer J. y Fowler G.G. 1964. Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 15: 522-528.
- Urbach G. 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavor compounds formation in dairy products. *International Dairy Journal*. 5: 877-903.
- Vanderzant C., Splittstoesser D. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3a Ed., American Public Health Association. Washington: 75-97.
- Vazquez-Landaverde P. A., Qian M. C. 2007. Antioxidant impactis on volatile formation in high-pressure-processed milk. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 55: 9183-9188.
- Verzera A., Ziino M., Conduro C., Romeo V., Zappala M. 2004. Solid-phase micioextraction and gas chromatography-mass spectrometry for rapid characterization of semi-hard cheese. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 380: 930-936.
- Yvon M., Rijnen L. 2001. Cheese flavor formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*. 11: 185-201.

X. ANEXOS

ANEXO A. - Curva estandar de nisina



a= 10.8116660884

b= 9.114693485

$r^2 = 0.9813698795$

No CAS	Cetonas					Aldehídos					
	2-Heptanona	2-Nonanona	2-Pentanona	3-Hidroxi 2-Butanona	2-Undecanona	Hexanal	Heptanal	Nonanal	3-Metil Butanal	Acetaldehído	Benzaldehído
	110-43-0	821-55-6	107-87-9	513-86-0	112-12-9	66-25-1	111-71-7	124-19-6	590-86-3	122-78-1	100-52-7
P-CIT0	37.1	22.4	39.3	1120.5	0.0	1656.1	11.0	30.5	704.1	105.5	54.7
P-CIT7	49.1	25.5	65.6	1735.8	0.0	2771.7	15.3	45.1	137.8	22.3	61.6
P-CIT14	61.0	27.8	81.8	1419.6	0.0	3168.8	52.5	97.1	123.0	13.0	53.9
P-CIT021	86.8	44.7	89.8	1625.5	0.0	3239.0	14.6	70.5	85.6	17.8	30.3
P-CIT030	70.8	31.9	47.7	1547.4	0.0	2697.2	9.8	30.6	73.1	18.2	36.2
SP-CI-T0	201.2	59.2	55.6	195.4	6.7	674.3	0.0	0.0	1985.0	0.0	176.3
SP-CI-T7	139.2	58.7	77.2	123.7	4.8	1327.9	0.0	0.0	85.5	0.0	47.3
SP-CI-T14	103.7	53.0	74.8	95.8	6.0	1299.2	0.0	0.0	62.5	0.0	34.5
SP-CI-T21	156.2	67.3	99.5	60.3	18.1	2289.6	0.0	0.0	82.6	0.0	9.1
SP-CI-T30	128.3	59.5	75.3	41.0	16.6	924.7	0.0	0.0	47.2	0.0	24.5
P-SI-T0	25.9	18.2	99.2	0.0	0.0	0.0	0.0	43.1	0.0	0.0	0.9
P-SI-T7	429.4	246.1	121.3	0.0	0.0	0.0	0.0	48.5	0.0	0.0	85.6
P-SI-T14	544.5	407.3	134.8	0.0	0.0	0.0	0.0	39.6	0.0	0.0	14.4
P-SI-T21	690.1	924.6	161.9	0.0	0.0	0.0	0.0	35.0	0.0	0.0	13.9
P-SI-T30	288.5	188.9	135.9	0.0	0.0	0.0	0.0	59.3	0.0	0.0	53.8
SP-SI-T0	197.6	80.1	86.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38.9
SP-SI-T7	524.4	326.5	67.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	58.5
SP-SI-T14	136.5	197.4	67.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38.2
SP-SI-T21	210.6	197.9	58.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	52.0
SP-SI-T30	151.9	185.1	43.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	19.5

ANEXO B1. Tabla de concentración en ppb de 38 compuestos, de los diferentes tratamientos SPCI- Sin pasteurizar con inóculo, SPSI- sin pasteurizar sin inóculo, PCI- Pasteurizado con inóculo y PSI- pasteurizado sin inóculo, medido en los días 0, 7, 14, 21 y 30

Alcoholes					Ácidos					
	3-Metil butanol	1-Hexanol	Fenil etil alcohol	2-Metil 1-Propanol	Ácido Hexanoico	Ácido Octanoico	Ácido n-decanoico	Ácido Butanoico	Ácido Heptanoico	Ácido acético
No CAS	123-51-3	111-27-3	60-12-8	78-83-1	142-62-1	124-07-2	334-48-5	107-92-6	111-14-8	64-19-7
P-CIT0	3417.4	9.2	88.2	180.3	1913.6	1025.5	0.0	0.0	0.0	0.0
P-CIT7	7766.8	64.0	331.7	334.4	4669.7	2666.2	0.0	0.0	0.0	0.0
P-CIT14	4652.3	1187.2	487.2	443.6	5814.6	3308.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-CIT021	11876.8	2311.9	769.1	574.9	6976.7	3973.8	0.0	0.0	0.0	0.0
P-CIT030	8800.4	674.7	509.2	401.3	2857.5	981.7	0.0	0.0	0.0	0.0
SP-CI-T0	4839.4	0.0	588.2	732.0	3487.2	2105.3	321.9	2197.0	0.0	37.8
SP-CI-T7	5201.6	0.0	302.0	316.4	4699.1	2271.4	261.0	3074.8	0.0	114.9
SP-CI-T14	4922.4	0.0	345.6	465.8	5901.6	2974.6	457.9	3615.8	0.0	164.7
SP-CI-T21	6271.7	0.0	342.4	621.7	7022.3	3194.3	648.8	4215.7	0.0	96.5
SP-CI-T30	3891.1	0.0	482.7	113.0	5457.2	2402.0	598.0	2623.5	0.0	175.1
P-SI-T0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.2	45.8	53.7	131.7	163.7	0.0
P-SI-T7	0.0	0.0	0.0	0.0	3286.8	2602.7	1028.5	2314.5	207.2	0.0
P-SI-T14	0.0	0.0	0.0	0.0	3613.1	3036.4	660.9	2521.7	184.1	0.0
P-SI-T21	0.0	0.0	0.0	0.0	3092.3	3237.1	936.3	1826.3	184.7	0.0
P-SI-T30	0.0	0.0	0.0	0.0	2406.1	2347.2	1536.5	1746.9	187.5	0.0
SP-SI-T0	0.0	0.0	0.0	0.0	4487.5	2435.4	959.7	1507.0	0.0	0.0
SP-SI-T7	0.0	0.0	0.0	0.0	7895.5	3915.8	4540.0	3503.7	0.0	0.0
SP-SI-T14	0.0	0.0	0.0	0.0	9119.6	3839.5	1727.6	3580.0	0.0	0.0
SP-SI-T21	0.0	0.0	0.0	0.0	15451.0	7279.7	3316.1	6439.1	0.0	0.0
SP-SI-T30	0.0	0.0	0.0	0.0	15075.8	10248.9	3001.3	5779.8	0.0	0.0

ANEXO B2. Tabla de concentración en ppb de 38 compuestos, de los diferentes tratamientos SPCI- Sin pasteurizar con inóculo, SPSI- sin pasteurizar sin inóculo, PCI- Pasteurizado con inóculo y PSI- pasteurizado sin inóculo, medido en los días 0, 7, 14, 21 y 30

Ésteres

	Butirato de metilo	Hexanoato de metilo	Octanoato de metilo	Decanoato de metilo	Lauroato de metilo	Tetradecanoato de metilo	Nonanoato de metilo	Decanoato de etilo	Meristolato de metilo	14- metil Pentadecanoato de metilo
No CAS	623-42-7	106-70-7	111-11-5	110-42-9	111-82-0	124-10-7	1731-84-6	110-38-3	56219-06-8	5129-60-2
P-CIT0	0.0	22.7	85.3	39.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-CIT7	0.0	58.6	78.9	15.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-CIT14	0.0	92.3	64.2	47.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-CIT021	0.0	94.1	123.7	31.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
P-CIT030	0.0	31.4	42.3	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SP-CI-T0	2501.1	102.4	3705.6	2898.4	357.0	107.6	0.0	0.0	0.0	0.0
SP-CI-T7	744.6	1820.7	1213.5	670.4	40.3	18.0	0.0	0.0	0.0	0.0
SP-CI-T14	369.9	1568.2	631.8	360.7	29.8	16.8	0.0	0.0	0.0	0.0
SP-CI-T21	291.6	1086.5	503.5	305.1	31.2	11.7	0.0	0.0	0.0	0.0
SP-CI-T30	365.3	532.0	1088.3	775.7	49.2	17.7	0.0	0.0	0.0	0.0
P-SI-T0	120.3	115.3	45.5	42.6	6.3	5.9	143.0	1.4	46.5	11.1
P-SI-T7	1174.1	988.7	3826.6	2089.3	354.3	59.3	144.7	29.0	63.1	10.0
P-SI-T14	780.6	1257.1	2947.8	2191.2	215.7	57.2	43.4	25.4	10.5	8.0
P-SI-T21	974.8	1525.5	2069.0	2293.0	375.9	55.1	117.1	40.6	48.3	12.4
P-SI-T30	952.5	1525.0	2936.4	2908.3	452.0	83.8	127.7	25.4	67.1	10.4
SP-SI-T0	2149.3	3597.0	2400.4	2056.7	160.8	0.0	0.0	45.7	0.0	0.0
SP-SI-T7	1409.5	2271.1	2895.4	2123.9	278.7	0.0	0.0	150.7	0.0	0.0
SP-SI-T14	677.8	1475.3	1008.0	1498.1	48.5	0.0	0.0	124.7	0.0	0.0
SP-SI-T21	658.0	1774.1	1647.1	2013.5	104.6	0.0	0.0	472.3	0.0	0.0
SP-SI-T30	556.7	1792.2	2098.6	1621.6	89.1	0.0	0.0	570.3	0.0	0.0

ANEXO B3. Tabla de concentración en ppb de 38 compuestos, de los diferentes tratamientos SPCI- Sin pasteurizar con inóculo, SPSI- sin pasteurizar sin inóculo, PCI- Pasteurizado con inóculo y PSI- pasteurizado sin inóculo, medido en los días 0, 7, 14, 21 y 30

	Esteres		Hidrocarburo		Aromático		Lactona
	Undecanoato de metilo	Ciclopropanoato de metilo	D-Limonene	1,3 Dimetil benceno	1-etil 3-metil benceno	Etil benceno	δ- Decalactona
No CAS	1731-86-8	10152-60-0	5989-27-5	108-38-3	620-14-4	100-41-4	705-86-2
P-CIT0	0.0	0.0	26.0	704.1	0.0	14.0	0.0
P-CIT7	0.0	0.0	27.7	137.8	0.0	19.7	0.0
P-CIT14	0.0	0.0	18.7	123.0	0.0	16.6	0.0
P-CIT021	0.0	0.0	50.4	85.6	0.0	19.6	0.0
P-CIT030	0.0	0.0	81.1	73.1	0.0	19.9	0.0
SP-CI-T0	0.0	0.0	0.0	64.3	0.0	41.9	13.2
SP-CI-T7	0.0	0.0	0.0	52.7	0.0	44.5	19.7
SP-CI-T14	0.0	0.0	0.0	53.6	0.0	28.7	18.4
SP-CI-T21	0.0	0.0	0.0	101.2	0.0	22.5	24.1
SP-CI-T30	0.0	0.0	0.0	56.1	0.0	168.1	18.4
P-SI-T0	15.9	0.0	51.9	45.9	0.0	19.4	10.3
P-SI-T7	36.0	60.5	81.9	81.1	0.0	27.1	32.2
P-SI-T14	18.7	23.1	42.3	58.0	0.0	21.7	22.1
P-SI-T21	40.8	39.9	30.6	82.4	0.0	29.9	22.5
P-SI-T30	56.6	66.3	68.0	154.2	0.0	39.6	37.5
SP-SI-T0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.2	0.0	28.5
SP-SI-T7	0.0	0.0	0.0	0.0	28.1	0.0	37.1
SP-SI-T14	0.0	0.0	0.0	0.0	13.8	0.0	23.4
SP-SI-T21	0.0	0.0	0.0	0.0	23.5	0.0	27.3
SP-SI-T30	0.0	0.0	0.0	0.0	20.4	0.0	28.2

ANEXO B4. Tabla de concentración en ppb de 38 compuestos, de los diferentes tratamientos SPCI- Sin pasteurizar con inóculo, SPSI- sin pasteurizar sin inóculo, PCI- Pasteurizado con inóculo y PSI- pasteurizado sin inóculo, medido en los días 0, 7, 14, 21 y 30

ANEXO C. Encuesta utilizada para la prueba hedónica



Universidad Autónoma de Querétaro
DIPA, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos



Se le presentan dos muestras 126 y 689. Califique los parámetros de la pregunta 1 a la 3, de acuerdo a la siguiente escala:

1.- Muy agradable
2.- Agradable

3.- Ni agradable ni
desagradable

4.- Desagradable
5.- Muy desagradable

126

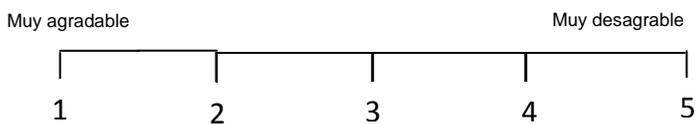
1.- Indique el grado de aceptación del aroma:



2.- Indique el grado de aceptación de sabor:



3.- Indique el agrado de la muestra

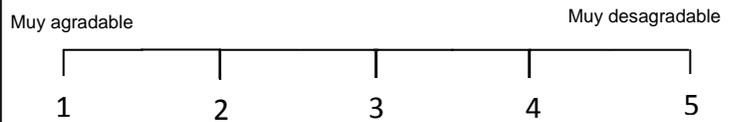


4.- ¿En base al agrado compraría el producto?

Si No

689

1.- Indique el grado de aceptación del aroma:



2.- Indique el grado de aceptación de sabor:



3.- Indique el agrado de la muestra



4.- ¿En base al agrado compraría el producto?

Si No

5.- ¿Cuál de las dos muestras prefiere?

126

689

ANEXO D

Cuadro 1. Interacción en queso elaborado con leche pasteurizada (P-CI), del crecimiento de *L. lactis* UQ2 rif L⁺, pH y actividad de nisina

Tiempo (d)	UI/g	DE	pH	DE	UFC/g	DE
0	193.4	64.5	5.9	0.079	1.5E+08	5.0E+07
7	1836.8	212.3	5.2	0.017	2.2E+08	7.2E+07
14	1181.5	193.8	5.2	0.040	3.0E+08	1.0E+06
21	407.8	135.9	5.3	0.024	2.3E+07	7.5E+06
30	160.6	53.5	4.9	0.075	1.3E+07	4.4E+06

Cuadro 2. Interacción en queso elaborado con leche sin pasteurizada (SP-CI), del crecimiento de *L. lactis* UQ2 rif L⁺, pH y actividad de nisina

Tiempo (d)	UI/g	DE	pH	DE	UFC/g	DE
0	191.7	27.3	5.18	0.0071	1.64E+09	2.9E+07
7	323.4	76.5	4.97	0.0778	2.00E+08	1.1E+07
14	457.5	15.4	4.55	0.3041	7.25E+08	5.8E+06
21	1297.8	16.4	4.1	0.0707	6.33E+07	1.1E+06
30	179.2	14.9	4.06	0.0425	2.08E+07	5.8E+05

Cuadro 3. Dinámica poblacional de Bacterias ácido lácticas (BAL), en la matriz del queso elaborado con leche pasteurizada

Tiempo	UFC/g	UFC/g	Promedio	DE
0	4.50E+06	3.50E+06	4.00E+06	3.54E+05
7	2.52E+09	2.07E+09	2.29E+09	1.59E+08
14	3.80E+08	2.93E+08	3.37E+08	3.06E+07
21	8.80E+07	8.05E+07	8.43E+07	2.65E+06
30	3.10E+06	2.80E+06	2.95E+06	1.06E+05

Cuadro 4. Desarrollo de títulos de nisina en la matriz del queso, mediante el crecimiento de *L. lactis* UQ2 rif L⁺

Tiempo	UI/g (P-CI)	DE	UI/g (SP-CI)	DE
0	193.4	64.5	191.8	27.3
7	1836.8	212.3	323.5	76.5
14	1181.5	193.8	457.5	15.4
21	407.8	135.9	1297.8	16.5
30	160.6	53.5	179.3	14.9

ANEXO E

NÚMERO MÁS PROBABLE DE ORGANISMOS

COMBINACIONES DE TUBOS POSITIVOS			NMP/g
0.1	0.01	0.001	
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
0	2	0	6
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
2	3	0	29
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

Fuente: NMX-F-308-1992. Alimentos - cuenta de organismos coliformes fecales.