

300627



UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

“ ELABORACION DE QUESO CHEDDAR CON
MADURACION ENZIMATICA ACELERADA ”

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

CARLOS SALAZAR IBAÑEZ

ASESOR DE TESIS
M. EN C. MARCOS BAEZ FERNANDEZ

MEXICO D.F.

2005.

17346543



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA UNAM

" ELABORACION DE QUESO CHEDDAR CON
MADURACION ENZIMATICA ACELERADA "

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

CARLOS SALAZAR IBAÑEZ

DIRECTOR: M. EN C. MARCOS BAEZ FERNANDEZ.

MEXICO D.F.

2003

Revisada:
~~*[Signature]*~~
10/06/2004

10 Bo
[Signature]
15^o dic 04

Revisado
[Signature]
2003-12-17
Marcos Baez F

[Signature]
14/E/05

Revisado
[Signature]
14/06/07



UNIVERSIDAD LA SALLE

SOLICITUD DE AUTORIZACION
PARA LA APROBACION E IMPRESIÓN DE TESIS
(INDIVIDUAL)

C. DIRECTOR GENERAL DE INCORPORACION
Y REVALIDACION DE ESTUDIOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Presente

Salazar Ibañez Carlos
APELLIDO PATERNO MATERNO NOMBRE (S)

Número de Cuenta U.N.A.M. 07731039-6 alumno de la Carrera de:

Químico Farmacéutico Biólogo

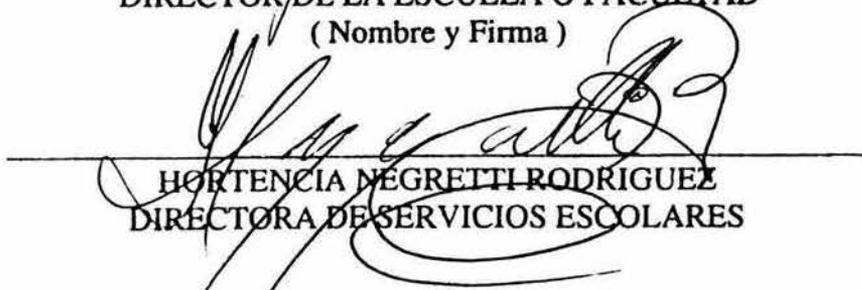
Solicita la autorización de impresión de la Tesis Titulada: Elaboración de Queso Cheddar
con maduración enzimática acelerada


FIRMA DEL SOLICITANTE

OTORGO EL VOTO APROBATORIO


M. en C. Marcos Francisco Báez Fernández
ASESOR DE TESIS
(Nombre y Firma)

M. en C. Raúl Alberto Hausser Luna
DIRECTOR DE LA ESCUELA O FACULTAD
(Nombre y Firma)


HORTENCIA NEGRETTI RODRIGUEZ
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES

México, D.F. a 17 de Enero 2005 del



UNIVERSIDAD LA SALLE

Escuela de Ciencias Químicas
Registro de Anteproyecto de Tesis

Folio: 1583
Fecha: 26.07.04.

DATOS PERSONALES DEL SUSTENTANTE

Nombre: Carlos Salazar Ibañez Clave Ulsa: 795463
 Dirección: Paseo de Londres 367 Residencial Tejeda Teléfono: 01-442-242-37-16
 Carrera: Q.F.B. Plan: SEP UNAM XXX
 Año de Egreso: 1983

DATOS DEL TEMA DE TESIS

Título: ELABORACION DE QUESO CHEDDAR CON MADURACION ENZIMATICA ACELERADA

Palabras Clave (1): QUESO, QUESO CHEDDAR, ENZIMAS, MADURACION, MADURACION ENZIMATICA, ACELERACION BENEFICIO ECONOMICO

Tipo: Bibliográfico: XX Experimental: Teórico:
 Individual: XX Mancomunado(2): Con:

Proyecto de Investigación ULSA No. (3)

Director de Tesis (4): M. en C. MARCOS BAEZ FERNANDEZ

Asesor externo (si lo hay): M. en E. MARCELA R. SALAZAR IBAÑEZ.

Lugar de desarrollo (5): INSTALACIONES DE QUIMCIA ALIMENTICIA DE MEXICO S.A. DE C.V.

Tiempo estimado de desarrollo (6): 12 MESES

Materias del plan de estudio relacionadas con el tema (mínimo 2): LACTEOS, PROCESOS DE ALIMENTOS, MICROBIOLOGIA ENZIMOLOGIA

México, D.F.

La firma de este documento por parte del Director de Tesis y del alumno avala la originalidad del proyecto

Director de Tesis

Asesor Externo

Sustentante

JURADO ASIGNADO PARA LA APROBACIÓN DEL TRABAJO CONCLUIDO

Cargo	Nombre	Firma aceptación anteproyecto
Presidente:	M. en A. E. María Teresa Estrada Alvarado	
Vocal:	M. en C. María Guadalupe Morales Meza	
Secretario:	M. en C. Marcos Báez Fernández	
Suplente:	Q. Irene Montalvo Velarde	
Suplente:	Q.F.B. María de Jesús Ramírez Palomares	

Secretaría Académica

Q.F.B. María Leticia Linares Estudillo

Director

M. en C. Raúl Alberto Hauser Luna

DEDICATORIA.

ESTE ENORME RETO Y GRAN LOGRO LO DEDICO A LA MEMORIA DE :

MI MADRE LA SRA. DOÑA ISABEL IBAÑEZ ORTIZ.

Y MI ABUELA LA PROFRA. DOÑA CELIA ORTIZ CUETO.

AGRADECIMIENTOS.

AGRADEZCO A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE TUVIERON QUE VER CON MI FORMACION PROFESIONAL, PERO MUY EN ESPECIAL A :

MI ESPOSA LA SRA. DOÑA MA. GUADALUPE ROMO ROMO.

MI HERMANA LA MTRA. DOÑA MARCELA ROSARIO SALAZAR IBAÑEZ.

MI PADRE SR. DON CARLOS ISAAC SALAZAR MACIAS.

ÍNDICE

Página	
Introducción	1
Metodología	3
Antecedentes	7
Capítulo I. Generalidades del Queso	9
1.1 Definición	9
1.2 Importancia Nutrimental del queso	10
1.2.1 Importancia de las proteínas contenidas en el queso	10
1.2.2 Importancia de los carbohidratos contenidos en el queso	11
1.2.3 Importancia de los lípidos contenidos en el queso	12
1.2.4 Importancia de las vitaminas contenidas en el queso	13
1.2.5 Importancia de los minerales contenidos en el queso	13
1.2.6 Importancia de los elementos traza contenidos en el queso	14
Capítulo II. Clasificación de los Quesos	15
2.1 Composición Química del queso	16
2.1.1 Prótidos	16
2.1.2 Lípidos	20
2.1.3 Carbohidratos	23
Capítulo III. Queso Cheddar	25
3.1 Características de la leche empleada en la elaboración de queso	27
3.2 Tratamiento Térmico	28
3.3 Adición del Colorante	28
3.3.1 Adición del Cloruro de Calcio	28
3.4 Siembra y maduración de la leche	28
3.5 Adición del fermento	29
3.5.1 Dosis del fermento por agregar para queso Cheddar	30
3.6 Flora microbiana propia de la leche	30
3.6.1 Microorganismos no-iniciadores	32
3.7 Cuajo	32
3.7.1 Cantidad de cuajo por aplicar para obtener queso Cheddar	38
3.7.2 Corte de la cuajada	38
3.7.3 Agitación de la cuajada	38

3.7.4	Cocción de la cuajada	38
3.7.5	Reposo de la cuajada	38
3.7.6	Drenado del suero	38
3.7.7	Cheddarización	39
3.8	Molienda de la cuajada	39
3.9	Salado	40
3.9.1	Tipos de salado	42
3.9.1.1	Adición de la sal en el caso del queso Cheddar	42
3.10	Moldeado	43
3.11	Prensado	43
3.12	Almacenamiento del queso Cheddar	43
3.13	Maduración del queso Cheddar	43
3.14	Rendimiento del queso Cheddar	43
3.15	Especificación del queso Cheddar	44
Capítulo IV. Añejamiento		45
4.1	Glicólisis	45
4.1.1	Cambios en lactato durante la maduración	47
4.1.2	Metabolismo del citrato	48
4.2	Proteólisis	48
4.2.1	Agentes proteolíticos en queso	49
4.2.1.1	Efecto del Coagulante	49
4.2.1.2	Plasmina	52
4.2.1.3	Enzimas proteolíticas de los organismos iniciadores	53
4.2.1.4	Contribución de las proteinasas "iniciadoras" al añejamiento	54
4.2.1.5	Peptidasas	55
4.2.1.6	Aminopeptidasas	55
4.2.1.7	Dipeptidasas	57
4.2.1.8	Tripeptidasas	57
4.2.1.9	Endopeptidasas	57
4.2.1.10	Peptidasas "prolina-específicas"	57
4.2.1.11	Carboxipeptidasas	58
4.3	Sistemas proteolíticos de otros microorganismos	58
4.4	Enzimas de los organismos no iniciadores	59
4.5	Catabolismo de los aminoácidos	60
4.5.1	Papel de la fosfatasa ácida en la maduración del queso	61
4.6	Lipólisis	62
4.6.1	Lipasas de origen animal	66
4.6.2	Lipasas pregástricas	66
4.6.3	Lipasas microbianas	69
4.7	Catabolismo de los ácidos grasos	72
4.7.1	Hidroxiácidos y lactosas ácido-graso	74

Capítulo V. Queso Cheddar con Maduración Enzimática Acelerada	75
5.1 Elevación de la temperatura de maduración	76
5.2 Incremento en el número de células viables por varios métodos	77
5.2.1 Tratamiento de lisozima	77
5.2.2 Adición de extracto crudo o parcialmente purificado de células de cuajada	80
5.2.3 Estimulación de la actividad bacteriana iniciadora	81
5.3 Modificación de los microorganismos iniciadores	81
5.3.1 Células provocadas con calentamiento o con enfriamiento	82
5.3.2 Células atenuadas en secado por aspersión	84
5.3.3 Células tratadas con solventes	84
5.3.4 Cultivos microbianos neutralizados e inactivados	84
5.3.5 Microorganismos mutantes	84
5.3.6 Cepas genéticamente modificadas	86
5.4 Slurries (pastas semi-sólidas)	87
5.5 Adición de enzimas endógenas	89
5.5.1 Métodos para agregar las enzimas al queso	92
5.5.2 Evidencias de la elaboración de queso Cheddar vía maduración enzimática acelerada	96
Capítulo VI. Evidencias de acelerar enzimáticamente la maduración de otros tipos de queso diferentes al Cheddar	110
6.1 Evidencias del uso de la maduración enzimática acelerada en productos alimenticios, distintos al queso	118
Capítulo VII. Regulación	120
7.1 Antecedentes	120
7.2 Legislación Europea	122
7.3 Regulación en Estados Unidos de América	123
7.4 Regulación Internacional	124
7.5 Regulación Mexicana	124
7.5.1 Especificaciones Sanitarias	128
7.5.2 Organolépticas	128
7.5.3 Microbiológicas	128
7.5.4 Químicas	128
7.6 Concordancia con Normas Internacionales	130
7.7 Vigencia	130

Discusión	131
Conclusiones	138
Bibliografía	141

Índice de Tablas.	Página
Tabla 1.- Producción nacional de queso de acuerdo a su tipo, de 1999 a 2004	6
Tabla 2.- Clasificación de quesos de acuerdo a su textura	17
Tabla 3.- Quesos producidos en México	18
Tabla 4.- Distribución de las principales sustancias nitrogenadas de la leche bovina	21
Tabla 5.- Nomenclatura y origen de las principales proteasas usadas como reninas	34
Tabla 6.- Reninas recombinantes con aceptación comercial	37
Tabla 7.- Peptidasas purificadas de las bacterias ácidolácticas	56
Tabla 8.- Concentraciones típicas de ácidos grasos libres en quesos maduros	65
Tabla 9.- Países en donde se permiten las lipasas en quesería	67
Tabla 10.- Las fuentes de lipasas	68
Tabla 11.- Ácidos grasos libres en queso maduro	73
Tabla 12.- Especificación de Fedrick para queso Cheddar con temperatura elevada durante la maduración	78
Tabla 13.- Influencia del choque térmico en la producción de ácido y la actividad de algunos microorganismos	83
Tabla 14.- Condiciones usadas para choque térmico congelado en los microorganismos	85
Tabla 15.- Enzimas proteolíticas usadas en la aceleración de la maduración del queso	91

Tabla 16.- Enzimas lipolíticas usadas en la aceleración de la maduración del queso	93
Tabla 17.- Mezclas de enzimas usadas para acelerar la maduración del queso	94
Tabla 18.- Preparaciones enzimáticas comerciales y sus fuentes	97
Tabla 19.- Acidos grasos volátiles en quesos* tratados con diferentes cantidades de lipasa y que han sido madurados a 10°C	99
Tabla 20.- Proteína soluble* en quesos seleccionados cuya maduración se aceleró enzimáticamente y se llevó a cabo a 10°C	101
Tabla 21.- Comparación entre varios productos enzimáticos que aceleran la maduración del queso	102
Tabla 22.- Análisis costo/beneficio de la aceleración de la maduración del queso	105
Tabla 23.- Preparaciones enzimáticas usadas en cada lote	117
Tabla 24.- Aditivos autorizados por la FAO, publicados en 1996	125
Tabla 25.- Especificaciones fisicoquímicas del queso tipo Cheddar	126
Tabla 26.- Especificaciones microbiológicas para quesos madurados	129

Índice de figuras.	Página
Figura 1.- Cambios que ocurren durante el añejamiento del queso	46
Figura 2.- Curso que sigue la proteólisis de la caseína durante el añejamiento del queso	50
Figura 3.- La lipólisis durante la maduración del queso	63

INTRODUCCIÓN.

En México, se prefieren los quesos frescos y suaves, a diferencia de Europa, adonde gustan más los de sabor fuerte. Se requiere de importaciones para alcanzar el volumen de producción de derivados lácteos demandado por el mercado mexicano (Tórrez, 2001).

El mercado mexicano de lácteos es importante, por el tamaño de su población y precisamente por ser un país deficitario en leche, lo convierte en una de las metas de los grandes exportadores de leche fresca y en polvo. Al finalizar el año 2003, el aumento del total del consumo de lácteos fue de 19.5% en relación a 2002. De particular interés fue el aumento en la disminución de producción de leche, lo que nos lleva a comprobar que las importaciones de leche en polvo siguen en aumento. Este país continúa siendo el mercado de más rápido crecimiento para las exportaciones de productos lácteos de Estados Unidos. Los productos lácteos llegados a México durante el año 2003, fueron de aproximadamente US 548 millones, de los cuales Estados Unidos recibió alrededor del 36% de ese total. La cocina mexicana no incorpora regularmente quesos duros o con sabores fuertes, como quesos añejos tipo Cheddar, sin embargo los quesos tipo Monterrey-Jack y Mozzarella, van muy bien con la cocina nacional. La producción total de queso en México durante el 2003 llegó a las 145,000 mil toneladas, en 2002 138,000 mil toneladas, comparadas con 140,000 mil toneladas del 2001 y 134,000 mil toneladas en 2000 (SAGARPA, 2004).

Dentro de ésta investigación en el capítulo I, se da un panorama de lo que es el queso, su importancia nutrimental y su composición. Para el Capítulo II, se presenta una clasificación de los diferentes tipos de queso, explicando la composición de sus elementos primordiales, proteínas, lípidos y carbohidratos. Para el capítulo III, se desglosa todo el proceso de elaboración del queso Cheddar desde su principal materia prima que es la leche, hasta su maduración, rendimiento y las especificaciones que se obtuvieron por el método propuesto. Se detallan puntos como el tratamiento térmico, la adición del colorante, dosis del fermento, cantidad del cuajo, el drenado del suero, la cheddarización, el tipo de salado, moldeado, prensado, almacenamiento, y maduración. El capítulo IV se compone del procedimiento sobre el añejamiento del queso Cheddar desde lo que es la glicólisis, proteólisis, y lipólisis, el efecto del coagulante, las enzimas iniciadoras, su contribución al añejamiento y se da un amplio panorama de las enzimas que tienen una mayor importancia a éste proceso. En del capítulo V, existe una explicación muy completa de la forma en la que el queso Cheddar se puede llegar a obtener con una maduración enzimática acelerada.

Este capítulo es realmente de suma importancia, ya que en él se detalla el proceso que finalmente corresponde a una nueva propuesta, mejorando principalmente el tiempo de producción. El capítulo VI, contiene ejemplos específicos de otros quesos, obtenidos con el método de maduración enzimática acelerada como son: el queso Ras (egipcio), Ladrillo de Eidam (checo), Manchego (español), Feta (balcánico), Petit-Ossau-Iraty (francés), así como también, se incluye un breve estudio sobre maduración enzimática aplicada en embutidos secos fermentados (en Noruega). Se presenta para el capítulo VII, la Regulación que se ha realizado para éste tipo de quesos, en Europa, Estados Unidos de América, y México. Se habla también de las especificaciones que deben tener éste tipo de quesos que son: organolépticas, microbiológicas, y fisicoquímicas, así como su concordancia con Normas Internacionales y su vigencia. Para finalizar ésta investigación, se presentan la Discusión, las Conclusiones y la Bibliografía correspondiente.

METODOLOGÍA .

OBJETIVO GENERAL .

Mostrar mediante una revisión documental, que es posible obtener queso Cheddar de buena calidad (cuyo tiempo de maduración según el método tradicional tomaría de 9 a 12 meses), en menos tiempo, siendo éste de 1, 2, 3 y hasta 6 meses, mediante el uso de enzimas, y con ello conseguir un ahorro significativo en su costo de fabricación de hasta 110 dólares americanos/tonelada.

OBJETIVO ESPECÍFICO .

Mostrar que utilizando enzimas lipolíticas y proteolíticas durante su maduración, se obtiene queso Cheddar con mejor calidad, comparándolo contra el proceso tradicional.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .

El método tradicional de producción del queso Cheddar, tarda de 9 a 12 meses aproximadamente llevando consigo el cuajado, drenado, cheddarización, salado, moldeado, prensado, y madurado. De lo anterior surge la siguiente pregunta:

¿Cómo optimizar la producción del queso Cheddar en tiempo y costo?

HIPÓTESIS .

Si existiera una nueva tecnología que ayude a los fabricantes de queso Cheddar a mejorar su producción con alta calidad, a menor costo y menor tiempo, ésta se podría incrementar, y por ende aumentaría su consumo.

JUSTIFICACIÓN .

Estados Unidos de América es el principal productor de lácteos a nivel mundial, tan sólo en el 2003 se obtuvieron 77 millones de toneladas de leche fluida; la Unión Europea en su conjunto 115.45 millones de Ton., la Federación Rusa 32.5 millones de Ton., la India 36.5 millones de Ton., Brasil 22.2 millones de Ton., Nueva Zelanda 13 millones de Ton., Australia 10.63 millones de Ton., México 9.87 millones de Ton., China 9 millones de Ton., Japón 8.3 millones de Ton., Argentina 7.9 millones de Ton., Canadá 7.88 millones de Ton.; asimismo en cuanto al queso en Estados Unidos de América se produjeron 3.93 millones de Ton. en 2003, 3.9 millones de Ton. en 2002, 3.744 millones de Ton. en 2001 3.746 millones de Ton. en 2000 y 3.581 millones de Ton. en 1999 (United States Dairy Export Council, 2004).

Hoy, más de una tercera parte de la leche de vaca producida en Estados Unidos de América es destinada a la elaboración de queso. Desde que se abrió la primera quesería en Roma, Nueva York en 1851, la cantidad y variedad de queso y sus derivados han ido en aumento; mientras que en 1909 el consumo per-cápita era de 1.78Kg, en 1945 fue de 4.1Kg, en 1975 de 8.62Kg, en 1999 14.5Kg, y se espera que para el 2005 llegue a 16Kg. Entre 2001 y 2002 su consumo de incrementó el 21%. El crecimiento anual promedio en el consumo de queso mundial es del 3%. En Alemania, el consumo per-cápita ha crecido desde 1962 de 8Kg a 18Kg por año; en Francia es aún mayor, pero en Sud-América, África y Asia es inferior. Actualmente existen más de 300 variedades en el mercado americano; a nivel mundial, Sandine & Elliker sugieren más de 1000, Burkhalter clasifica 510, y Walter & Hargrove más de 400 (World Cheese Exchange, 2002).

La encuesta realizada a los consumidores acerca de que tipo de queso habían consumido fuera de casa durante los pasados 6 meses, en diciembre del 2002, presentó al queso Americano con el 63%, al Cheddar con el 58%, el Suizo con 53%, Mozzarella el 41%, Parmesano 26%, Provolone 23%, Monterrey-Jack 19%, Azul 14%, con Pimienta 9%, y Feta 8% (United States Dairy Export Council, 2002).

Se comparó en 2002 el consumo de queso, frente a la comida "rápida" y a los cereales; el queso ocupó 98%, la comida rápida el 88%, el cereal el 86%. De acuerdo al uso del queso en casa, el 81% de los consumidores lo han ingerido en los pasados 7 días; 52% lo usó como ingrediente, y 38% en forma natural, el resto lo acompañó con otros alimentos. Las razones del porque es preferido son: 98% aprecian mucho su sabor, 97% agregándolo a los platillos los mejora, 95% por su aporte nutritivo, 91% como halago delicioso, 85% ya que es tan americano como el pie de manzana, 72% como parte importante de la dieta diaria. El queso evoca muchas asociaciones positivas en los consumidores (Dairy Proteins, 2002).

Actualmente, la popularidad del queso es muy extensa, lo podemos encontrar en botanas, en pizzas, en alimentos preparados, en hamburguesas, en galletas, con pastas, con papas, en panadería, en aderezos, en dips, etc. El queso Cheddar por si sólo representa el 34.1% del total del queso elaborado en E.U.A. en 2003, 33.1% en 2002, 33.73% en 2001, 34.26% en 2000, y 35.20% en 1999 (United States Dairy Export Council, 2004).

Según los estudios en 2003, el mercado de quesos en México se encuentra deprimido, su crecimiento se ha mantenido estacional y su nivel más bajo lo alcanza en verano debido a muchos factores, incluyendo calor; tradicionalmente en

invierno se recuperan las ventas. En este mercado existe mucha competencia, prácticamente cualquiera podría hacer quesos en casa; a nivel industrial hay muchas empresas, de hecho, se han identificado 84 marcas sólo en el Distrito Federal. Si bien es cierto que en la producción de quesos la leche es determinante, también influyen otros factores como el precio; desafortunadamente el queso es un producto caro, en la actualidad se emplean 10 litros de leche para elaborar 1 Kg., de queso Manchego, lo que necesariamente se refleja en el costo. En México tenemos una gran variedad de quesos de distintas calidades, algunos fabricados bajo estrictos estándares de calidad y otros cuyos ingredientes no son los óptimos. En la Central de Abastos del D.F., podemos encontrar este producto hasta en \$12.00 m.n. el Kg., y en tiendas de auto servicio a un precio sustancialmente mayor desde \$25.00 m.n. hasta de \$ 83.90 m.n. el Kg. Las ventas al detalle no se han recuperado desde la crisis de 1995 y las empresas han tenido que recurrir a técnicas mercadológicas para atraer más consumidores, como descuentos y disminución en precios. No obstante, la industria nacional sigue desarrollándose satisfactoriamente pues el queso es un producto que casi siempre se encuentra en los hogares, con cerca del 90% de penetración (United States Dairy Export Council, 2004).

El ama de casa llega a considerarlo sustituto de carne, y si tomamos en cuenta que en nuestro país los niños son reacios a tomar leche, y algunos tienen problemas para digerir lactosa, entonces, el queso es la manera de proveerles nutrimentos que se encuentran en la leche. En México el consumo per-cápita de leche en 1995 fue menor a 250 ml (un vaso por día), hoy es de 311 ml; en la dieta media contribuye apenas con el 7% de la ingestión energética y 12% de las proteínas; por tanto tiene un papel secundario. En lo que se refiere al consumo total de queso en 2003, se situó en las 200 mil Ton., lo que representa un consumo per-cápita de 1.6Kg (SAGARPA, 2004).

Hablando de tipos de queso con mayor demanda en México, tenemos variaciones dependiendo de los canales de venta, en autoservicios del Distrito Federal predominan Manchego y Panela; en Guadalajara Adobera y Oaxaca; en Monterrey Asadero y Americano y así en cada zona geográfica. A nivel nacional en 2003 los de fabricación nacional son: Fresco con 42,785 miles de Ton., Amarillo 20,371 miles de Ton., Doble crema 18,887 miles de Ton., Oaxaca 14,021 miles de Ton., Panela 14,598 miles de Ton., Chihuahua 9,582 miles de Ton., y Manchego 5,993 miles de Ton. (Tabla 1).

TABLA 1. PRODUCCION NACIONAL DE QUESO DE ACUERDO A SU TIPO, DE 1999 A 2004.

EN MILES DE TONELADAS.

	FRESCO	AMARILLO	D. CREMA	OAXACA	PANELA	CHIHUAHUA	MANCHEGO
1999	44,231	23,099	15,327	13,147	10,642	10,023	9,114
2000	46,714	22,639	18,492	15,224	11,633	10,554	8,753
2001	47,132	23,684	20,085	16,790	12,872	10,577	8,506
2002	46,412	23,169	19,528	17,283	13,848	10,297	7,122
2003	42,785	20,371	18,887	14,021	14,598	9,582	5,993
2004 ENE/JUL	23,861	12,434	11,756	9,065	8,964	5,713	4,759

FUENTE: SAGARPA, 2004.

ANTECEDENTES .

Se cree que el queso evolucionó en la creciente fértil formada entre los ríos Tigris y Eufrates, en Iraq hace alrededor de 8000 años. Los primeros lácteos fermentados fueron producidos por una combinación fortuita de eventos. Debido a la habilidad de las bacterias para crecer en la leche y producir suficiente cantidad de ácido para reducir su pH hasta el punto isoeléctrico de las caseínas (conocidas ahora como bacterias ácido lácticas). Se sabe que ni las bacterias ácido lácticas ni tampoco las caseínas fueron designadas para esta función. Las caseínas fueron designadas para ser enzimáticamente coaguladas en los estómagos de los mamíferos neonatos. Las bacterias adquirieron la capacidad de fermentar la lactosa por un impulso evolutivo en tiempos recientes, siendo la vegetación y/o los intestinos sus hábitats naturales; de aquí presumiblemente han colonizado a las ubres de los mamíferos "contaminadas" con lactosa conteniendo leche. La manufactura del queso ha acompañado el desarrollo de la civilización a través de Medio Oriente, Egipto, Grecia y Roma. Hay algunas referencias en el Viejo Testamento Job (1520 A.C.), y Samuel (1170 - 1017 A.C.); en las tumbas egipcias se encontraron restos de cerámica cuyo análisis demostró vestigios de queso, en los años 3,000 a 2,000 A.C.; y en la Grecia clásica, la literatura lo enuncia, Homero (1184 A.C.), Herodóto (484 - 408 A.C.), Aristóteles (384 - 322 A.C.). Aparentemente el queso fue prescrito para la dieta de los guerreros espartanos durante el imperio romano; se cuenta que el emperador Dioclesiano (284 - 305 D.C.), tuvo que arreglar el precio del queso para así garantizar su abasto. Muchos escritores romanos lo describen, Cato (150 A.C.), Varro (40 A.C.), Columella (50 D.C.), y Plinio (23 - 89 D.C.), que en particular detalla aspectos de su manufactura, calidad y usos culinarios. Los movimientos de la milicia y los administradores romanos deben de haber extendido el consumo de queso a través del mundo conocido. Existen evidencias de la existencia de queso en la cultura pre-romana-británica, lo que hace suponer que los romanos lo introdujeron en Gran Bretaña (Varman and Shutherland, 1995).

Las grandes migraciones de gentes a través de Europa después de la caída del imperio romano, deben haber promovido la elaboración del queso. Los agentes más importantes causantes de su propagación y expansión fueron los monasterios europeos, ahí se desarrollaron y mejoraron muchos de los alimentos de la época especialmente el queso y el vino. Muchas de las variedades conocidas actualmente deben su nombre al monasterio en el cual fueron creados, como Wensleydale (Rievaulx Abbey, Yorkshire Inglaterra), Port du Salut ó Saint Paulin (monasterio de Notre Dame du Port du Salut, Laval Francia), Fromage de Tamie (Abbey of Tammie Lac d Annecy Ginebra), Maroilles (Abbey Moroilles , Avesnes Francia),

Trappist (María Stern Monastery, Banja Luka Bosnia), Cheddar (Somerset Village, Cheddar, Inglaterra). Los movimientos de los monjes contribuyeron a la expansión y probablemente desarrollaron nuevas variedades híbridas (Scott, 2000).

La producción localizada de ciertas variedades, es aún aparente y verdaderamente es preservada en los casos con la designación de "Apelación de Origen". La regionalización de ciertas variedades es particularmente marcada en España e Italia, donde la producción de muchas variedades está restringida a zonas muy limitadas. Aunque sus nombres fueron introducidos hace muchos años como: Gorgonzola 897, Roquefort 1070, Cheddar 1500, Parmesano 1579, Gouda 1697, Stilton 1785, Camembert 1791, St. Paulin 1816, estos quesos no fueron estandarizados. Por ejemplo, a las variedades inglesas bien conocidas Cheddar y Cheshire, las trató de estandarizar por primera vez John Harding en la mitad del siglo XIX. La primer quesería inglesa, se abrió en 1870 en Longford, Derbyshire, en Ontario Canadá en 1864, y en Nueva Zelanda en 1871. La expansión del queso a través de el nuevo mundo resultó debida a la colonización de Norte y Sur América, Oceanía, y África, por europeos quienes llevaron consigo sus hábitos alimenticios los que incluían la elaboración, y consumo de queso, además introdujeron al ganado vacuno y las técnicas de ordeño. En México el queso se ha elaborado desde los tiempos de la Colonia, ya que los conquistadores lo trajeron consigo (Fox, 1993).

La mayoría de los quesos mexicanos, tuvieron su origen en quesos europeos, por lo cual inevitablemente existen similitudes en sus características, por ejemplo, los quesos Chihuahua y Manchego, se originaron del queso Cheddar; mientras que el queso Oaxaca, seguramente surgió del queso Mozzarella. Aún así los procesos de elaboración no son idénticos, por lo que los quesos mexicanos tienen características distintivas de los quesos europeos. Otros quesos como el Cotija o el Añejo, son quesos más originales que difícilmente tienen similitudes con otros quesos del mundo (Centeno y Alvares, 1994).

Capítulo I. Generalidades del queso.

1.1 Definición.

La organización internacional FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación), define al queso como el producto fresco o madurado obtenido por coagulación de la leche u otros productos lácteos (nata, leche parcialmente desnatada, nata de suero o la mezcla de varios de ellos, con separación del suero). Esta es la definición abreviada dada por dicha organización. La definición completa es: queso es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido por cualquiera de estos dos sistemas.

- a) Coagulación de la leche, leche desnatada, leche parcialmente desnatada, nata, nata de suero o mazada, solos o en combinación, gracias a la acción del cuajo o de otros agentes coagulantes apropiados y por eliminación parcial del lactosuero resultante de esta coagulación.
- b) Por el empleo de técnicas de fabricación que conllevan la coagulación de la leche y/o de materias de procedencia láctea, de manera que se obtiene un producto acabado con las mismas características físicas, químicas y organolépticas esenciales que el producto definido en el apartado anterior.

Los ingredientes básicos (además de la leche o productos citados), que se utilizan en la fabricación del queso son :

- Cultivos de levaduras o bacterias, o bacterias lácticas
- Cuajo, ácidos o enzimas coagulantes
- Sal
- Aditivos autorizados según tipos de quesos y según la legislación de cada país (cloruro de cálcico, nitrato potásico, betacaroteno, etc.).

Según la norma internacional de la FAO, se puede aplicar el calificativo de quesos a los productos obtenidos por coagulación de leches recombinadas o reconstituidas (leche desnatada, leche parcialmente desnatada, o de nata), a condición de que en su etiqueta se indique claramente que se ha partido de productos lácteos reconstituidos o recombinados (Madrid, 1996).

1.2 Importancia nutrimental del queso.

El objetivo original de la manufactura del queso fue la de conservar los nutrimentos principales de la leche (lípidos y proteínas). La gran demanda observada en el queso es atribuida a su gran sabor, versatilidad, conveniencia, y contenido nutritivo. En términos generales, por cada 10 litros de leche se obtienen 0.800 a 1.000 Kg de queso y nueve litros de suero (Bourges, 1998).

El contenido nutricional del queso es influido por factores como, el tipo de leche empleada en su elaboración, entera, parcialmente descremada, sin grasa, crema, grasa butírica, suero, sólidos grasos y no grasos, y la combinación de ellos; el proceso de fabricación así como el tipo de añejamiento. Los quesos naturales son elaborados por la coagulación de la proteína de la leche, separación del lactosuero, preparación de la cuajada, prensado y salado; con maduración como Cheddar, Colby y Brie, o sin maduración como el Fresco (Madrid, 1999).

El suero arrastra consigo a los componentes solubles como, vitaminas, minerales, lactosa, proteínas solubles (lactoalbúmina y lactoglobulina); en contraste en la cuajada, son retenidos los componentes más importantes, proteínas insolubles, minerales coloidales como calcio, grasa y vitaminas liposolubles (Dairy Council Digest, 2002).

1.2.1 Importancia de las proteínas contenidas en el queso .

De entre los lácteos el queso es el que más contribuye a la cantidad de proteína disponible en E.U.A., 8.4% en 2002; además de que su proporción se ha incrementado en la dieta durante el siglo XX en más 5 veces. Una ración de 100g de queso suave suministra del 30 al 40% de los requerimientos diarios del cuerpo humano, y una ración de 100g de queso duro, del 40 al 50%. Cerca del 75% al 80% de la proteína total y el 95% de la caseína son transferidas de la leche al queso. La digestibilidad de las proteínas del queso es más alta que la de las proteínas de la leche (de 96.2% a 97.5 %, v.s. 91.9%), debido a que su estructura ha sido degradada durante la maduración hasta péptidos y aminoácidos. Aunque las proteínas del suero son nutricionalmente superiores a la caseína, la cual es deficiente en aminoácidos sulfurados, el valor de la Relación de la Eficiencia Proteínica (P.E.R.) de el queso Cheddar que es de 3.7; y se encontró significativamente superior al de la caseína 2.5, mientras que el caseinato presenta 2.6, la proteína del suero 3.2, el huevo de gallina 3.9, el cacahuete 1.8, la soya 2.2, el maíz 2.2, y el gluten de trigo 0.8; el añejamiento comprendido entre las 16 y 20 semanas, no produce cambios significativos en los valores de la Relación de la Eficiencia Proteínica (United States Dairy Export Council, 2002).

El valor biológico de las proteínas del queso es un poquito menor que el de la leche, pero es aún más alto que el de la caseína sola, y no es impartido por la acción de la renina, o de otras enzimas activadas durante el añejamiento, y no es afectado por la formación de ácido. Durante la maduración, parte de la caseína insoluble en agua es convertida en compuestos nitrogenados solubles en agua los cuales incluyen productos intermedios de la hidrólisis protéica tales como los aminoácidos. El queso contribuye significativamente en el abastecimiento de estos. El grado medio de utilización de aminoácidos esenciales en la proteína del queso es de 89.1%, más alto que el correspondiente valor de la proteína de leche, el cual es de 85.7%, y casi igual al valor de la proteína del huevo 89.6%. La descarboxilación de los aminoácidos durante el añejamiento produce aminas. Las principales encontradas en queso son : histamina, tiramina, triptamina, putrescina, cadaverina, y feniletilamina, sus concentraciones varían de acuerdo al tiempo de maduración, la calidad de la leche empleada, las condiciones de almacenaje, el contenido de sal, y la flora microbiana (Casanueva et al., 1994).

El queso Cheddar contiene mucha más tiramina, comparado con los quesos Azul, Emmental, Gruyere, Edam, Gouda, Camembert y Brie; como regla, los quesos añejados contienen de 15 a 40mg de tiramina por 100g, y de 10 a 30mg de histamina por 100g. La concentración de aminas es mucho menor en quesos como el Cottage, fresco, queso-crema, y procesado. El contenido de feniletilamina es menor a 10mg/100g; la triptamina, putrescina y cadaverina se encuentran usualmente en el rango de 0 a 5mg/100g. Aunque la caseína es la proteína principal del queso, éste puede contener proteínas solubles dependiendo de la cantidad de suero entrampado en la cuajada; en quesos elaborados con leche pasteurizada es de 4-6% (Izco,Torre y Barcinia, 1999).

1.2.2. Importancia de los carbohidratos contenidos en el queso .

El queso es considerado como "alimento denso" debido a que provee una alta concentración de nutrimentos relativo a su contenido de energía; resultó del 3% de las calorías disponibles en E.U.A., en 2002. Los quesos particularmente añejados como Cheddar, y Suizo, presentan un contenido muy pequeño o casi nulo de lactosa de 1 a 3g/100g, es el carbohidrato más importante de la leche, la bovina contiene 49g/L y la humana 65g/L; es removida con el suero, y la que queda entrampada en la cuajada, aproximadamente el 2% es convertida durante la maduración en ácido láctico y otros ácidos, en el lapso de 21 a 28 días. En los quesos frescos como el Cottage, del 15 al 20% de la lactosa es convertida en ácido láctico y otros ácidos, en pocas horas. El contenido de ácido láctico en queso Cheddar es 1.3%, Tilsiter 1.0%, Parmesano 0.7%, Azul 0.6%, Emmentaler 0.4%,

Cottage 0.3%, Camembert 0.2%. Debido a que los quesos añejados contienen muy poca o nada de lactosa son aptos para los individuos que presentan intolerancia hacia este carbohidrato (lactasa deficientes). Los estudios han demostrado que los lácteos incluyendo al queso, no presentan síntomas de intolerancia a la lactosa (World Cheese Exchange, 2002).

1.2.3 Importancia de los lípidos contenidos en el queso .

El contenido de grasa en el queso es el responsable en gran medida de su sabor y textura lo cual contribuye en la preferencia del consumidor por quesos con alto contenido de grasa. Los quesos varían ampliamente en su contenido de grasa, grasa saturada, y colesterol, en gran parte por el tipo de leche (entera que contiene 34g/L, parcialmente descremada, sin grasa, etc.), usada en su elaboración. Una porción de 33.3g de queso Cheddar contiene 9g de grasa, 6g de grasa saturada y 30 mg de colesterol; en contraste, una porción de 133.2g de cuajada no grasa de queso Cottage contiene 0.5g de grasa, 0.3g de grasa saturada y 8 mg de colesterol. *** Ver nota ***

La guía Dietética Americana recomienda una ingesta moderada de grasa (no más del 30% de las calorías) y baja en grasa saturada (menos del 10% de las calorías), y colesterol (menos de 300mg por día). El queso es una rica fuente de ácido linoléico conjugado y esfingolípidos, los cuales son componentes de la grasa de la leche, y pueden potencialmente ayudar a reducir el riesgo de enfermedades crónicas tales como ciertos cánceres y afecciones coronarias. En Alemania, contribuye sólo con el 4.7% del total de grasa (128g per cápita por día). El coeficiente de digestibilidad de la grasa de diferentes variedades de queso se reportó como del orden de entre el 88 al 94% (Dairy Council Digest, 2002).

1.2.4 Importancia de las vitaminas contenidas en el queso .

El contenido de vitaminas en el queso varía de acuerdo a la leche usada en su proceso de manufactura, ya que gran parte de la grasa es retenida en la cuajada, es aquí donde se encuentran las vitaminas liposolubles. El queso Cheddar elaborado con leche entera de vaca, posee 0.36mg de vitamina A (retinol), 0.45microgramos de vitamina D, 1mg de vitamina E; debido a que la leche contiene una porción ínfima de vitamina K, esta prácticamente no se encuentra en el queso. Sin embargo podemos encontrar, 35microgramos de vitamina B₁, 0.40mg de vitamina B₂, 75microgramos de vitamina B₆, 1microgramo de vitamina B₁₂, 16 microgramos de vitamina B₉ por 100g de queso (Casanueva et al., 1994).

El contenido medio de vitaminas solubles que quedan en la cuajada es, tiamina (B₁), nicotinamida (B₃), ácido fólico (B₉), y ácido ascórbico (C), del 10% al 20 %; riboflavina (B₂), y biotina (B₈) del 20% al 30 %; piridoxina (B₆) y ácido pantoténico (B₅) del 25% al 45%; la cobalamina (B₁₂) del 30 al 60 %; el resto permanece en el suero. La concentración de vitaminas del complejo B, cambia durante la maduración ya que son tanto usadas como sintetizadas por la microflora, dependiendo del tipo de microorganismo iniciador que sea empleado, y se incrementa con el tiempo después de un largo período de añejamiento (Mc Sweeney and Fox, 1994).

***Nota :100 g de queso Chihuahua y 100 g de queso fresco de vaca, contienen respectivamente 37.0 g y 7.0 g de grasa total (Hernández M.,Chavés A., Bourges H. 1987). *** Asimismo 100g de queso maduro, y 100 g de queso Cottage contienen respectivamente 27.0mg y 9.0mg de colesterol (Morales de León J., V Babinsky, H. Bourges y M.E. Camacho, 2000).

1.2.5 Importancia de los minerales contenidos en el queso .

Los quesos son buenas fuentes de minerales, 25% del calcio; lo que representa un incremento en su nivel de más de 6 veces desde 1909 (que era del 4%); 10% del fósforo, 7% del cinc disponibles en 2002. El incremento en la elevación de los niveles de calcio en E.U.A., se debe en gran parte al alto consumo de queso en los últimos años. El contenido de calcio y fósforo del queso, es tan importante como en la leche, ya que 100g de queso suave, abastecen del 30% al 40% del requerimiento diario de calcio y del 12% al 20% del fósforo. Sin embargo, 100g de queso duro cubren completamente las necesidades de calcio y del 40% al 50% de las necesidades del fósforo (United States Department of Agriculture, 2003).

En Alemania y Francia los adultos ingieren cerca de 150mg de calcio per-cápita por día a través del queso, lo que equivale al 20% del requerimiento. Se debe hacer notar, que cuando se ha preparado una variedad de queso con diferente contenido de grasa, el queso que contenga más cantidad de ella, será el que a su vez también contendrá menor cantidad de calcio y fósforo. Los quesos fabricados por coagulación enzimática (con uso de renina), presentan un contenido de calcio superior, comparados con los quesos cuya coagulación se realizó por medio de ácido. Los cambios fisicoquímicos que ocurren durante la manufactura del queso y su maduración, no afectan la biodisponibilidad del calcio. En general los quesos que tienen un alto contenido de calcio, contienen otros minerales como fósforo y magnesio en cantidades apreciables (Mc Garry, Law and Fox, 1994).

El amplio rango de contenido de sodio en quesos, se debe a las diferentes cantidades de NaCl agregadas. Los siguientes son valores promedio de diferentes variedades: Fresco 0.1%, Cottage 0.8%, Procesado 2.5%, Feta 3.7%, Camembert 2.4%, Limburger 3.0%, Edam/Gouda 1.9%, Tilsit 1.6%, Mozzarella 1.6%, Azul 4.1%, Gruyere 1.5%, Emmental 0.5% y Cheddar 1.7 %. A través del queso se contribuye con el 5% de las necesidades de sodio. La Asociación Alemana de Nutrición, recomienda una ingesta diaria de no menos de 500mg, y no más de 4g per-capita por día (World Cheese Exchange, 2002).

1.2.6 Importancia de los elementos traza contenidos en el queso .

El queso Cheddar contiene alrededor de 3.8mg de cinc, 0.6mg de hierro, 52 microgramos de iodo, 40 microgramos de manganeso, 11 microgramos de selenio, 50 microgramos de cobre, 0.02 microgramos de aluminio, de 2 a 34 microgramos de níquel, y 0.04 a 0.16 microgramos de mercurio (Walstra et al., 2001).

Otros beneficios de la ingesta de queso incluyen: la reducción de caries, estimulando el flujo de saliva, ya que las proteínas del queso han demostrado que neutralizan la placa ácida a través de su capacidad buffer. Debido a su contenido de calcio, el queso impide la desmineralización del esmalte de los dientes y contribuye a su remineralización. Además reduce el riesgo de osteoporosis y de hipertensión (Dairy Council Digest, 2002).

Capítulo II. Clasificación de los quesos .

Existe un comercio internacional considerable de las principales variedades de queso, muchas de las cuales son producidas en algunas naciones pero las cuales no son idénticas. Para ayudar al comercio internacional a promover información nutricional y tal vez por otras razones, se han desarrollado varios intentos para implementar un plan de clasificación para estas variedades, no obstante las dificultades que esto pueda derivar; así Schulz en 1985, propone primeramente 5 grupos basados esencialmente en el contenido de humedad (en queso libre de grasa): seco (menor a 40%), rallado (40-49.9%), duro (50-59.9%), suave (60-69.9%), y fresco (70-82%). Cuatro de estos (fresco, suave, duro y rallado), fueron subdivididos en dos grupos basados en que sean o no prensados y cocinados. A su vez estos también se subdividieron en seis (a - f), basados en la concentración de calcio, y en la cantidad de sal, mayor a 2.5%, de 2.1% a 2.5%, de 1.6% a 2.0%, de 1.1% a 1.5%, de 0.6% a 1.0% y menor a 0.6% (Visser, 1997).

En 1990 Davis, los clasifica en un primer plan de acuerdo a sus propiedades reológicas (factor de viscosidad, factor de elasticidad, factor de energía); o lo que es lo mismo, de acuerdo a su contenido de humedad. En un segundo plan, los considera como duros, semi-duros, y suaves, y los subdivide basándose en la microflora característica principal: bacterias ácidolácticas normales, propionibacterias, superficie con lama, superficie con hongos u hongos en su interior. Burkhalter en 1995, clasifica 510 variedades basado otra vez en su contenido de humedad, como criterio principal, en duros (menor a 42%), semi-duros/semi-suaves (43-55%), suaves (mayor a 55%), frescos con renina, frescos -ácidos, y frescos. Scott en 1997 también toma en cuenta el contenido de humedad, y los agrupa como: muy duros (menor a 25%), duros (de 25% a 36%), semi-duros (de 36 a 40%) y suaves (mayor a 40%). Y los subdivide en base a su temperatura de cocinado o escaldado, y/o a su microflora secundaria (Law, 1997).

Walstra en 1999, emplea la proporción de proteína en lugar de la humedad, como criterio principal, y reemplaza a la temperatura de cocinado, por el tipo de microorganismo iniciador; lo cual es esencialmente equivalente al uso de la temperatura de cocinado usada por otros autores. Walter & Hargrove en 2000, sugieren que hay probablemente sólo 18 distintos tipos de quesos naturales, de los cuales dos están hechos por el mismo método, ellos difieren respecto a : preparar la leche, cortado, mezclado, calentado, drenado, prensado, y salado en la cuajada.

Obviamente estas clasificaciones, pueden ser aplicadas a los quesos elaborados con renina, pero no son realmente aplicables a las otras tres super-familias, donde se encuentran los de más de alta humedad, suaves, y la mayoría no añejados (Walstra et al., 2001).

La FAO ha publicado estándares para cerca de 30 variedades principales de queso, en varias ediciones del Code of Quality Standards for Cheese. Un grupo de estándares proveniente de la Convención de Stresa en 1951, para el uso de "Apelación de Origen". En ésta convención, los quesos Roquefort, Stilton, Manchego, Grana, Parmagiano, Reggiano, Gruyere de Comte, pueden ser producidos solamente en ciertas regiones, algunos por un protocolo definido y frecuentemente de la leche de la cual proviene, oveja o cabra. Algunas otras variedades son producidas fuera del país o región de origen, Emmental, Gruyere, Camembert, pero el nombre del lugar de producción debe ser incluido (Neelankantan, Mohanty and Kaushik, 1999).

Recientemente la United States Dairy Export Council en 1999, emitió su clasificación de aquellos quesos elaborados en Estados Unidos de América según su humedad : suaves y frescos (20% a 90%), semi - suaves (del 15% al 20%), semi-suaves madurados con hongos (15% al 20%), firmes (14% al 16%), duros granulares ó quesos muy duros (1% al 2%), quesos procesados, pasteurizados y productos relacionados; y quesos Cold-Pack (Tabla 2).

En México, de acuerdo a la Cámara Nacional de productos alimenticios elaborados con leche, se clasifican en : fresco, fresco de suero y de leche, fresco acidificado, fresco de pasta hilada, madurado, madurado-prensado de pasta dura, maduro no-prensado de crecimiento bacteriano en su superficie, maduros no-prensados, y procesados (Tabla 3).

2.1 Composición química del queso .

2.1.1 Prótidos .

El papel que desempeñan las proteínas en la fabricación del queso es clave, debido a que, a través de las transformaciones que sufren durante la maduración conocidas como proteólisis, se determinará, el aspecto, textura, y sabor característico de cada tipo de queso (Santos, 1994).

Como resultado de la acción del cuajo sobre las proteínas de la leche, se obtienen dos fracciones: la primera corresponde a aquellas sustancias proteínicas insolubles

TABLA 2. CLASIFICACION DE QUESOS DE ACUERDO A SU TEXTURA.

	Porciones/g	Aguá/g	Energía kcal	Proteínas/g	Total de grasas/g	Total de carbohidratos/g	Calcio/mg	Hierro/mg	Magnesio/mg	Fosforo/mg	Potasio/mg	Sodio/mg	Zinc/mg	Tiamina/mg	Riboflavina/mg	Niacina/mg	Acido Pantoténico/mg	Vitamina B6/mg	Vitamina B12/µg	Vitamina A, RE	
Quesos suaves Frescos																					
cottage, cremoso	116	88.9	116	14.0	6.0	3	67	0.16	6	148	94	466	0.41	0.03	0.19	0.20	0.24	0.02	1.17	0.7	54
Cottage, Cuajada Seca	12.6	86.8	61	13.8	0.3	1.3	23	0.16	3	12	23	10	0.34	0.02	0.1	0.4	0.1	0.59	1.07	0.6	
Crema	43	22.8	147	3.1	14.7	1.2	34	0.51	3	45	54	126	0.22	0.01	0.09	0	0.12	0.019	5.6	0.18	185
Feta	43	23.6	112	6.6	9	1.8	208	0.21	8	14.2		424	1.23	0.06	0.38	0	0.1	0.18	13.6	0.2	
Mozzarella, Semidescremado (PS)	43	22.9	108	10.3	67	1.2	274	0.09	10	196	36	198	1.17	0.02	0.13	0	0.3	0.03	3.7	0.34	
Mozzarella, Leche Entera	43	23	120	8.3	32	0.9	224	0.08	8	138	29	159	0.96	0.01	0.1	0	0.03	0.024	3.5	0.28	160
Neufchatel	43	26.5	111	4.2	9.9	1.2	31	0.12	3	68	48	169	0.22	tr	0.09	0	0.24	0.018	4.8	0.1	111
Ricotta, Leche entera	43	31	75	4.9	56	1.3	89	0.16	6	68	45	36	0.5	0.01	0.08		0.09	0.019	5.3	0.15	
Camembert	43	22	127	8.4	10.3	0.2	166	0.13	9	147	79	368	1.02	0.02	0.21	0.3	0.38	0.1	28.6	0.56	108
Quesos Semisuaves																					
Brick	43	17.5	157	9.9	12.6	1.2	288	0.18	10	192	68	237	1.11	tr	0.16	tr	0.12	0.027	8.7	0.64	129
Edam	43	17.7	161	10.6	11.8	0.6	310	0.18	12	228	79	411	1.6	0.02	0.16	tr	0.12	0.033	6.9	0.66	109
Gouda	43	17.7	151	10.6	11.7	0.9	297	0.1	12	232	61	348	1.66	0.02	0.15	tr	0.15	0.034	8.8	0.66	73
Monterey Jack	43	17.4	150	10.5	12.9	0.3	318	0.3	12	189	34	228	1.27	tr	0.16	tr	0.09	0.033	7.9	0.64	108
Muenster	43	17.8	156	9.9	12.7	0.6	304	0.3	12	198	67	267	1.2	tr	0.13	tr	0.08	0.024	5.1	0.53	136
Mozzarella, Bajo en Humedad (LM)	43	20.6	136	9.2	10.6	1	246	0.09	9	176	32	177	1.05	0.01	0.12	tr	0.03	0.027	35	0.34	117
Mozzarella, Bajo en Humedad, Semidescremado (PS)	43	20.7	119	11.7	7.3	1.3	310	0.11	11	224	41	230	1.34	0.01	0.16	tr	0.04	0.033	4.6	0.39	81
Provolone	43	17.4	150	10.9	11.4	0.9	321	0.22	12	216	58	372	1.38	0.02	0.13	tr	0.19	0.031	4.3	0.53	11
Quesos semisuaves, Madurados Con Hongo																					
Blue	43	18.0	150	9.1	12.3	1.0	223	0.13	10	166	109	694	1.12	0.02	0.16	0.50	0.73	0.07	15.4	0.62	97
Brie	43	20.6	142	8.9	11.8	0.2	78	0.21	9	79	64	267	1.02	0.03	0.2	0.1	27.7	0.100	27.7	0.36	28
Limburger	43	20.5	139	8.5	11.5	0.2	211	0.08	9	166	54	340	0.9	0.03	0.21	tr	0.49	0.036	24.4	0.46	135
Gorgonzola	43	16.6	166	10.5	13.6	0	223	0.18	12	181	39	769	0.85	0.02	0.13	0.3	0.73	0.06	13.5	0.39	164
Quesos Firmes																					
Cheddar	43	16.7	171	10.6	14.1	0.6	306	0.28	12	217	42	264	1.32	0.02	0.16	tr	0.18	0.031	7.8	0.34	129
Colby	43	16.2	166	10.2	13.6	1	201	0.33	10	193	54	256	1.30	tr	0.16	tr	0.09	0.033	7.8	0.34	117
Gruyere	43	14.1	175	12.7	13.8	0.2	430	0.08	15	256	34	142	1.66	0.03	0.12	tr	0.24	0.034	4.3	0.67	127
Swiss (Sulzo)	43	15.9	159	12.4	11.7	1.5	408	0.08	15	256	48	111	1.66	0.02	0.16	tr	0.18	0.036	2.7	0.72	108
Quesos Duros Granulares (Conocidos Como Quesos Muy Duros)																					
Parmesano	5	1.5	20	1.8	1.3	0.2	60	0.04	2	35	5	82	0.14	tr	0.02	tr	0.02	0.005	0.4	0.06	8
Romano	5	1.6	20	1.6	1.4	0.2	64	0.04	2	39	1	64	0.13	tr	0.02	tr	0.02	0.0004	0.3	0.06	5
Quesos procesados Pasteurizados y Productos relacionados																					
Queso Procesado Pasteurizado	43	166	169	120	13.3	0.80	261	0.16	9	316	69	609	1.27	0.02	0.15	tr	0.21	0.030	3.3	0.3	123
Asados de Queso Procesado Pasteurizado	43	136	136	9.3	10.4		306	0.38	12	286	121	660	1.51	tr	0.18	tr	0.21	0.015	3.1	0.96	114
Quesos Procesados Pasteurizados Untables	43	20.2	124	7.9	9.0	3.7	238	0.13	12	303	103	671	1.11	0.02	0.18	tr	0.3	0.049	3	0.16	81
Quesos Cold-Pack																					
Cold-pack	43	18.3	141	8.4	10.6	3.6	211	0.36	366	169	154	411	0.29	0.02	0.19	tr	0.42	0.060	2.2	0.64	86

FUENTE : United States Dairy Export Council, 2002.

TABLA 3 QUESOS PRODUCIDOS EN MÉXICO

TIPO	MATERIA PRIMA	GRASA (%)	PROTEÍNA (%)	HUMEDAD (%)
Queso Fresco				
Panela	leche entera	20	18	58
	leche semidescremada	12	26	58
Ranchero	leche entera	22	20	53
	leche semidescremada	16	24	53
	leche descremada	4	33	53
Quesos Frescos de Suero de Queso y de leche				
Blanco americano	leche entera	17	22	55
Requeson	leche descremada con crema de queso	0.6	13	80
QUESOS FRESCOS ACIDIFICADOS				
COTTAGE	leche descremada menos de	4	20	75
	leche descremada y crema	4	18	75
Queso crema	leche entera y crema	33	10	55
Queso doble crema	leche entera y crema	35	9	55
Quesos Frescos de pasta cocida hilada				
Oaxaca	leche entera	23	24	48
	leche semidescremada	18	28	48
Asadero	leche entera	23	24	48
	leche semidescremada	18	28	48
Asadero de morral	leche entera	23	24	48
	leche semidescremada	18	28	48
Queso de morral	leche entera	25	24	48
Quesos Madurados				
Holandés	leche entera de vaca	28	25	43
Edam	leche entera de vaca	24	22	45
Gouda	leche entera de vaca	27	22	43
Sulzo o Emental	leche entera de vaca	27	25	41
Gruyere	leche entera de vaca	27	25	40
Cheddar	leche entera de vaca	29	24	39
Chester	leche entera de vaca	28	23	43
Chihuahua	leche entera de vaca	28	26	39
Jack	leche entera de vaca	27	23	44
Mancneco	leche entera de vaca	29	22	43
Saint Paulin	leche entera de vaca	26	20	48
(Port-salut)				
Añejo	leche entera de vaca	30	25	40
Provolone	leche entera de vaca	25	22	45
Quesos Maduros Prensados de Pasta Dura				
Parmesano	leche semidescremada de vaca	24	18	53
Cotija	leche entera de vaca	26	22	46
Quesos Maduros no Prensados de crecimiento bacteriano en su superficie				
Camembert	leche entera de vaca	24	18	53
Munster	leche entera de vaca	26	22	46
Quesos Maduros no prensados				
Cabrales	Leche entera de vaca y/o cabra	28	20	46
Quesos Procesados				
Amarillo o	Quesos naturales,mantequilla	28	20	44
Americano	Emental,Sulzo,Gruyere y			
Fundido	mantequilla,crema			
Crema de Gruyere	solido de leche	24	19	48
Fundido tipo	Queso natural,mantequilla			
Doble crema	y/o crema de vaca y solidos	32	16	48
de Gruyere.	de leche			

FUENTE : Cámara Nacional de Productos Alimenticios Elaborados con Leche, 2000.

en el suero y que prácticamente formarán el queso, llamada "caseína entera, caseína isoeléctrica, o caseína de Hammartsen", que constituye aproximadamente el 78% del total las sustancias nitrogenadas de la leche de vaca. No existe, ni en la sangre ni en los tejidos sustancia alguna parecida a éste complejo de proteínas fosforadas. La caseína es la fracción nitrogenada más abundante en la leche, y sobre todo en la de los rumiantes. Su contenido medio es de 27g/L en la leche de vaca; precipita a pH 4.6; el primero que describió su proporción fue Quévenne en 1841. El contenido de caseína varía de una especie a otra. En particular, la leche humana es más rica en azufre, cistina, y en glúcidos, que la bovina. Este hecho se considera como una de las causas de la superioridad de la leche materna en la alimentación de los recién nacidos. Mellander descubrió en 1956, las caseínas "alfa" "beta" y "gama"; y los estudios realizados posteriormente revelaron la fracción "kappa" (Varman and Shutherland, 1995).

Se ha demostrado la existencia de tres variantes genéticas de la caseína "alfa" siendo A, B y C; los sub-componentes "alfa-s1" y "alfa-s2" parecen ser las primeras dos (A y B). Como diferencia analítica no se conoce en estos momentos más que su contenido de nitrógeno, 15.10%, 15.34% y 15.40% respectivamente y ligeras diferencias en su contenido de aminoácidos. La caseína "beta" presenta una analogía con la anterior, existe bajo tres formas A, B, y C; a su vez, la caseína "kappa" existe bajo por lo menos dos variantes genéticas, A y B. Las proteínas de bajo punto isoeléctrico caseína "alfa" (pH 4.6), caseína "beta" (pH 4.9) y caseína "kappa" (pH 5.1), constituyen alrededor del 85% de la "caseína entera" y su síntesis tiene lugar en la glándula mamaria. Los componentes menores, se presentan en alrededor del 15% y están constituidos por la fracción que acompaña a la caseína "alfa" (5%), la fracción "insensible al calcio" que acompaña a la caseína "kappa" (3%), la caseína "gama" (3%), y la "proteína roja" (4%); tanto la caseína "pi" como la caseína "m" pertenecen a esta fracción; de lactolína y enzimas sólo hay indicios. Una de las propiedades más sobresalientes de las caseínas, es su capacidad de asociación para formar polímeros (moléculas idénticas), o complejos (moléculas deferentes). Estas asociaciones se forman gracias a enlaces de hidrógeno y a interacciones de grupos no polares, especialmente abundantes en las caseínas. Las fuerzas del tipo Van der Waals son probablemente las más activas (Madrid, 1999).

El calcio contribuye a la formación de micelas cuando está presente en pequeña proporción, como en la leche (0.03M). Las micelas se encuentran en forma de partículas esféricas, cuya dimensión no es uniforme. En la leche de vaca la mayoría de las partículas tiene un diámetro comprendido entre 50 y 100 micromicras (Law and Fox, 1995).

La segunda fracción obtenida mediante la acción del cuajo sobre las proteínas de la leche, incluye al conjunto de sustancias nitrogenadas que no floculan cuando el pH de la leche se lleva a 4.6; por lo mismo, también se les llama proteínas solubles. Estas proteínas se encuentran en el lactosuero que se separa del coágulo que se obtiene al añadir la renina, y constituyen el 17% del total de las proteínas de la leche de vaca y de otros rumiantes. Las leches de otros mamíferos monogástricos, por ejemplo en la leche humana, las proteínas solubles constituyen aproximadamente el 50%. Las principales son : "beta-lactoglobulina" que es la más importante, debido su contenido de grupos sulfhídricos, y representa el 50-55% del total, "alfa-lactoalbúmina" 20-25%, "inmunoglobulina" 10-15%, "seroalbúmina" 5-10%, proteínas menores: "lactoferrina" 1-2%, "lactoperoxidasa" 0.5%, "glicomacropéptidos" 0-20%, y "lisozima" menos del 0.1%. Son sintetizadas en la glándula mamaria con excepción de la seroalbúmina y la inmunoglobulina que provienen del torrente sanguíneo. Además contienen también cantidades considerables de lisina, leucina, triptófano, y ácidos glutámico y aspártico. Por ello presentan un alto valor nutricional (Vafopoulou, Alichandis and Zerfiridis, 2000).

También existe en la leche de los rumiantes una pequeña parte de sustancias nitrogenadas no protéicas (aproximadamente el 5% del nitrógeno total), que pertenecen a varias familias químicas, se trata de moléculas pequeñas, como urea, nucleótidos, y aminoácidos libres (Tabla 4).

2.1.2 Lípidos .

La composición de la leche utilizada, es la que determina el contenido de la materia grasa del queso. Y su importancia primordial radica en que es la responsable del aroma y sabor característico. La grasa de la leche forma una emulsión de pequeños glóbulos esféricos o ligeramente ovalados, cuyo diámetro varía entre 2 a 10 micras, según la raza de la vaca de la cual procede. En las razas Holstein y Ayshire son pequeños, Pardo suizo intermedios, y en la Jersey y Shorton son grandes. En el seno de una misma especie, la composición de la grasa de la leche varía poco según las razas, y mucho según la naturaleza de la alimentación. Se ha demostrado que existe una relación entre la materia grasa de la leche y el diámetro medio de los glóbulos; cuanto mayor es éste último, mayor es la cantidad de grasa. En la leche de cabra son más pequeños que en la de vaca. Los glóbulos están rodeados por una película protectora llamada "membrana", que tiene un diámetro aproximado de 0.005 micras. Los componentes de la membrana están dispuestos en varias capas, de tal manera, que los grupos hidrofílicos (proteínas), se encuentran orientados hacia la fase acuosa, y los hidrofóbicos

TABLA 4. DISTRIBUCION DE LAS PRINCIPALES SUSTANCIAS NITROGENADAS DE LA LECHE BOVINA .

	proporciones	
	relativas	gramos por litro
Prótidos totales.....	100	32
Caseína entera.....	78	25
Caseína α s.....	40	10,0
Caseína β	30	7,5
Caseína χ	15	3,8
Diversos.....	15	3,7
Proteínas del suero.....	17	5,4
β -lactoglobulina.....	50	2,70
α -lactoalbúmina.....	22	1,20
Globulinas (inmunes).....	12	0,65
Sero-albúmina.....	5	0,25
Proteosas-peptonas.....	10	0,60
Sustancias nitrogenadas no proteicas....	5	1,6

FUENTE : Madrid , 1999 .

(vitaminas liposolubles, triglicéridos, sustancias insaponificables), hacia la fase grasa. King en 1970, propuso una estructura hipotética, donde la capa exterior es de naturaleza proteínica y está cargada negativamente, y la interna es de naturaleza glicérida; entre ambas capas, se encuentra una tercera, constituida por proteínas y lípidos. La materia grasa propiamente dicha, es decir, los triglicéridos, supone alrededor del 96% al 98% del total de los lípidos en la leche. Los ácidos grasos y el glicerol, que constituyen los triglicéridos de la materia grasa, proceden en parte del torrente sanguíneo ya que se originan a partir de los lípidos de los alimentos; los ácidos grasos con los que se alimenta el ganado, son de cadena larga y contienen una gran proporción de ácidos grasos polinsaturados, lo que hace suponer, que los ácidos grasos con cadena mayor de 16 carbonos, se incorporan como tales en la leche, a partir del alimento (Tórriz, 2001).

Por ello, el régimen alimenticio tiene por consiguiente una influencia considerable; pero otra cantidad se sintetiza en la mama a partir de moléculas pequeñas. En los rumiantes el acetato, es el precursor más importante de ésta síntesis. El gliceról se sintetiza a partir de glucosa y de los ácidos acético y butírico; y actúa como precursor de las ácidos grasos fuera de la glándula; en el interior, la glucosa también se convierte en glicerol. Los triglicéridos son ésteres del gliceról y de ácidos grasos alifáticos; los radicales ácidos "R", pueden ser idénticos o diferentes (glicéridos mixtos). Estos ésteres pueden dejar libres sus componentes por hidrólisis. La naturaleza de los ácidos grasos "R" y sus proporciones respectivas diferencian los diversos cuerpos grasos y determinan sus propiedades. La materia grasa de la leche presenta tres caracteres:

- a) gran variedad de ácidos grasos; se han identificado unos 70.
- b) la proporción de ácidos saturados a $2/3$ y de ácidos no saturados $1/3$, como término medio.
- c) proporción elevada de ácidos volátiles de bajo peso molecular y, en especial, de ácido butírico en la leche de los rumiantes (Santos, 1994).

Casi todos los ácidos grasos saturados tienen número par de átomos de carbono, y el punto de partida de sus síntesis es el ácido acético. Los ácidos con número impar tienen probablemente su origen en el ácido propiónico. Los cinco primeros: butírico, caprónico, caprílico, cáprico, y láurico son volátiles (arrastrados por vapor en destilación). De ellos los dos primeros son solubles en agua; el caprílico muy poco; y representan del 5% al 6% del conjunto, sin embargo constituyen la parte más característica de la leche de los rumiantes. El olor de los ácidos volátiles es muy fuerte y caracteriza el enranciamiento. Otro 5% a 6% lo forman los insolubles : caprílico, cáprico, láurico. Un 10 % el mirístico, 30% palmítico,

10% esteárico, y 1% araquídico. Los ácidos grasos insaturados, presentan de 1 a 6 dobles enlaces, pero tan sólo uno se presenta en proporción importante, el oléico (C18), que constituye el 75% de los ácidos de esta categoría. La proporción de ácidos insaturados varía con la alimentación. La fuente de ácidos con menos de C18, la constituyen los lípidos vegetales, la grasa de la hierba está formada aproximadamente por el 60% de ácido linoléico, que en gran parte se hidrogena en el rúmen, produciéndose principalmente ácido oleico, y en menor proporción ácido vaccénico (Jamieson y Jober, 1994).

Los fosfolípidos, segundo grupo constituyente de la grasa de la leche, constituyen del 0.5% al 1%; y son fundamentalmente 30% lecitinas, 45% cefalinas y 25% esfingomielinas. La función más importante de la lecitina es la de actuar como agente emulsionante y estabilizar la suspensión de la materia grasa. El último grupo lo constituyen las sustancias insaponificables, que forman aproximadamente el 1% del total de la materia grasa láctea. Los principales son esteroides como el colesterol, carotenoides y tocoferoles (Anon, 1997).

Existen diferentes contenidos de grasa en los quesos, debido a que en algunos de ellos esta ha sido ajustada, y es usualmente expresada como "porcentaje de grasa en base seca". Los quesos frescos, tienen un contenido absoluto de grasa arriba del 12%, y los quesos madurados en general, contienen del 20 al 30%. Los consumidores europeos prefieren generalmente quesos con contenidos elevados de grasa debido a que esta contribuye significativamente a la calidad del sabor. En el queso Cheddar por ejemplo, el típico aroma se desarrolla solamente cuando el contenido de grasa en base seca se encuentra por lo menos del 40 al 50%, y se debe principalmente al rompimiento de los productos grasos formados durante el añejamiento. La producción de quesos con bajo contenido de grasa, ofrece grandes oportunidades para los consumidores, ya que estos productos son percibidos como "saludables". La lipólisis durante la maduración del queso es causada primordialmente por las lipasas microbianas, debido a que la lipasa propia de la leche se inactiva con la pasteurización, excepto en los quesos en los cuales se usa pasta de renina o estearasa pregástrica. Como resultado de la lipólisis, la concentración de ácidos grasos en queso usualmente de 1-5 g/Kg. Existe una relación estrecha entre el contenido de ácidos grasos en un número de variedades de queso y su sabor (Izco, Torre y Barcinia, 1999).

2.1.3 Carbohidratos .

Se encuentran libres en solución en la fase acuosa de la leche y unidos principalmente a las proteínas; entre ellos se encuentran lactosa, polisacáridos, y glucosaminas. La lactosa es el componente más importante, más abundante,

simple y constante en la leche. Se encuentra en la secreción láctica de la mujer; además, es el componente más abundante en las leches de vaca y cabra (Madrid, 1999).

La sangre contiene glucosa, pero no lactosa; excepto en la leche la lactosa es un azúcar poco común en la naturaleza. Se sintetiza en la mama de todos los mamíferos, a partir de la glucosa sanguínea, y en los rumiantes alrededor del 10% a partir de los ácidos grasos volátiles. La lactosa, es el factor que limita la producción de leche; es decir, que la cantidad de leche producida depende de las posibilidades de síntesis de la lactosa en la mama. En la leche de vaca, el contenido de lactosa varía poco, entre 48 y 50g/L. El factor más importante de variación es la infección de la mama, ya que reduce su secreción. La lactosa constituye la parte esencial del extracto seco de los sueros lácteos; en las diversas transformaciones de la leche, la lactosa siempre se encuentra en la parte acuosa (Arenas, 1998).

Capítulo III. Queso Cheddar .

En los climas calidos, en los cuales se practicó inicialmente la quesería, los quesos presentaban la tendencia a un pH bajo, como resultado de la producción de ácido, debida a las bacterias ácido lácticas, y coliformes en la leche cruda. En climas más fríos debe haber sido lógico para algunos, agregar agua caliente, a la cuajada y suero juntos, para incitar la producción de ácido (el prototipo de queso Gouda), o para escurrir el suero y apilar la cuajada en montones, y prevenir el descenso de temperatura. En este último caso, se conoce como "Cheddars" a las pilas de cuajada amontonadas. Esta técnica se ha usado desde mitades del siglo XIX, en la Villa Somerset Inglaterra, y desde 1851 en E.U.A. cuando se abrió la primer factoría; en la Unión Americana, Wisconsin es el estado de mayor producción, le siguen, Nueva York, Oregon, Missouri, Illinois, Kentucky y Tennessee, también es fabricado en Nueva Zelanda, Australia, Gran Bretaña, Italia, Francia, y Dinamarca (Centeno y Alvares, 1994).

El queso Cheddar fue originalmente hecho aparentemente por agitación de la cuajada sin esterado, y condiciones sanitarias muy pobres, que permitieron la formación de gases con sabores no limpios. La cheddarización fue creada para mejorar la calidad del queso, presumiblemente como resultado de la ampliación de la gran producción de ácido. Como el pH, cae cerca de 5.4 el crecimiento de microorganismos indeseables formadores de gas tales como los coliformes habrían sido inhibidos. El apilado de los bloques de cuajada en la tina por cerca de 2 horas también hace salir al suero, exprimiendo las bolsas de aire que se formaron durante la manufactura. Los queseros creyeron que la textura característica del queso Cheddar se debía al proceso de cheddarización. Ahora está claro, aunque aquella cheddarización y el desarrollo de su textura característica son procesos concurrentes más bien que interdependientes. Actualmente es posible elaborar queso Cheddar sin involucrar la cheddarización, obteniéndose un producto idéntico al tradicional. El descubrimiento de la estructura fibrosa de la cuajada del queso Cheddar tradicional, no comienza hasta que la cuajada ha alcanzado un pH de 5.8 por lo menos. Los cambios que ocurren son una consecuencia del ácido en la cuajada y la pérdida de fosfato de calcio de la matriz protéica. Es importante por esto reconocer que la cheddarización no es limitada al queso Cheddar. Todos los quesos se "chedarizan" en el sentido de que todos pasan a través del mismo proceso de cambio químico (Godfrey and West, 1996).

La única diferencia radica en la cantidad de suero expulsado durante la sinéresis. Además los quesos salados en salmuera, la sinéresis se restringe normalmente a una etapa anticipada durante la manufactura para colocar al queso en un tonel. Aunque la cuajada del queso Gouda es removida del tonel, ésta fluye en la misma

forma que la cuajada del queso Cheddar. Similarmente el alargamiento que se induce en el queso Mozzarella, vía amasado en agua caliente, es más bien vista como una chedarización exagerada. Todos los quesos jóvenes sin respetar el contenido de sal, pueden ser ampliados en la misma forma que el Mozzarella teniendo cuidado de que el contenido de calcio y el pH se encuentren dentro del rango requerido. Existen similitudes desde el punto de vista de la elaboración entre los quesos Cheddar tradicional, Cheshire, Stilton, Wensleydale y Dorset, salados en seco; también con el queso Gouda salado en salmuera (Berry, 2002).

En los primeros días de la elaboración quesera, la superficie de la cuajada era presumiblemente cubierta con sal, en un intento por preservarla por largos períodos de tiempo. En las localidades donde la sal se obtenía por evaporación de agua de mar, debió ser razonable el uso de salmueras concentradas más bien que esperar a que el líquido fuese evaporado. La técnica de salar en seco, salando cantidades relativamente pequeñas de la cuajada antes del prensado, parece haberse desarrollado en Inglaterra probablemente en el condado de Cheshire, donde la sal de roca es abundante. Las variantes del Cheshire y Cheddar fueron desarrolladas en localidades específicas en Inglaterra, y ahora son conocidos como quesos territoriales británicos. El Cheshire ha sido fabricado por lo menos hace 1000 años y es más antiguo que el Cheddar. El salado en seco vence a la mayor desventaja del salado en salmuera, que es el "soplido" del queso debido al crecimiento de bacterias como coliformes y *clostridia*, pero introduce nuevas dificultades ya que los organismos iniciadores son también inhibidos por la sal. La inhibición no es un problema, cuando el pH de los gránulos de cuajada se les permite alcanzar un valor relativamente bajo antes de agregar la sal, como por ejemplo en los quesos Cheshire y Stilton. La manufactura de quesos salados en seco, con pH medio (5.0 a 5.4) tales como Cheddar, es más difícil que aquellos tipo Gouda, en los cuales el pH es controlado principalmente por la adición de agua. Al tiempo de la adición de sal, una cantidad relativamente grande de lactosa está aún presente en la cuajada del Cheddar. Existen diferencias obvias en los procedimientos usados para la manufactura de quesos salados en seco y en salmuera, pero estas ejercen un efecto relativamente pequeño en los productos terminados. La producción de quesos salados en seco tiene un efecto similar al de los quesos salados en salmuera. Claramente el grado de solubilización de la caseína y la actividad residual de la renina y plasmina en la cuajada será afectada más rápidamente por salado en seco que por salmuera, pero sólo durante las primeras semanas del añejamiento (Serrano, Picon y Gaya, 1995).

No hay evidencia que sugiera que los mecanismos por los cuales la proteína es degradada, sean afectados por los cambios en la concentración de sal, cuando

ésta se difunde dentro de la cuajada. El Cheddar tradicional es visualmente diferente de los quesos comúnmente salados en salmuera como el Gouda y Suizo los cuales son más plásticos y poseen "ojos", aunque ésta característica se debe al pH relativamente alto y a la humedad, y no al salado en salmuera por sí. El queso Cheshire presenta una textura más desmoronable que el Cheddar (Fox, 1993).

Mientras el queso Cheddar tradicional es originalmente inglés, su perfil es marcadamente ácido 0.85%, su textura desmoronable, y su contenido de sal de 2.0%; el Cheddar americano es más suave y cohesivo, presentando una acidez de 0.65% y un contenido de sal 1.5%. En Canadá se madura a 2.2°C durante 24 meses, y en Nueva Zelanda a 7.2°C 10 meses (Pérez, Islas y del Río, 1999).

En México el consumo de queso Cheddar es muy bajo, debido a factores como su sabor fuerte, y por su puesto el precio superior, comparado con sus "similares" locales, Manchego y Chihuahua; no hay cifras oficiales, y en su inmensa mayoría es importado de E.U.A, de Canadá y Nueva Zelanda a través de la empresa New Zeland Milk Products, que el año pasado(2003), introdujo al país alrededor de 100 toneladas, las cuales fueron empleadas en botanas, galletas y sopas instantáneas, a un precio de \$ 130.00 MN / Kg (United States Dairy Export Council, 2004).

3.1 Características de la leche empleada en la elaboración de queso.

En concordancia con la uniformidad de la calidad en las grandes plantas productoras, los procesos de manufactura deben ser lo más consistentes posible; y por ello el primer requerimiento es la uniformidad de la leche empleada. Cuando esta llega a la planta se recibe, y se hace un muestreo para clasificarla, se enfría y almacena en un silo con temperatura de 2 a 4°C, para nivelar sus diferencias en cuanto a la composición dado que se ha obtenido de diferentes fuentes en varios lugares y preferentemente debe hacerse llegar ahí antes de su uso, ya que de esta forma su contenido graso será exactamente estandarizado. Se hace un precalentamiento de 45 a 48°C para facilitar la estandarización. Los valores típicos requeridos de la leche que llega a la planta quesera en promedio son: 3.30% proteína (3.0 % de proteína pura compuesta de 80% de caseína y 20% de proteínas del suero), 4.75% lactosa, 3.65% de grasa, 0.65% minerales, 87.7% agua y acidez de 0.16%-0.17%. La estandarización a veces involucra la adición de proteína, aunque esto último ha causado controversias entre los fabricantes americanos. Hay dos beneficios claves de este tipo de estandarización, aumenta la consistencia del producto terminado, y económicamente se incrementa la eficiencia

ya que se obtiene más queso por tina, debido al aumento de los sólidos lácteos. Los sólidos en leche en promedio pertenecen 50% a lactosa, 28% a caseína, 15% a minerales y 7% a las proteínas del suero (que son componentes remanentes). Los únicos ingredientes permitidos por la FDA son: leche líquida o en polvo, leche descremada, condensada, leche en polvo descremada y crema. También está permitido agregar lactosa "extra", en aquellos casos en los cuales se ha empleado leche en polvo, descremada, o leche condensada sin grasa. Las fuentes de los ingredientes adicionados deben ser lácteos. Para queso Cheddar la leche es normalmente estandarizada a una proporción de caseína/grasa de entre 0.67 y 0.72 (Dairy Council Digest, 2002).

3.2 Tratamiento térmico .

Se usa el método normal de pasteurización, HTST a 71.7°C por 15 a 20 seg. Se enfría de 4 a 10°C, y posteriormente, ya que se encuentra en las tinas de hacer queso se eleva a 30°C (Ivarson, 1992).

3.3 Adición del colorante .

Este proceso sólo es indispensable para los quesos cuyo color debe ser amarillo dorado o amarillo naranja. Entre los colorantes que se emplean está el annato que se extrae de la semilla de Bixia orellana (achiote), y se agrega de 2 a 8 ml por cada 100 litros de leche; y el azafrán (cocus sativas), en una proporción de 1g por cada 1000 litros de leche (Mohamed et al., 1992).

3.3.1 Adición del cloruro de Sodio .

Para controlar el crecimiento de las bacterias productoras de gases, se puede utilizar 2g de cloruro de calcio, por cada 100 litros de leche (Santos, 1994).

3.4 Siembra y maduración de la leche .

La aptitud de la leche para permitir el desarrollo de las bacterias lácticas es una característica muy importante en quesería, dado el papel capital que tienen en la fermentación láctica. Si las bacterias lácticas no pueden desarrollarse a una velocidad suficiente en la cuajada, se hace imposible la fabricación de queso de buena calidad, e incluso llega a hacerse imposible toda fabricación; disminuye la velocidad del desuerado y se perturba el equilibrio de los diferentes grupos microbianos, con lo que las especies perjudiciales toman ventaja, especialmente las productoras de gas. Sea cual fuere el tipo de coagulación que experimente la leche destinada a la fabricación del queso, debe asentarse en ella una microflora láctica activa precisamente en el momento en que la cuajada va a formarse (Jamieson y Jobber, 1994).

3.5 Adición del fermento .

El enriquecimiento de la leche puede realizarse de varias formas :

a) la maduración es la conservación de la leche cruda durante un tiempo variable corrientemente el de duración de la noche; cuando se guarda la leche de la tarde en la quesería. Esta conservación debe hacerse a temperatura relativamente baja, hacia los 10 a 15°C ; de esta manera, los gérmenes pueden multiplicarse de manera natural sin provocar una acidificación apreciable en la leche. Las leches de ordeño reciente, están limpias en el momento de dejarlas madurar, su contenido microbiano es bajo con predominio de los estreptococos, que proceden de la mama. El número de bacterias puede alcanzar 1 millón/cc, mientras que la acidez no se eleva mas de 0.01 a 0.02% (1-2°D). Este método tiene la desventaja que no brinda ninguna seguridad de que se desarrolle el microorganismo adecuado para el caso. Si la leche tiene pocos gérmenes, puede sembrarse con cultivo de fermentos lácticos (El Soda, 1993).

b) La siembra de los cultivos lácticos es necesaria cuando se parte de leche pasteurizada. En quesería, aún más en mantequería, es preciso utilizar fermentos muy activos, que produzcan poca acidez. En su origen, se trata en general de una cepa de bacterias lácticas seleccionadas, suministrada por un laboratorio especializado, en forma liofilizada, seca o líquida. El uso de cultivos "iniciadores" más comúnmente conocidos como bacterias ácido lácticas (en inglés LABS), constituyen un requerimiento especial para la manufactura quesera, y se les llama así debido a que ellas inician la producción de ácido láctico, lo cual es su función primaria; ya que también contribuyen indirectamente en la producción de los componentes de sabor característico. En quesería se emplean generalmente cultivos mixtos de las familias *Streptococaceae* y *Lactobacilaceae*. La primera bacteria purificada por Lister, fue *Lactobacillus lactis subsp. lactis*, en 1878, y se le considera como el primer cultivo definido. En 1934 en Nueva Zelanda se introdujo el *Lactobacillus lactis subsp. cremoris*; ambos son acidificantes. El *Streptococcus diacetilactis* y *Leuconostoc citrovorum* son aromatizantes. En las pequeñas factorías de Francia, Italia, y Suiza, se emplean cultivos de microorganismos termófilos como el *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, y *Lactobacillus delbruekii* (Goldstein and Wingard, 1997).

Estos cultivos llamados "iniciadores", están generalmente compuestos por organismos productores de ácido láctico a los que se escoge de entre los siguientes :

- 1.- cepas simples de *S. lactis*, *S. diacetilactis*, y *S. cremoris*.
- 2.- cepas mixtas de los anteriores.

3.- cepas múltiples de varios tipos, por ejemplo, *S. lactis* + *S. cremoris*; *S. lactis* + *S. durans*; *S. lactis* + *Leuconostoc ssp.* + *Lactobacilli ssp.* La cantidad y el tipo de cultivo "iniciador" que se utilice dependerá de la receta para cada queso particular como término medio de 0.2 a 1%. Para pastas blandas se emplean cepas de estreptococos lácticos; para pastas cocidas, se usa una mezcla de estreptococos termófilos y lactobacilos (Herian y Riman, 1997).

El fermento se añade a la leche inmediatamente antes de adicionar el cuajo, o un determinado tiempo anterior (una hora o más), de tal forma que se produzca una pequeña maduración. La dosis del fermento a sembrar depende de la temperatura de la leche y de la duración de la maduración. Este es el método más seguro que se emplea para madurar las leches. Se ajusta la temperatura a 20–22°C manteniéndola así hasta alcanzar la acidez deseada. Para obtener mejores resultados la leche debe enfriarse a 10-12°C y conservarse en tanques de almacenamiento (Farkye and Fox, 1992).

c) Siembras diversas. Salvo los fermentos lácticos, la siembra de microorganismos se hace en la leche antes de formar la cuajada, o más tarde en la cuajada misma o sobre el queso. Como micrococos caseolíticos inoculados en la leche destinada a la fabricación del queso Cheddar; o bacterias propiónicas productoras de la "abertura" del queso Gruyere que se adicionan al mismo tiempo que los fermentos lácticos; o el *Penicillium glaucum*, moho interno de los quesos de pasta azul, que corrientemente se mezcla con la cuajada en el momento de introducirla en los moldes.

d) Siembras mixtas. La leche también puede madurarse al mezclar leche fresca con 15 a 40% de leche madurada. La proporción varía según el tipo de queso (Climme y Buchheim, 2001).

3.5.1 Dosis del fermento para queso Cheddar .

Añadir el 1% de un fermento activo de *S. lactis* y *S. cremoris* (50/50), cuando la temperatura de la leche se encuentre a por lo menos 30°C, y dejar que madure 45 min y el pH se encuentre entre 6.5 a 6.54 (Ivarson, 1992).

3.6 Flora microbiana propia de la leche .

Las bacterias lácticas tienen numerosos "habitats", aparte de los productos lácteos, se les encuentra con frecuencia en los productos vegetales; ensilados, "choucroute", granos, jugos, y mostos en fermentación; se encuentran presentes en el aparato digestivo del hombre y de los animales, y en las cavidades naturales (boca, etc.). Las bacterias lácticas son "Gram +". De la familia *Micrococcaceae* homofermentivos (solamente forman indicios de productos

accesorios junto con ácido láctico, que representa del 90 al 97% de la lactosa fermentada), son mesófilos (20 – 30°C), no poseen carácter patógeno, producen una acidez moderada (0.5 a 1 % de ácido láctico), y se reconocen tres especies: *Streptococcus cremoris*, no puede utilizar otros glúcidos más que la lactosa y sus dos componentes, parece que no posee proteinasa; el *Streptococcus lactis* fermenta varios glúcidos, produce un sistema enzimático que degrada la caseína; *Streptococcus diacetilactis* produce acetoina a partir de los citratos (y no de los azúcares). Los estreptococos heterofermentativos se encuentran con mucha frecuencia en la leche cruda, junto con los estreptococos lácticos, se caracterizan por una fermentación gaseosa de los azúcares, con producción de CO₂, y acetoina; forman ácido láctico en baja cantidad, son por ello poco acidificantes comparados con los otros. Se han identificado bien dos especies: *Leuconostoc citrovorum* o *Lactococcus cremoris* que no coagula la leche; y *Lactococcus kefir* o *Lactococcus lactis*, que fermenta las pentosas. También son usadas para aromatizar cremas lácteas (Exterkate, 1994).

La familia *Bacillaceae*, produce acidificación menos rápida pero más acusada que los estreptococos, en éste grupo se encuentran los mayores productores de ácido láctico (hasta el 2.8%). Su actividad caseolítica es elevada en general debido a la presencia de proteinasas activas. En la leche cruda son mucho menos abundantes que los estreptococos; por el contrario, predominan en diversos tipos de queso. Tienen un papel importante en la preparación de las leches fermentadas (yogurt). A este grupo pertenecen: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jugurti* (son las bacterias lácticas que producen mayor cantidad de ácido en la leche), *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, productores de acidez media en la leche 1.7%; y *Lactobacillus acidophilus*, cuya producción de ácido en la leche es débil, como la de los estreptococos. Los cinco son homofermentativos, y termófilos 40 a 50°C. *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus helveticus*, tienen importancia primordial en la fabricación de quesos de pasta cocida, forman la parte esencial de su flora bacteriana estimada en 10 millones/g. Aseguran una acidificación regular rebajando el pH hasta alrededor de 5.1; inhiben el desarrollo de los gérmenes nocivos, especialmente *Clostridium butyricum*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, además producen proteinasas y peptidasas, que les confiere un notable poder proteolítico (Hefnawy, 1996).

Los lactobacilos mesófilos (30 a 40°C), son homofermentativos menos acidificantes que los anteriores, aunque fermentan gran variedad de glúcidos, son más abundantes en la leche cruda que los termófilos, tienen un papel comparable a éstos últimos en la fabricación de quesos Cheddar y Holandés. El *Lactobacillus casei* es entre los mesófilos probablemente el que tiene mayor actividad en

quesería, ya que posee diversos sistemas enzimáticos que explican esta actividad: proteinasas, pepsidasas, desaminasas y también lipasas; a este grupo pertenecen también *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus bifidus* (Blom et al., 1996).

Existen lactobacilos heterofermentativos, son menos importantes que los homofermentativos, se encuentran en la leche, aportados por el cuajo o por restos vegetales, se desarrollan más lentamente y producen poco ácido (0.5% como máximo), en forma de mezcla de ácidos láctico, acético, succínico, etc., producen también alcohol. Su característica dominante es la producción de gas en cantidad importante durante la fermentación de los azúcares. Pueden provocar la hinchazón precoz de la cuajada o del queso recientemente fabricado. A este grupo pertenecen, el *Lactobacillus fermenti* termófilo, el *Lactobacillus brevis* mesófilo, y el *Lactobacillus plantarum* mesófilo (Goldstein and Wingard, 1997).

3.6.1 Microorganismos no iniciadores .

El queso Cheddar hecho bajo condiciones bacteriológicas controladas, desarrolla un sabor típico balanceado. Pero es intrigante, que quesos elaborados en tinas a cielo abierto, desarrollan el sabor más rápidamente. Esto sugiere que la flora no iniciadora presente como resultado de una contaminación post-pasteurización, es benéfica. Hay sin embargo reportes que concluyen que las bacterias no iniciadoras tienen un pequeño efecto en el desarrollo normal del queso Cheddar. Los estudios indican que los *Pediococcus ssp.* (*pentosaceus* y *acidilactici*), constituyen el grueso de los microorganismos no-iniciadores, el resto son *Micrococcus*, y *Lactobacillus*. En la medida en que se controle el enfriamiento del queso después del prensado, constituye el factor individual más significativo en el control de ésta flora, y aparece como el método más fácil de controlar el sabor del queso (Fox, 1993).

3.7 Cuajo .

El término "cuajo", "renin", "renet", o "chimiosin" se reserva para la enzima bruta extraída del cuarto compartimiento del estómago de los rumiantes jóvenes (terneras, cabritos, corderos, búfalos, cabras y ovejas), también llamado "cuajar" o "abomaso", antes del destete (El Soda, 1993).

Fue una de las primeras enzimas purificadas y estandarizada (1847 Dinamarca, Christian Hansen Labs.). Su uso en quesería se remonta aproximadamente a 6,000 A.C. La utilización de renina como una enzima exógena, es en quesería probablemente la más grande aplicación individual de enzimas en procesos alimenticios. En 1999 el nivel mundial de enzimas industriales, alcanzo la cifra de 1.6 billones de dólares en venta de los cuales el 45% corresponde al área

alimenticia (el 35% de proteinasa "*Bacillus*", 14% amiloglucosidasa, 10% amilasa *Bacillus*, 14% glucosa isomerasa, 5% renina microbiana, 4% amilasa fúngica, 10% pectinasa, 4% proteasa fúngica y 4% de otras; de estas últimas el 3% corresponde a lipasa), 34.4% a detergentes, 11% textiles, 2.8% tenería, 1.2% pulpa y papel, y el 5.6% restante a otras ramas excluyendo a diagnóstico y terapéuticos (Neelakantan, Mohanty and Kaushik, 1999).

Deschamps (1953), sugirió el nombre de chymosin derivado del griego chyme (líquido gástrico). La designación fue más tarde usada en Europa y del inglés, surgió el nombre "renin" derivado de "rennet", que ahora se recomienda en la nomenclatura internacional (E.C.3.4.4.3). Se le considera como endoproteasa. Su actividad óptima se encuentra entre pH 5 a 6. La mayoría de los quesos se producen por coagulación enzimática con renina, y con algunas excepciones, como el queso "Serra de Estrela" (Portugal), el cual se elabora con una proteinasa vegetal, proveniente de las flores cardoon (*Cynara cardunculus*), también llamada "cardosina" o "cynarasa". La renina de temera es aún el coagulante prevaleciente usado en quesería, pero debido a la deficiencia de los estómagos de estos animales, hay necesidad de algunas veces de fortificarla con la adición de "pepsinas" (E.C.3.4.4.1), obtenidas de la mucosa gástrica de cerdo y pollo en una proporción de 50:50 (Madrid, 1996).

Debido al incremento en la demanda de queso a nivel mundial (cercano al 4% anual los pasados 20 años), ha sido necesario desarrollar substitutos de renina, tales como la reninas microbianas (de *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae*, e *Irpex lactis*). Actualmente la renina microbiana, es usada en una tercera parte de todo el queso producido en el mundo. Desde 1970 se han vendido reninas microbianas bajo nombres comerciales como "Renilaza", "Fromaza", "Marzyme", y "Hanilaza", con resultados satisfactorios en diversos tipos de queso (Tabla 5).

Aunque las reninas microbianas son más baratas que las "reninas" animales, la mayor desventaja de su uso, es el desarrollo de sabor poco satisfactorio y amargura ya que como son más proteolíticas, y producen péptidos amargos durante la maduración, en los quesos madurados, así como en los no madurados. Para reducir esto, se usan combinadas. Las proteasas de reninas animales y fúngicas, todas pertenecen al grupo de proteasas aspárticas, previamente llamadas proteasas ácidas, debido a que en su centro activo presenta ácido aspártico. La composición de aminoácidos de las proteasas aspárticas son generalmente caracterizadas por un alto contenido de aminoácidos hidroxil y dicarboxílicos, y un bajo contenido de aminoácidos básicos. Los pesos

TABLA 5 . NOMENCLATURA Y ORIGEN DE LAS PRINCIPALES PROTEASAS USADAS COMO RENINAS .

NOMBRE IUB Y NUMERO.	OTROS NOMBRES	FUENTES
Pepsina Pepsina A EC 3.4.23.1	Pepsina II	Rumiantes, puercos, pollos.
Gastricina Gastricina EC 3.4.23.3	Pepsina I Parapepsina II Pepsina B	Rumiantes, puercos.
Quimiosina Quimiosina E3.4.23.4	Renina	Rumiantes.
<i>Mucor michei</i> proteasa EC 3.4.23.6	Renilaza (Novo) Hanilaza (C.H.) Fromaza (Wallertein) Marzyme (Miles)	<i>M. Michei</i>
<i>Mucor pusillus</i> proteasa	Emporaza (Daryland) Meito (M. Sangyo) Noury (Vitex)	<i>Mucor pusillus</i>
<i>Endothia parasitica</i>	Sure curd Suparen (Pfizer)	<i>Endothia parasitica</i>

FUENTE : Anon , 1997 .

moleculares que se han reportado para quimosina es de 35 600 Da, pepsina de puerco 34 600 Da, proteasa de *Mucor miehei* 38 000 Da, proteasa de *Endothia parasitica* 37 500 Da. Si se considera la estructura homóloga entre éstas enzimas la característica general, aparece como que todas las proteasas en cuestión consisten en cerca de 325 a 360 aminoácidos, y sus pesos moleculares van de 33 000 a 38 000 Da. Todas las enzimas coagulantes tienen su pH óptimo para proteólisis generalmente bajo condiciones ácidas: pepsina 2-4, gastricsina 3.0, quimosina 5-6, y las proteasas fúngicas 3-4 (Mc Sweeney and Fox, 1994).

Wake en 1969, demostró que la "caseína-kappa" es la única proteína láctea que resulta hidrolizada durante la fase primaria de la acción de la renina. Hay que recordar que más del 90% de la enzima agregada a la leche de quesería se pierde en suero; sólo del 3 al 6% es retenida, y es influenciada por el tipo de renina y la temperatura de cocinado (Godfrey and West, 1996).

El fenómeno de la coagulación (acidez de 0.16 a 0.20%, pH 6.7 - 6.8 y la temperatura entre 30 y 36°C), involucra tres pasos, el primero, engloba el ataque de las enzimas proteolíticas (quimosina, pepsina ó proteasas microbianas), contenidas en la renina sobre la "caseína-kappa", que estabiliza las micelas, desestabilizándolas. En el segundo, las micelas desestabilizadas subsecuentemente forman grumos en la fase líquida (coagulación). Y en el tercero, se hacen evidentes los cambios en las propiedades y estructura de la cuajada una vez que ha sido formada (Fernández-García y Ramos, 1993).

Daglesh en 1973, describe que la función primaria del coagulante de la proteína de la leche, es la de hidrolizar la "caseína-kappa", en un sitio muy específico, el enlace "fenilalanina¹⁰⁵ - metionina¹⁰⁶", resultando un fragmento péptido soluble llamado "macropéptido", que es el causante de la desestabilización del sistema caseína-micelas; en presencia de calcio iónico, las micelas desestabilizadas, forman una red tridimensional proteínica, que encierra en sí a la grasa, y a las bacterias lácticas, en forma de un coágulo. La función secundaria tiene que ver con la hidrólisis protéica durante la maduración. Los coagulantes son afectados por la acidez, temperatura, y contenido de calcio de la leche (Arenas, 1998).

Se han realizado numerosos intentos para clonar la renina de ternera expresada en bacterias, hongos y levaduras seleccionadas, debido a la deficiencia de estómagos y al valor económico de la renina quesera. El gen de renina de ternera, fue uno de los primeros genes clonado y expresado en microorganismos. Muchos laboratorios han clonado el gen de renina bovina en *Escherichia coli*. Se analizó su estructura y también las propiedades de la quimosina recombinante. Las

propiedades enzimáticas de ésta son indistinguibles de la renina bovina nativa. Las enzimas son idénticas cuando se observan en inmunodifusión en gel, y sólo se observó una diferencia visible en el ensayo de inmunoabsorbancia (Exterkate, 1994).

El gen de proquimosina ha sido clonado en *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Apergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, y *Trichoderma reesei*. Tipos diferentes de quesos han sido exitosamente elaborados usando reninas recombinadas a nivel experimental o escala piloto. No se han detectado diferencias de olor, sabor, y añejamiento. Las reninas recombinantes son idénticas a la renina de ternera de acuerdo al reporte sobre evidencias genéticas y bioquímicas (Pérez, Islas y del Río, 1999).

Existen quimosinas recombinantes reconocidas legalmente (GENERALY RECONGNIZED AS SAFE o "GRAS"), o en vías de serlo y que son aceptadas comercialmente (Tabla 6).

Existen un grupo de proteasas vegetales, Bromelina, Papaína, y Ficina que son usadas en algunos países como agente coagulante (en Inglaterra); presentan dos desventajas, primero sus precios son más elevados comparados con las reninas animales, y segundo, presentan una actividad demasiado proteolítica; aunque se encuentran libres de toxinas y patógenos y requieran poco tiempo de cuajado. La Papaína (E.C.3.4.22.2) procede del jugo seco de la fruta "Carica papaya". La Bromelina (E.C.3.4.22.5) de la fruta y tallo de la piña. Y la Ficina (E.C.3.4.22.3) de la sabia del árbol de higo (Law, 1997).

El cuajo se comercializa en polvo, en pastillas y liquido. El cuajo sólido se conserva mejor que el líquido; debe ser almacenado a temperaturas bajas, y se recomienda que sea a 4°C, para así tenerlo durante más tiempo sin pérdidas apreciables. Para determinar la cantidad de cuajo a usar, es necesario conocer el "título o fuerza" de éste. No se puede hacer comparaciones genéricas fuera de áreas limitadas y con leches diferentes; pero dentro de la misma zona y con la misma leche se puede determinar y comparar perfectamente. Se entiende por "fuerza del cuajo", a la cantidad de leche en gramos o en mililitros, que es cuajada por 1g de cuajo ó 1ml en 40 min a 35°C. En general, el cuajo líquido normal tiene una fuerza de 1 g, o 1ml/10 000, es decir, 1ml cuaja normalmente 10 L de leche a 35°C, en 40 min. El cuajo en polvo comúnmente se aplica en una proporción de 2.5g por cada 100 o 150 L de leche, por lo que su fuerza sería de 1/40 000 o de 1/60 000. La quimosina pura tiene una fuerza de 1/40 millones. El cuajo debe estar exento de enzimas dañinas (Varman and Shuterland, 1995).

TABLA 6. RENINAS RECOMBINANTES CON ACEPTACION COMERCIAL .

FUENTE DE DNA	MICROORGANISMO PRODUCTOR	COMPAÑIA
Abomaso de ternera	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Gist Brocades (Maxiren)
Abomaso de ternera	<i>Aspergillus niger</i>	Genecor (Chymigen)
Sintético	<i>Escherichia coli</i>	Pfizer (Chymax)

FUENTE : Neelakantan , Mohanty and Kaushik , 1999 .

3.7.1 Cantidad de cuajo por aplicar para obtener queso cheddar.

Es generalmente de 1ml/10L de leche, y la temperatura debe mantenerse a 30°C como mínimo, durante 30 a 45 min para permitir la formación de la cuajada (Ivarson, 1992).

3.7.2 Corte de la cuajada .

Debe permitirse que la cuajada se ponga firme antes de hacer el corte, el cual se realiza con una "lira" de quesería de 12.5 mm. Se realiza forma vertical y horizontal de un lado a otro de la tina. La acidez del suero debe estar entre 0.10 y 0.11% y el pH en 6.51 (Herian y Rizman, 1997).

3.7.3 Agitación de la cuajada .

La cuajada se agita durante 15 min (Ivarson, 1992).

3.7.4 Cocción de la cuajada.

La cuajada se calienta lentamente con vapor hasta alcanzar una temperatura de 38°C en un período de 30 min. Y se debe mantener así otros 45 min más. El contenido inicial de humedad de la cuajada es normalmente reducido de 87% hasta 39% en el queso Cheddar obtenido. La cuajada se corta en pedacitos y se agita, con el objeto de desprender el suero ("sinéresis") y coadyuvar en el control del desarrollo de la acidez; la aplicación de calor durante esta fase sirve para el mismo efecto, cuanto más alta sea la temperatura de "escaldado" que se utilice, tanto más seca quedará la cuajada producida. Por lo general, las temperaturas de escaldado no son superiores a 40 – 42°C, incluso cuando se quiere obtener un queso muy seco con propiedades para una larga conservación. La mayoría de las bacterias presentes en la cuajada quedan retenidas en ella y siguen con su actividad durante las operaciones subsiguientes (Jamieson y Jobber, 1994).

3.7.5 Reposo de la cuajada .

La cuajada se somete a reposo por 15 min a 38°C (Scott, 2000).

3.7.6 Drenado del suero .

El lactosuero se separa de la cuajada; ésta última se corta a lo largo y se apila en ambos lados de la tina. Su acidez debe estar entre 0.16% y 0.18%, el pH de entre 5.95 y 6.0 (Fernández-García y Olano, 1993).

3.7.7 Cheddarización .

Se permite a la cuajada reposar durante 15 min; y se corta en bloques de aproximadamente 55x12x10 cm, los que se voltean 2 o 3 veces cada 15 min y después se apilan en capas de 2 a 3. Como resultado de la cheddarización la cuajada debe estar seca y firme con una textura similar a la "pechuga de pollo". Se ha demostrado que la cheddarización no es un paso esencial, y su único propósito es el de proveer un período sostenido durante el cual se desarrolle el grado de acidez y se permita al suero más distante ser liberado de la matriz protéica. La pérdida de suero es controlada por la acidez, y la temperatura de la cuajada. La temperatura es importante directamente en el desarrollo de ácido. En general, altas temperaturas durante la cheddarización incrementan la expulsión de suero de la cuajada. En el proceso tradicional de obtención de queso Cheddar, el corte de los bloques de cuajada, su apilación y manipulación, también ayudan en el control de la humedad. Czulak en 1990, concluyó que la característica textura compacta del queso Cheddar, podría ser obtenida sin cheddarización, mediante la mecanización del proceso, sosteniendo a la cuajada para permitir el desarrollo de acidez, e implicando poco o nada de suero saliendo de ella. Los estudios realizados en E.U.A. y Nueva Zelanda confirman, que la cheddarización por sí tiene poco o ningún significado en el proceso de elaboración del queso Cheddar (Clime y Buchheim, 2001).

3.8. Molienda de la cuajada.

Cuando la acidez de la cuajada alcanzó un valor de entre 0.3 a 0.4%, un pH de 5.35 - 5.4 y se muele en forma de cubos de 2 cm por lado. Posteriormente se lava con agua fría para rehidratarla y eliminar algún posible sabor indeseable; así se diluye el lactosuero remanente y evita su acidificación. La operación de molienda tiene por objeto reducir el tamaño de los bloques de cuajada para facilitar la distribución uniforme de sal; así como favorecer el drenado, y congregarse la cuajada en forma conveniente para el prensado. Con grandes trozos de cuajada se requiere más sal, y se incrementa la probabilidad de grietas en ella, lo cual trae consigo una pérdida excesiva de sal en el suero. Se requiere un tiempo más prolongado para salar y permitir un gran desarrollo de ácido en el centro de grandes partículas de cuajada, que en las pequeñas, y esto puede resultar con una coloración dispareja en el queso final. En 1992 Gilbert, sugiere que el corte de la cuajada debe ser en forma esférica, lo cual resulta benéfico para obtener una relación masa/superficie con mejor rendimiento (Goldstein and Wingard, 1997).

Mientras más uniforme sea la superficie, más uniforme será la difusión de sal dentro de las partículas de cuajada. Actualmente en las grandes fábricas de queso Cheddar, existe un período llamado "mellowing", antes del salado. El cual

permite que se produzca suficiente humedad en la superficie de las partículas para disolver los cristales de sal que serán aplicados y así elevar su retención e incrementar la acidez. Este período se desarrolla durante sólo 5 a 10 min (Fox, 1993).

3.9 Salado .

El uso de sal (cloruro de sodio), como preservativo alimenticio, data de tiempos de la pre-historia, y junto con la fermentación y deshidratación (aire/sol), es uno de los métodos clásicos de preservación de los alimentos. Así de útil y ampliamente extendido ha sido el uso de la sal como preservativo alimenticio, durante la Edad Media, fue objeto de comercio a cambio de bienes y labores. Además de esto, la sal presenta dos roles importantes, primero, el hombre requiere de 3 a 5g diarios de ella, y aunque es posible satisfacer este requerimiento con la sal propia de los alimentos, también puede ser adicionada a las dietas; y segundo, contribuye directamente en el sabor del queso. Como consecuencia de su uso, presenta ciertos efectos :

- 1.- controla el crecimiento de microorganismos y su actividad
- 2.- controla las actividades enzimáticas
- 3.- sinéresis de la cuajada resultando la expulsión de suero y de éste modo, reduce la humedad, y esto último influye en los puntos anteriores
- 4.- cambios físicos en las proteínas del queso, lo que influye en la textura, solubilidad de la proteína y probablemente en la conformación proteínica
- 5.- regulación del pH

El uso de sal para regular el pH final parece exclusivamente confinado a los quesos tipo inglés. A niveles mayores de 1.5% se inhibe la actividad de los cultivos iniciadores; la cuajada del Cheddar contiene más o menos 0.6 a 1.0 % de lactosa antes del prensado, esta es fermentada durante los inicios del añejamiento por la actividad continuada de los microorganismos iniciadores que depende enormemente del contenido de sal en la cuajada, y de su tolerancia a ella. Los cultivos lácticos comerciales son estimulados por niveles de sal bajos, y son fuertemente inhibidos a concentraciones mayores al 2.5%. Por esto, la actividad microbiana iniciadora y su habilidad fermentadora residual sobre la lactosa es fuerte y depende del contenido de sal en la cuajada (Dairy Council Digest, 2002).

En 1985 O' Connor, determinó, que los valores de pH presentan un decremento después del salado, presumiblemente debido a la acción de las bacterias ácido lácticas a niveles menores al 5% de sal pero, en valores mayores ésta actividad disminuye abruptamente y el pH permanece alto. Inclusive la "calificación de

calidad" asignada al queso, también es disminuida puntualmente cuando el contenido de sal es mayor al 5%. Los *Lactococcus lactis subsp. lactis* son generalmente más tolerantes a la sal que las cepas de *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, hay también una variación en la sensibilidad entre las propias cepas de *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Si la actividad iniciadora microbiana es inhibida después de la manufactura, la lactosa residual será metabolizada por las bacterias lácticas no-iniciadoras, su número es influenciado por el nivel de contaminación durante el salado, la concentración de sal presente, y la temperatura a la cuál será sometida la cuajada para ser enfriada antes de ser añejada; y usualmente insuficiente para causar daño al metabolismo de la lactosa por algunos días y consecuentemente el pH cae lentamente. Se asume que el NaCl, es distribuido a través del queso dentro de un período muy corto después de la salazón a una velocidad de 0.126 cm²/día. Obviamente el salado en seco sobre la superficie de los granos de cuajada, toma un tiempo considerable para procurar el efecto inhibitor. Consecuentemente los microorganismos iniciadores continúan creciendo y produciendo ácido en el centro de la raspadura durante un período considerable después que el crecimiento en la superficie ha cesado (Mc Garry, Law and Fox, 1994).

La aplicación electroforética en gel de poliacrilamida, demostró que en quesos duros y semi-duros con añejamiento bacteriano, la caseína "alfa-s1" es degradada, pero la caseína "beta" permanece inalterable durante la maduración. La hidrólisis de la caseína "alfa-s1" por las enzimas de las bacterias ácido lácticas, es enormemente influenciada por la concentración de NaCl. Las actividades proteolíticas de quimosina, pepsina y *Mucor miehei* son estimuladas por el incremento de la concentración de sal, hasta un óptimo de 6%; cuando las actividades son inhibidas como consecuencia de niveles más altos de sal, la proteólisis de la caseína "alfa-s-1" ocurre arriba del 20% de NaCl. En contraste, la proteólisis de la caseína "beta" por quimosina y pepsina son fuertemente inhibidas con 5% y completamente inhibidas con 10% de sal (Anon, 1997).

La adición de sal al queso ayuda a que se forme el sabor correcto, y regula la actividad bacterica. Generalmente el contenido de sal es del 2% aproximadamente, pero no es el porcentaje de sal presente en el queso lo que regula esta actividad, sino el porcentaje de sal contenida en la fase acuosa del queso. Así el 6% de sal en el contenido de humedad del queso, inhibe el crecimiento de algunos organismos, pero permite que siga la actividad de otros. Por ese motivo, la sal regula el proceso de maduración; los altos contenidos de sal dan un queso de maduración lenta, y los bajos contenidos de sal surten el efecto contrario (Farkye and Fox, 1992).

La actividad de la enzima alcalina propia de la leche (plasmina), es estimulada a concentraciones bajas de NaCl, no mayores al 2%, y se inhibe en niveles superiores, aunque en 8% permanece algo de esta actividad. La enzima ácida de la leche (proteínasa ácida), tiene aparentemente la misma especificidad, que las enzimas coagulantes (renina, pepsina, etc.), y la influencia que ejerce la sal en su actividad no ha sido estudiada. Existe información acerca del contenido de sal y la lipólisis en queso Cheddar, se compararon quesos salados con 1.48% a 1.79%, y 0% (no salado); la concentración de ácidos grasos volátiles resultó significativamente más alta en el queso sin sal, que en los salados, debido principalmente al ácido acético, producto del metabolismo de la lactosa. Las concentraciones de todos los ácidos grasos volátiles individuales, excepto el linoléico y linolénico, también fueron más altos en el queso sin sal. Lindsay en 1991, encontró una pequeña diferencia entre niveles de ácidos grasos en quesos con bajo (3.5%) o intermedio (4.2%) contenido de sal, excepto para ácido mirístico, y ácido palmítico los que resultaron más elevados en el queso salado (Santos, 1994).

La proteólisis es considerada más extensiva en queso no salado, que en salado y consecuentemente su cuerpo es menos firme. Durante el añejamiento normal del Cheddar, la caseína "alfa-s1" es el sustrato principal para la proteólisis, con una pequeña degradación de la caseína "beta" siendo más extensiva a bajos niveles de sal. Además del sabor ácido asociado con el bajo contenido de sal, se ha reportado consistentemente amargura como defecto en quesos. La amargura de los péptidos está fuertemente relacionada con la "hidrofobicidad". Los péptidos amargos en el queso, se originan primordialmente de la caseína "beta", lo cual puede ser esperado ya que la caseína "beta" es la más hidrofóbica. La efectividad del NaCl, en la prevención de la amargura es muy requerida debido a la selecta inhibición que presenta sobre la hidrólisis de ésta caseína. Por ello, el contenido de humedad, de sal y el pH, son claves determinantes de la calidad del queso (Fox, 1993).

3.9.1 Tipos de salado.

Las técnicas de salado son las siguientes :

- a) salado en la masa del queso
- b) salado sobre la superficie del queso
- c) salado en salmuera (Centeno y Alvares, 1994).

3.9.1.1 Adición de la sal en el caso del queso Cheddar.

Se emplea el salado en la masa del queso, en ésta operación se utiliza sal de mesa en una proporción del 2%, en relación al peso de la cuajada, la cual se distribuye en dos porciones, que son incorporan manualmente sobre ella (Madrid, 1996).

3.10 Moldeado.

Cuando la sal ha sido absorbida por la cuajada, se procede a moldearla; colocándola en moldes cubiertos en su parte interna con manta de cielo. La temperatura se mantiene a 25.5°C (Ivarson, 1992).

3.11 Prensado.

Una vez que los trozos de cuajada salada han sido moldeados, ha continuación, se colocan en una prensa y se les somete a prensado. La presión se aplica en los quesos gradualmente; al principio cuando se va enfriando la cuajada, se le aplica una presión de hasta 2.8kg/m² durante unas 12 a 16 horas. Durante este tiempo, los trozos de cuajada se ligan unos con otros para dar un queso compacto, y se exprime el exceso de suero y humedad todavía presente en el queso crudo. Después los quesos se voltean, y se les colocan nuevas telas para introducirlos nuevamente a los moldes, pero en esta ocasión, se les aplica una presión de 7.3kg/m² durante 24 horas más (Mohamed et al., 1992).

3.12 Almacenamiento del queso Cheddar.

Se almacena a temperatura de 8 a 10°C durante dos días con una humedad relativa de 60-80%, para que se seque, volteándolo cada 12 horas; y después se coloca en la cava o cámara de maduración (Ivarson, 1992).

3. 13 Maduración del queso Cheddar.

Una vez en la cava de añejamiento, el queso Cheddar se mantiene a una temperatura controlada de 7.2 a 11°C, con humedad relativa del 90 %, durante 9 a 12 meses. Al término de éste período, el producto deberá presentar las características propias de la variedad en cuestión, y de acuerdo a la regulación vigente (Corsetti, 2000).

El pH del queso Cheddar, se incrementa solamente 0.1 unidades después de seis meses de maduración. La capacidad buffer del queso se incrementa durante el añejamiento causado por la formación de amonio, y grupos amino e imino (Mc Sweeney and Fox, 1994).

3.14 Rendimiento del queso Cheddar.

Por cada 44.5kg de leche con 3.5% de grasa, es posible obtener aproximadamente de 4.10 a 4.42 kg de queso Cheddar, con una humedad del 37% (El Soda, 1993).

3.15 Especificación del queso Cheddar.

El queso Cheddar obtenido por éste método, presenta los siguientes parámetros :

Humedad 37-38 %, Grasa 32%, Proteína 25%, Sal 1.4 – 1.7% (Ivarson, 1992).

CAPÍTULO IV. Añejamiento.

La maduración del queso es un proceso complejo que involucra el rompimiento gradual de los carbohidratos, grasas, y proteínas. Los cambios que toman lugar durante el añejamiento pueden ser divididos en dos grupos, el primero, incluye la formación de péptidos y aminoácidos de las caseínas (alfa, beta, gama y kappa), ácidos grasos de la grasa láctea, la conversión de lactosa en ácido láctico, u otros productos obtenidos vía fermentación como dióxido de carbono, etanol, y ácido acético; los cambios primarios también involucran la degradación de citrato. Los cambios secundarios, incluyen la conversión de productos finales que resultan de los cambios primarios, aminoácidos que proporcionan aminas, ácidos orgánicos, compuestos sulfurados y CO₂; la conversión de ácidos grasos incluye cetonas, lactonas, aldehídos, y alcoholes secundarios. Los ácidos orgánicos y el CO₂ pueden resultar de la fermentación de los carbohidratos. Pueden ocurrir interacciones entre los diversos pasos (Figura 1).

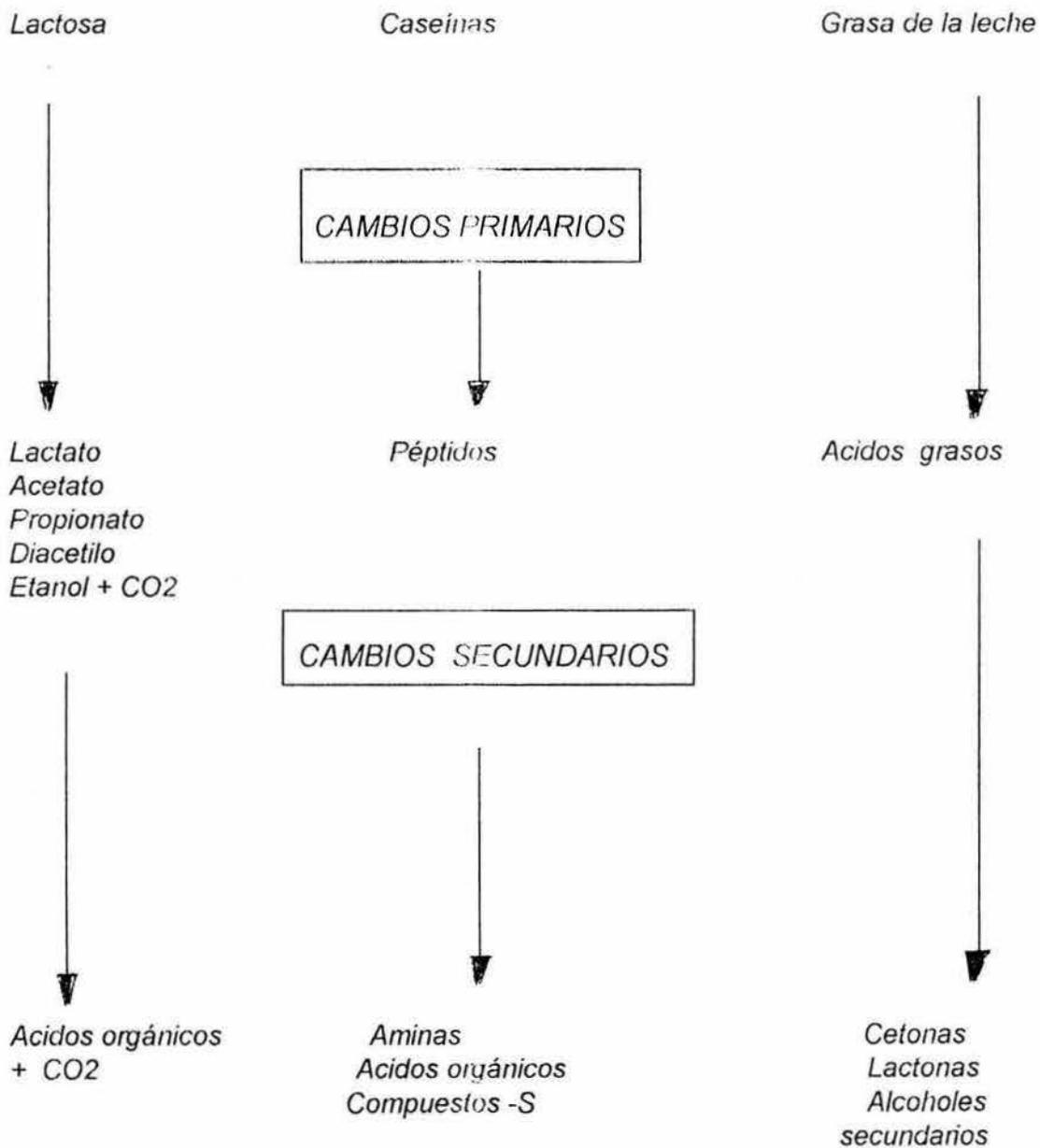
Los perfiles de sabor de los quesos son complicados y específicos para cada variedad. La diversidad entre el sabor de las diferentes variedades es debida a los diferentes procesos de manufactura, incluyendo los tipos de cultivos iniciadores usados, la composición fisicoquímica del queso, y otras condiciones de añejamiento como la temperatura, y la flora secundaria (El Soda, 1993).

Este proceso integra cambios bioquímicos y biofísicos que transforman a la cuajada blanda en un queso maduro con textura, sabor y aroma característicos mediante cuatro o posiblemente cinco agentes : (1) renina o sustituto de renina residuales, (2) enzimas propias de la leche, (3) bacterias ácido lácticas y sus enzimas, (4) enzimas de la flora secundaria, (5) microorganismos no iniciadores (Arenas, 1998).

4.1 Glicólisis.

Durante la fase de manufactura, y bajo condiciones normales, la lactosa es convertida en ácido láctico (principalmente en el L-isómero), primordialmente por la actividad de las bacterias lácticas. En el caso del queso Cheddar mucho del ácido láctico se produce en la tina antes del salado y moldeo, mientras que para otras variedades, ocurre preferentemente después de que la cuajada ha sido colocada en los moldes. Para muchas o casi todas las variedades el pH se alcanza dentro de las 5 a 12h de haber empezado la fabricación. Aunque el 98% de la lactosa es retenida en el suero, en forma de lactosa o lactato la cuajada aún contiene del 0.8 al 1.5% hasta el final de la manufactura (Rico, 2002).

Figura 1. Cambios que ocurren durante el
añejamiento del queso .



Fuente : El Soda, 1993 .

El metabolismo rápido y completo de la lactosa residual y sus componentes monosacáridos es esencial, para la producción de queso de buena calidad. La lactosa residual es fermentada relativamente rápido dependiendo de la cantidad de sal presente en la cuajada; con altas poblaciones de organismos no-iniciadores y altas temperaturas de almacenamiento, se forman cantidades considerables de L-lactato, parte por fermentación de lactosa y parte por isomerización de este; en altas concentraciones de sal (6%) y baja cuenta de no-iniciadores, la lactosa se transforma muy lentamente; en bajas concentraciones de sal y con baja cuenta de no-iniciadores, la lactosa residual es convertida por las bacterias ácido lácticas iniciadoras. La calidad del queso es enormemente influenciada por la fermentación de la lactosa residual. El pH baja su valor después del salado, presumiblemente debido a la acción continuada de los organismos iniciadores a niveles de sal menores al 5%, pero a mayores niveles, ésta actividad decrece abruptamente, junto con altos niveles de lactosa residual y de pH. La calidad de el queso también decrece puntualmente a niveles mayores del 5% de sal (Visser, 1997).

4.1.1 Cambios en lactato durante la maduración.

Las concentraciones de lactato en quesos Camembert, Suizo y Cheddar, han sido reportadas estar en 1.0%, 1.4% y 1.5% respectivamente. Estudios recientes mostraron que el queso Cheddar experimental y comercial contiene concentraciones considerables de D-lactato, el cual pudo ser formado por lactosa residual por *lactobacilli* o por racemización de L-lactato. Los datos muestran que *pediococci* son probablemente los responsables de la racemización: los 27 *pediococci* y el *Pediococcus pentosaceus*, aislados del Cheddar fueron capaces de convertir L-lactato en D-lactato, eventualmente produciendo una mezcla racémica; sólo 5 de los 16 *lactobacillus* aislados fueron capaces de racemizar L-lactato, en menos cantidad y más lento que *pediococci*. La racemización de L-lactato, no es probablemente significativa desde el punto de vista del sabor; pero el D-lactato, puede tener consecuencias nutritivas indeseables en los infantes (Casanueva et al., 1994).

La oxidación de lactato puede ocurrir también en el queso, *pediococci* produce 1mol de acetato y un mol de CO₂ y consume 1 mol de O₂ por mol de lactato utilizado. Si la concentración de lactato en queso excede aquella requerida para la óptima oxidación, el lactato no es oxidado hasta que todos los azúcares han sido agotados. El sistema oxidativo del lactato, permanece activo en los quesos con hasta 6 meses de añejamiento. Las bacterias lácticas oxidan lactosa únicamente *L. casei* oxida citrato, cuando *L. plantarum* y *P. pentosaceus* oxidan lactosa, péptidos, y L- y D-lactato, pero no citrato. Estos resultados sugieren que la oxidación del lactato en acetato, depende de la población de organismos

no-iniciadores y de la disponibilidad de oxígeno, la cual es determinada por el tamaño del block de queso y la permeabilidad al O₂ del material de empaque. El acetato puede ser también producido por las bacterias ácido lácticas a partir de lactosa, de citrato o de aminoácidos. El acetato está usualmente presente en queso Cheddar, y es considerado como un atributo de su sabor; en altas concentraciones, puede causar sabores desagradables. Por esto la oxidación del lactato en acetato es muy importante en el Cheddar. Presumiblemente la oxidación de L-lactato en acetato ocurre en todos los quesos semi-duros (Huitrón, 1993).

4.1.2 Metabolismo del citrato.

Existe una concentración relativamente baja de citrato en la leche de vaca (8mM); el citrato no es metabolizado por *L. lactis* o *L. cremoris*, pero si lo es por *L. lactis subsp. diacetylactis* y también por *Leuconostoc spp.*, con la producción de diacetilo y CO₂. No es metabolizado por *S. thermophilus* o por *lactobacilli* termófilos, sin embargo algunas especies de *lactobacilli* mesófilos si lo hacen, con producción de diacetilo y formiato; la presencia de lactosa influye en la cantidad de formiato formado. Debido a la producción de CO₂, el metabolismo del citrato es el responsable de los "ojos" característicos del queso holandés, y de la indeseable abertura y la textura suelta en los quesos Cheddar y Cottage respectivamente. Causado principalmente por la formación de diacetilo, el metabolismo del citrato es muy significativo en el aroma y sabor de ciertos quesos como el Cottage; el diacetilo también contribuye en el sabor del queso holandés, y posiblemente en el del Cheddar. El acetato producido a partir de citrato, puede contribuir en el sabor del queso (Goldstein and Wingard, 1997).

Aproximadamente el 90% del citrato de la leche es soluble y mucho de él se pierde en el suero; aunque la concentración de citrato en la fase acuosa del queso es más o menos 3 veces lo que hay en el suero, presumiblemente reflejando la concentración de citrato coloidal. El queso Cheddar contiene 0.2 a 0.5%. El citrato se disminuye en Cheddar lentamente casi a cero a los seis meses, presumiblemente como resultado del metabolismo de *lactobacilli* no-iniciador; *pediococci* no parece utilizar el citrato (Frakye and Fox, 1992).

4.2 Proteólisis.

La proteólisis es el más importante de los tres eventos primarios durante el añejamiento del queso y posiblemente el más importante por el desarrollo del sabor y textura, especialmente en aquellos quesos madurados con bacterias. La proteólisis contribuye por lo menos en cuatro formas : (1) una contribución directa al sabor vía aminoácidos y péptidos, algunos de los cuales pueden causar sabores

no deseados, especialmente amargura, o indirectamente vía catabolismo de aminoácidos hacia aminas, ácidos, tioles, tioésteres, etc., (2) gran liberación de compuestos sápidos durante la masticación; (3) cambios en el pH vía la formación de NH₃; (4) cambios en textura derivados del rompimiento de la red de proteínas, con incremento en el pH atrapando al agua por la formación de grupos amino y carboxilo (Figura 2).

En el caso del queso Cheddar, Holandés y otras variedades, muchos autores consideran que la proteólisis es el evento bioquímico más importante durante la maduración. Existe una alta correlación entre la intensidad el sabor del queso Cheddar y la concentración de aminoácidos. La caseína puede degradarse del 35% al 45% (Santos, 1994).

Para la gran mayoría de los quesos duros y semi-duros, se considera a la proteólisis, como el índice de madurez más comúnmente usado y aceptado. Puede determinarse cuantificando y caracterizando al nitrógeno en un extracto de queso soluble en agua. La metodología es variada ya que es posible con el uso de ácido fosfotungsténico, por titulación directa, con ninhidrina, o-ftaldialdehído, ácido trinitrobenzensulfónico, o fluorescamina. Asimismo también se puede evaluar mediante electroforesis y cromatografía (Tucker and Woods, 1995).

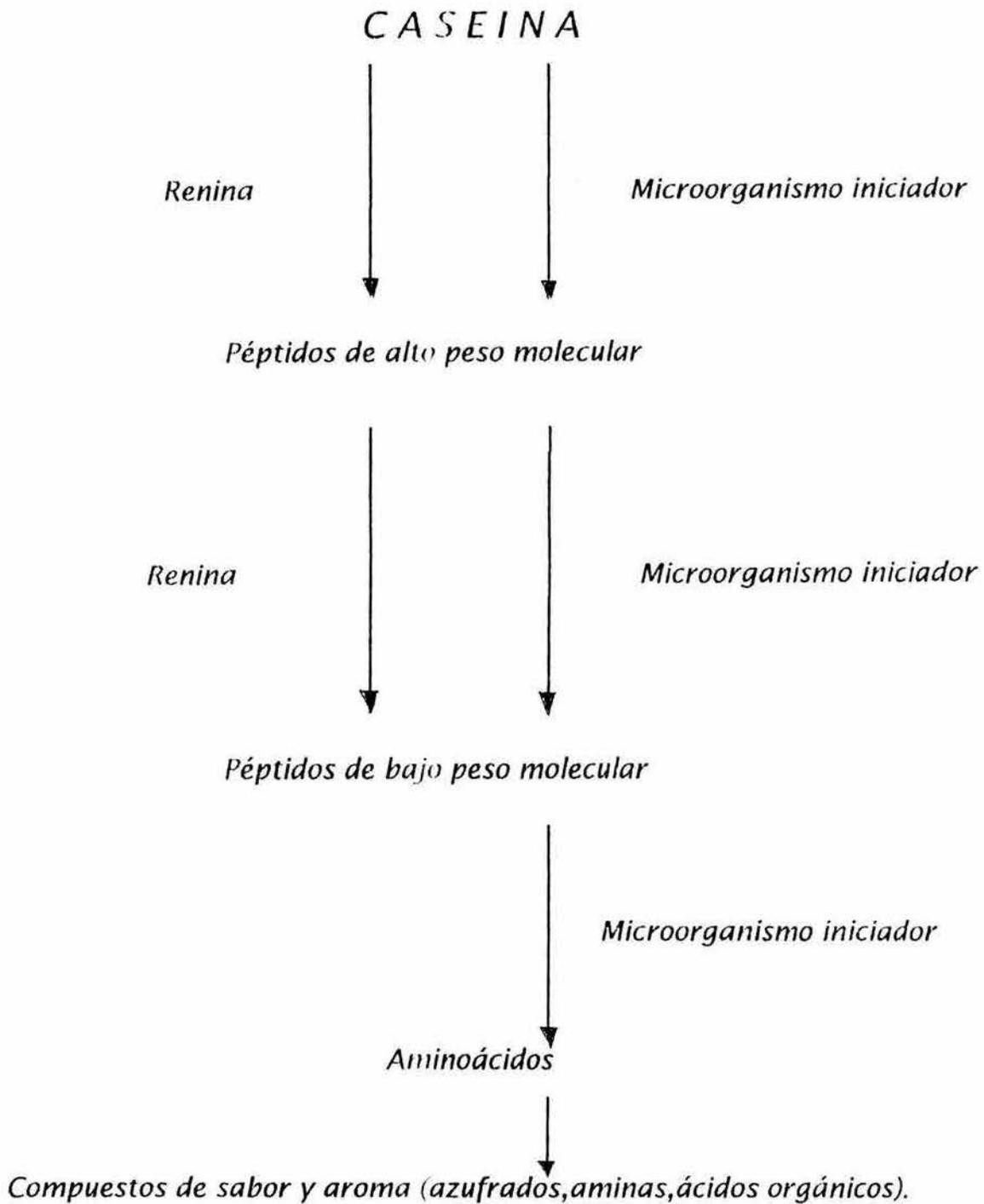
4.2.1 Agentes proteolíticos en queso.

Cuatro y en algunas variedades cinco agentes contribuyen a la proteólisis en queso: (1) renina o sustituto de renina; (2) proteinasas propias de la leche, especialmente la "plasmina"; (3) proteinasas y peptidasas provenientes de los organismos iniciadores, debido a la lisis celular; (4) proteinasas y peptidasas de microorganismos secundarios en algunas variedades: *Propionibacterium shermani* en Suizo, *Brevibacterium linens* en quesos cubiertos en su superficie con alguna sustancia como aceite de oliva, *Penicillium roqueforti* en Roquefort, *Penicillium caseicolum* en Camembert y, (5) enzimas de organismos no iniciadores (Walstra et al., 2001).

4.2.1.1 Efecto del coagulante.

Todas las reninas comerciales son proteinasas que muestran especificidad por los enlaces peptídicos. Sólo del 3 al 6% del coagulante permanece en la cuajada. El coagulante posee dos funciones : la primaria es la de actuar sobre la casína "kappa", y la secundaria se refiere al ataque de la renina sobre la caseína "alfa-s1", durante los días 7º al 14º de la maduración, y como resultado se obtienen las fracciones pépticas, "fenilalanina 23 – fenilalanina 24", "triptófano 164 – tirosina 165", "leucina 156 – aspargina 157 "

Figura 2. Curso que sigue la proteólisis de la caseína durante el añejamiento del queso.



"alanina 158 – tirosina 159" y "fenilalanina 153 – tirosina 154" que pueden corresponder a "alfa-s1-I", "alfa-s1-II", "alfa-s1-III" y "alfa-s1-IV". Asimismo la renina "abre" también a la caseína "beta", sobre los enlaces péptidicos 192-193, 189-190, 163-164, y 139-140, que corresponden a los péptidos "beta I", "beta-II", "beta-III" y "beta-IV" respectivamente (Climme y Buchheim, 2001).

En los quesos añejados por bacterias y por hongos, cuando se usan reninas animales, la caseína "beta" presenta una resistencia un poco mayor a la proteólisis hasta el punto en que las proteinasas fúngicas, se vuelven dominantes después del crecimiento de los hongos; más o menos el 50% de la caseína "beta" sobrevive después de seis meses. En contraste, las reninas microbianas degradan caseína "alfa-s1" y caseína "beta" en la misma medida. En el Cheddar y Holandés, la caseína "alfa-s1" es degradada completamente durante la maduración. En los quesos madurados en su superficie con hongos como el Camembert y probablemente en los quesos cubiertos con aceite, el coagulante es considerado como esencial para el desarrollo de la textura propia. Las proteinasas excretadas por los hongos dentro del queso solamente desarrollan poca proteólisis dentro de él, aunque los péptidos producidos por estas enzimas en la capa superficial pueden difundirse al interior. La acción secundaria del coagulante influencia el sabor en tres formas :

- algunos péptidos producidos por la renina son bastante pequeños para influir en el sabor, desafortunadamente algunos estos péptidos son amargos.

- los péptidos producidos por la renina sirven de substrato para las proteinasas microbianas y peptidasas las cuales producen pequeños péptidos y aminoácidos; ésto contribuye por lo menos al fondo del sabor, y quizá desafortunadamente a la amargura si la actividad de las enzimas es excesiva. El catabolismo de aminoácidos por enzimas microbianas y tal vez alteraciones químicas, permite el desarrollo de compuestos sápidos (aminas, ácidos, NH₃, tioles, etc.), que son los mayores contribuyentes al sabor característico del queso.

- las alteraciones en la textura del queso parecen influir en la liberación de sabor y aroma producto de la proteólisis, glicólisis, lipólisis y cambios metabólicos secundarios del queso durante la masticación; esto puede ser la contribución más significativa de la proteólisis al sabor del queso (Centeno y Alvares, 1994).

Un incremento en el nivel de renina con el objeto de acelerar la maduración, no estimula la producción de aminoácidos, y solamente trae consigo una mayor

amargura; la posibilidad de adicionarla para conseguir este propósito, no es realista (Law, 1997).

4.2.1.2 Plasmina.

La leche contiene algunas enzimas proteolíticas propias, de las cuales la "plasmina", es la más importante (E.C.3.4.21.7). Se le considera como proteinasa alcalina parecida a la tripsina, con un pH óptimo de 7.5 de 30 a 40°C, y que presenta alta especificidad por los enlaces peptídicos involucrando residuos de lisina. Se encontró que es similar a la enzima "plasmina" de la sangre humana. Y es transferida en pequeñas cantidades a la glándula mamaria principalmente en la forma de precursor inactivo llamado "plasminógeno". La mayor parte de la plasmina/plasminógeno es retenida en la cuajada, el resto se va en el suero; y probablemente contribuye por lo menos en alguna extensión en el añejamiento del queso. La plasmina está asociada con las micelas caseínicas, ya que las acompaña dentro de la cuajada (Blom et al., 1996).

Todas las caseínas "mayores" de la leche son susceptibles de ser atacadas por la plasmina, caseína "alfa-s1", caseína "pi", e inclusive la caseína "alfa-s2" excepto la caseína "kappa". Aunque la caseína "beta" también es susceptible de hidrólisis, ésta presenta únicamente tres puntos específicos de ataque "lisina - lisina" (28 - 29), "lisina - histidina" (105 - 106), y "lisina - glicina" (107 - 108). Como resultado de esta hidrólisis, se obtienen péptidos hidrófobos amargos. Normalmente en quesería se asocia a la amargura con péptidos hidrófobos, en el fondo se trata de la plasmina. Esta juega un papel muy importante en la maduración del queso en el cual la actividad del coagulante ha sido destruida como resultado de la alta temperatura de cocinado, menor a 50°C aplicado por ejemplo en la producción de queso Parmesano o Suizo. Este último contiene dos veces más actividad de plasmina que el Cheddar. Se considera que la plasmina contribuye un poco en la maduración del queso Cheddar, debido al bajo pH que este presenta (Farkye, 1992).

Como evidencia, se preparó queso Cheddar a partir de leche suplementada con más de seis veces del valor propio de plasmina; la enzima se agregó a la cuajada con lo cual se obtuvo un incremento en la proteólisis y añejamiento, sin defectos concomitantes (Fox, 1993).

Otra enzima menos importante es la llamada "proteínasa ácida de la leche", la cual actúa sobre la caseína "alfa-s1", inicialmente en forma similar a la que presenta la quimosina. El rol del coagulante en la hidrólisis de péptidos, es más dominante que el de ésta proteínasa (Mc Garry, Law and Fox, 1994).

4.2.1.3 Enzimas proteolíticas de los organismos iniciadores.

Las bacterias ácido lácticas agregadas a la leche de quesería funcionan no sólo como "iniciadoras" de la acidificación, fermentando la lactosa en ácido láctico; son extremadamente importantes como proveedoras de enzimas proteolíticas que más adelante promoverán la degradación proteínica durante la maduración del queso. Generalmente cada organismo posee un tipo de proteinasa extracelular, enlazada a la célula, y un "pool" con gran diversidad de peptidasas intracelulares. Se piensa que la proteinasa extracelular está anclada a la cubierta celular vía su parte "C" terminal. La degradación posterior de la caseína en fragmentos no puede tener lugar sin el rompimiento de las bacterias iniciadoras. Una característica muy importante de las bacterias ácido lácticas, es su grado de "autólisis", el cual se ve influenciado por el pH, la temperatura, sodio, e inclusive el congelamiento; el género *Lactococcus* posee un buen grado; *Streptococcus cremoris*, muere más rápido y presumiblemente se autolisa mucho más pronto que *Streptococcus lactis*. Es por ello importante la selección cuidadosa de las cepas que se usaran para coadyuvar en la maduración del queso (Varman and Shuthreland, 1995).

La diversidad de las peptidasas iniciadoras, promueve más adelante un rompimiento eficiente a pequeños péptidos y aminoácidos. Esta es una razón importante del porque el "pool" de peptidasas intracelulares juega un rol decisivo en el cuidado la producción de péptidos amargos dentro el queso. Las proteinasas también conocidas como proteasas, puede ser clasificadas de acuerdo a las características de sus centros activos :

1) Algunas proteinasas contienen grupos mercapto en sus centros activos, como papaína (E.C. 3.4.22.2), bromelina (E.C.3.4.22.5), o ficina (E.C.3.4.22.3), que son inhibidas por agentes oxidantes y metales pesados.

2) Metaloproteinasas (E.C.3.4.24.4), o proteasas neutrales, que requieren metales como cinc, magnesio o cobalto, para su actividad. Su pH óptimo es de 6 a 9. Son endoproteasas y los agentes como EDTA las inhiben. A este grupo pertenecen las proteasas producidas por algunas especies de *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. thermoproteolyticus*, así como también *Streptomyces griseus*. Han sido menos estudiadas que las "subtilisinas", se desarrollaron industrialmente como sustitutos de renina, pero como causan una excesiva hidrólisis de la caseína, su aplicación se abandonó; estas proteinasas están asociadas a la pared celular (Huitrón, 1993).

3) Proteinasas que contienen residuos de histidina o serina en sus centros activos; a este grupo pertenecen la tripsina y quimiotripsina que son obtenidas del páncreas bovino o porcino, y también algunas enzimas bacterianas (E.C.3.4.24.4), a las cuales denominan "bacilopeptidasas A y B". La "bacilopeptidasa A" o "subtilisina A" incluye a la "subtilisina Carlsberg" y a las proteasas alcalinas producidas por *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus pumilus*. La "bacilopeptidasa B" o "subtilisina B" incluye a la "subtilisina Novo" y proteasas alcalinas del *Bacillus subtilis* entre otros. Una diferencia interesante que presentan los microorganismos productores de estas proteasas alcalinas, es que las especies de *Bacillus subtilis* que producen la "bacilopeptidasa A" no producen proteasas neutras y amilasas en cantidades apreciables. En cambio, las especies productoras de "bacilopeptidasa B" también producen una proteasa neutra y una amilasa. Las proteasas neutras son metaloenzimas y aparentemente no están relacionadas con las "bacilopeptidasas". Las "subtilisinas" pueden hidrolizar del 65% al 70% de las uniones peptídicas, específicamente en el enlace "leucina-15-tirosina-16"; son endoproteasas, su pH óptimo se encuentra de 7 a 11 de 10 a 25°C. Todas ellas son inactivadas con diisopropilfluorofosfato, hipoclorito, peróxido de hidrógeno, y fluoruro de fenilmetanesulfonilo; la "subtilisina Carlsberg" es durable y económica. La "subtilisina Novo" tiene una aplicación limitada a detergentes (Law, 1997).

4) Proteinasas ácidas del grupo de la pepsina, que poseen ácido aspártico o glutámico en sus centros activos. A parte de la pepsina, a este grupo pertenecen un grupo de proteinasas de hongos, activas bajo condiciones ácidas. Como *Aspergillus orizae* cuyo pH óptimo es de 2.5 a 3; *Paecilomyces varioti* de 3.5 a 5.5; *Rhizopus chinensis* de 5. El *Aspergillus orizae* también posee proteinasas neutras (pH 5.5 a 7.5), que son usadas en la producción de bebidas y en panadería; sus proteasas alcalinas (pH 6.5 a 10), se emplean en tenería (Fox, 1993).

4.2.1.4 Contribución de las proteinasas "iniciadoras" al añejamiento.

L. lactis abre cinco enlaces de la "caseína-beta", "serina-glicina" (166-167), "glicina-lisina" (175-176), "glutamina-arginina" (182-183), "tirosina-glicina" (193-194), e "isoleucina-isoleucina"(207-208). La contribución de los microorganismos iniciadores termófilos no ha sido extensivamente o sistemáticamente estudiada como la de los mesófilos; sin embargo, *L. delbruekii subsp. bulgaricus* y *S. thermophilus* son usados en la manufactura de queso Parmesano y Romano; *L. bulgaricus*, *L. lactis* o *L. helveticus* y *S. thermophilus* se usan en la producción de variedades Suizas en adición de *Propionibacterium shermanii*, el cual es necesario para la formación de "ojos" vía la producción de CO₂. Las bacterias ácido lácticas termofílicas, también son usadas en la manufactura de quesos Mozzarella, Provolone, Brick y Limburger. El *S. thermophilus* posee un sistema

proteínasa/peptidasa asociado a la pared celular que es capaz de hidrolizar proteínas en aminoácidos, indispensables en su nutrición y producción de ácido fórmico. Las cepas de *L. helveticus*, poseen una alta actividad de aminopeptidasa comparada con otras cepas de *lactobacillus*; de hecho se ha usado para acelerar la maduración de queso Gouda (Campos, 1992).

4.2.1.5 Peptidasas.

Como se ha descrito, las proteinasas lactococales inician la degradación de la caseína en polipéptidos los cuales son posteriormente hidrolizados por "peptidasas", en péptidos y aminoácidos. Se sabe relativamente poco acerca de éstas enzimas en comparación con las proteinasas de *lactococcus*. Algunas de ellas son activadas por metales como Mg, Co, Zn, Mn, y casi todas se inhiben con EDTA. Las principales peptidasas de *lactococcus* son exopeptidasas, las que catalizan la liberación de uno o dos aminoácidos, de el nitrógeno terminal de la cadena peptídica. La actividad de exopeptidasa en *lactococcus*, se ejemplifica por amino, di, tri, y tetrapeptidasas. Las endo-peptidasas pueden abrir grandes péptidos en el mismo enlace dentro del péptido distante del grupo carbonilo o amino terminal. A este respecto, una proteínasa puede ser considerada como una endopeptidasa (Tabla 7).

4.2.1.6 Aminopeptidasas. Exterkaste & van Veer (1983), aislaron la L-alfa-glutamil-aspartil-péptido hidrolasa de *L. cremoris HP*, la cual tiene un peso molecular de 130, 000; se inhibe con agentes quelantes e iones metálicos como Co y Hg. Se parece a la aminopeptidasa mamífera; es una metaloenzima. Geis et al., en 1986, aislaron la peptidasa asociada a la pared celular de *L. cremoris AC 1*, la cual preferentemente hidroliza a L-lisil-p-nitroanilidas, y tiene una temperatura óptima de 40°C y es irreversiblemente inactivada por EDTA. Esta aminopeptidasa tiene un rango extenso de especificidad e hidroliza grandes péptidos producidos por la "caseína-beta" debido a las proteinasas lactococales. La aminopeptidasa 95kDa de *L. cremoris Wg2* ha sido caracterizada y purificada hidrolizando un rango de sustratos incluyendo di, tri, tetra, y pentapéptidos así como oligopéptidos, pero no hidroliza dipéptidos conteniendo N-terminal-alanina o fenilalanina. Esta enzima tiene un pH óptimo de 7 a 40°C, y es inactivada por agentes quelantes. Una aminopeptidasa con peso molecular de 50 000 ha sido aislada de *L. cremoris AM2*, que a diferencia de otras aminopeptidasas no es metaloenzima. Kaminogawa (1979), encontró la aminopeptidasa de *L. cremoris nTR* capaz de hidrolizar aminoacil-para-nitroanilidas di, tri y tetrapéptidos. Estos autores clasificaron 11 cepas de *lactococcus* basándose en su actividad y rango de sustratos. *L. helveticus* posee una alta actividad como aminopeptidasa, comparada con otras variedades de *lactobacillus* (Vafopoulou, Alichanidis and Zerferidis, 1998).

TABLA 7. PEPTIDASAS PURIFICADAS DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS.

Peptidasa	Cepa	Peso mol.	Tipo
Aminopeptidasa general	<i>L. acidophilus</i>	38	metaló
	<i>L. cremoris</i>	36	metaló
	<i>L. lactis</i> 1183	78	metaló
	<i>L. cremoris</i> W'g2	95	metaló
	<i>L. lactis</i> 267		metaló
	<i>L. bulgaricus</i>		metaló
	<i>L. cremoris</i> AM 2	50	
Aminopeptidasa A	<i>L. cremoris</i> H1 P	43	metaló
x-prolil-dipeptidil-aminopeptidasa	<i>L. lactis</i>	90	serina
	<i>Staphilococcus thermophilus</i>	80	serina
	<i>L. cremoris</i> P8/2/47	90	serina
	<i>L. bulgaricus</i> 397		serina
	<i>L. lactis</i> 763	85	serina
	<i>L. helveticus</i> 32		
Peptidasa	<i>L. cremoris</i> H61		
Prolino-imino-peptidasa	<i>L. cremoris</i> HP	45	metaló
Dipeptidasa	<i>L. cremoris</i> H61		metaló
	<i>L. cremoris</i> W'g2	49	metaló
Tripeptidasa	<i>L. lactis</i> 261		metaló
	<i>L. cremoris</i> W'g2	52	metaló
Endopeptidasa	<i>L. cremoris</i> H61	98	metaló
	<i>L. cremoris</i> H61	40	metaló
Aril-peptidil-amidasa	<i>L. casei</i> 151		No determinado

Todas san inhibidas por EDTA.

FUENTE: Blom et al, 1996.

4.2.1.7 Dipeptidasas.

Hwang et al., en 1974 fueron los primeros en describir la purificación de una dipeptidasa capaz de hidrolizar L-Leu-Gli de *L. cremoris* H 61. La enzima tiene un peso de 100 000, un pH óptimo de 8.0 y estabilidad a 50°C, se inhibe con EDTA y Co. Presenta una especificidad por dipéptidos, excepto aquellos que tienen glicina o prolina en el N-terminal. Van Boven et al., (1995), purificaron una dipeptidasa de *L. cremoris* Wg 2 con peso molecular de 49 000 metaloenzima con pH óptimo de 8.0 a 50°C, inhibiéndose completamente con Co. Los autores sugieren que debido a lo extenso de su especificidad, se puede esperar que acelere la producción de aminoácidos durante la maduración del queso (Herian y Rizman, 1997).

4.2.1.8 Tripeptidasas.

Kolstad & Law (1981), describen que *L. lactis* y *L. cremoris* poseen actividad tripeptidásica, los cuales se activan contra Leu-Leu-Leu. También detectaron otra tripeptidasa, con un rango de hidrólisis para di, y otros tripéptidos. *L. cremoris* SK 11 rompe a Leu-Gli-Gli, pero no posee actividad aminopeptidásica. La tripeptidasa de *L. cremoris* Wg 2 presenta especificidad por tripéptidos, pero no aquellos que tienen prolina en la penúltima posición, su peso molecular es de 104 000 y se inhibe con EDTA y agentes reductores como ditioneitol y beta-mercaptoetanol, así como Cu. Se ha descubierto una tripeptidasa de *L. lactis* CNRZ 267 la cual se inhibe con EDTA, su peso molecular es de 75 000. De *L. cremoris* HP, se descubrió la tripeptidasa con 130 000 de peso molecular, metaloenzima, pH óptimo de 8.0 a 35°C, tiene preferencia por los tripéptidos que contienen prolina en su N-terminal (Fernández-García, y Ramos, 1992).

4.2.1.9 Endopeptidasas.

El término endopeptidasa se aplica a las enzimas que hidrolizan los enlaces interiores de los péptidos, pero no de proteínas. Yen et al., en 1973 identificaron dos de *L. cremoris* E8; la "LEP I" cuyo peso molecular de 98 000, con alta afinidad por Gli-Asp, y pH óptimo de 7.0 a 40°C; y la "LEP II", que tiene 80 000 de peso molecular e hidroliza enlaces que involucran grupos amino, de aminoácidos hidrófobos, su pH óptimo es de 6.0 a 37°C; ambas se inhiben con EDTA, son metaloenzimas, y participan en la degradación del primer péptido producido por la quimosina sobre la caseína "alfa-s1" (Mc Garry, Law and Fox, 1994).

4.2.1.10 Peptidasas "prolina-específicas".

Debido a que la caseína "beta" tiene alto contenido de prolina; la hidrólisis de sus péptidos ricos en este aminoácido puede ser únicamente realizada por

exopeptidasas prolina-específicas de las cuales se conocen cinco : "aminopeptidasa P", "prolino iminopeptidasa", "prolino iminodipeptidasa", "imidopeptidasa", y "dipeptidilaminopeptidasa"; todas han sido aisladas de *lactococcus*, aunque se conoce muy poco acerca de ellas. Por otro lado, se han identificado dos metal-independientes X-prolil-dipeptidil-aminopeptidasas de *L. cremoris* P8-2-47 y de *L. lactis* NCDO763, las dos se inhiben con EDTA, y su pH óptimo está en 7.0 a 45 - 55°C son dímeros con pesos moleculares idénticos (90 000). Se sabe únicamente que la primera de ellas hidroliza a el péptido "beta-casomorfina" compuesto por :Tir-Pro-Fen-Pro-Gli-Pro-Ile, Tir-Pro, Fen-Pro, Gli-Pro, e Ile (Serrano, Picon y Gaya, 1995).

4.2.1.11 Carboxipeptidasas.

Aún no hay reportes de actividad carboxipeptidásica en *lactococcus* (Rico, 2002).

4. 3 Sistemas proteolíticos de otros microorganismos (flora secundaria).

La *Propionibacterium shermanii* es un componente esencial de la micro flora del queso Suizo. Y también contribuye a la proteólisis. Parece razonable concluir que es primordialmente responsable de la formación de grandes cantidades de prolina, hidrolizando a las caseínas; posee en la pared celular, membrana y fracciones intracelulares una, dos, o tres y seis o siete peptidasas respectivamente. No se reportó actividad de aminopeptidasa, carboxipeptidasa, pro-dipeptidil-aminopeptidasa. *Brevibacterium linens* es el mayor componente de la flora superficial de los quesos untados madurados. Su rol preciso de en la maduración de los quesos no se conoce, pero ciertamente hace una contribución mayúscula, posee un sistema proteolítico activo especialmente con respecto a la actividad peptidásica. La actividad proteolítica del *B. linens* es más extracelular, y óptima a pH 7.2 a 38°C; se muestra mayor sobre caseínas que sobre las proteínas del suero. Hidroliza a la caseína "alfa-s1" más rápidamente que caseína "beta" su actividad no se afectó significativamente con iones metálicos o agentes reductores. Aparentemente las proteinasas intracelulares de *B. linens* no han sido aisladas. *B. linens* cataboliza activamente aminoácidos con la producción de aminas, ácidos volátiles, NH₃, y CO₂. Algunos de estos productos tienen una gran influencia en el sabor y aroma de los quesos madurados sobre la superficie (Anon, 1997).

Penicillium roqueforti y *Penicillium caseicolum*, ambos hongos poseen un muy potente sistema proteolítico. Los hongos secretan metalo-proteinasa ácida y neutra, algunas aminopeptidasas y carboxipeptidasas. El micelio también contiene proteinasas y peptidasas intracelulares que probablemente se liberan cuando los

hongos se rompen y mueren. Es aceptado que las proteinasas extracelulares de *Penicillium caseicolum* son responsables de la proteólisis, pero se ha demostrado que estas proteinasas se difunden solo a una pequeña distancia de la superficie; la proteólisis dentro del queso es debida al coagulante y a la contribución de la plasmina. Sin embargo se han identificado péptidos producidos por la acción de las proteinasas fúngicas en queso Camembert (El Soda, 1993).

4.4 Enzimas de los organismos no-iniciadores.

La población de los organismos no-iniciadores *pediococcus*, *micrococcus* y *lactobacillus* típicamente alcanza de 100,000 a 1'000,000 durante el añejamiento de muchos quesos. Es generalmente aceptado que en los quesos Cheddar y otros fabricados de leche cruda, maduran más rápido y desarrollan un sabor más intenso, que aquellos elaborados a partir de leche pasteurizada aunque su calidad puede ser variable. Esto sugiere que los microorganismos no-iniciadores juegan un papel en la maduración del queso, aunque en pocas ocasiones pueden causar efectos negativos. Por lo menos algunos de los problemas son causados por los lactobacilos heterofermentativos y los pediococos. El grado en el cual se enfría al queso después del prensado, es el principal factor que determina el crecimiento de los microorganismos no-iniciadores y con ello la calidad del futuro queso. El grado de enfriamiento varía de una factoría a otra, e incluso dentro de la misma especialmente si los blocks de queso son "paletizados" antes del enfriamiento (Fedrick, 1992).

Se reportó que *micrococcus*, crece durante las primeras etapas de la manufactura y del añejamiento. Aunque *lactobacillus* y *pediococcus* parecen ser más numerosos en el queso. Algunos *micrococcus* son proteolíticos; ellos producen proteinasas extracelulares e intracelulares y peptidasas. Desmazeaud & Hermier (1994), aislaron y caracterizaron una proteínasa extracelular de *Micrococcus caseolyticus*. García de Fernando & Fox (1996), aislaron dos proteinasas extracelulares de una cepa de *L. cremoris* en queso Azul elaborado de leche cruda de granja, ambas son óptimas a 45°C una a pH 8.5 y la otra a 9-11. Ambas se inactivan con EDTA. La proteínasa "I" actúa preferentemente sobre la caseína "beta" y la proteínasa "II", hidroliza caseína "beta" y caseína "alfa-s1" en igual proporción (Berry, 2002).

Nath & Ledford (1995) reportaron que la proteínasa extracelular de alguna cepa *micrococcus*, hidroliza preferentemente la caseína "alfa-s1", y también reportaron que la proteínasa intracelular de *micrococcus* hidroliza preferentemente a la caseína "beta". Todas las cepas estudiadas por Bhowmik & Marth (1993), poseen amino-peptidasas intracelulares, siendo Lis-p-Na su mejor sustrato; y también poseen actividad iminopeptídica y dipeptídica. Las peptidasas micrococales no han sido del todo bien aisladas y caracterizadas (Arenas, 1998).

En queso Cheddar, los pediococos son en algunos casos los organismos no-iniciadores predominantes. Hay poca información acerca de el significado de los *pediococci* en la calidad del queso. Robertson & Perry (1992), encontraron en algunos experimentos, que inoculando la leche de quesería con *pediococci* se mejoraba la calidad del queso Cheddar. Law et al., (1994) reportaron que cuando se usaron únicamente los *pediococci* como organismos no-iniciadores, ellos no tuvieron efecto en la calidad del queso; pero resultaron benéficos cuando se usaron como un componente de los no-iniciadores. Nuñez en 1995, reportó que *pediococcus* presentó un comportamiento proteolítico y lipolítico débil. Algunas cepas de *Pedococcus pentosaceus* fueron reportadas con actividad de aminopeptidasa y débil actividad de estearasa/lipasa, así como en glucosidasa. Bhowmik & Marth (1994), reportaron que *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* poseen actividad intracelular de aminopeptidasa, dipeptidasa, dipeptidilaminopeptidasa, y proteinasa; ésta última puede hidrolizar tanto caseína "beta" como caseína "alfa-1". Estos resultados sugieren que *pediococcus* probablemente contribuye en la proteólisis del queso Cheddar y en otros quesos. Ellos son capaces de reducir acetaldehído y propionaldehído a los correspondientes alcoholes y pueden producir pequeñas cantidades de diacetilo. Además de ser usado para acelerar la maduración del queso Cheddar bajo en grasa (Madrid, 1999).

4.5 Catabolismo de los aminoácidos.

Los principales productos que pueden obtenerse del catabolismo de los aminoácidos son (1) aminos resultado de la descarboxilación, (2) amonio, ácidos cetoácidos, carbonilos, alcoholes, resultado de la desaminación, (3) otros aminoácidos resultado de transaminaciones, (4) H₂S, (CH₃)₂S, metanetiól, tiésteres, y otros compuestos azufrados resultado de desulfuración y demetilación. Muchos de estos compuestos son importantes en el sabor del queso (Figura 2).

El catabolismo de los aminoácidos lo realizan las enzimas microbianas; como se describió anteriormente, las proteinasas lactococales, inician la degradación de la caseína a polipéptidos, los cuales son más adelante hidrolizados por peptidasas produciendo péptidos y aminoácidos, estos a su vez son necesarios para la nutrición celular. Las enzimas aminoácido-convertidoras se originan en los sistemas extracelulares de los microorganismos iniciadores (Visser, 1997).

Se han encontrado casos muy raros y escasos en quesos en donde los aminoácidos se convierten en aldehídos; a esta reacción se le conoce como degradación de "Strecker". En queso Cheddar se han determinado aldehídos como

metional (reducido de la metionina), fenilacetaldehído y fenetanol (de fenilalanina), para-cresol y fenol (de tirosina), 3-metil-butanal (de leucina), 2-metil-butanal (de isoleucina), y 2-metil-pentanal (de valina). Todos estos excepto el fenol, tienen sabores distintivos y limpios; fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina, y valina, participan en los enlaces peptídicos hidrolizados por la quimosina durante los tiempos tempranos de la maduración y desde aquí presentan accesibilidad para ser liberados por las aminopeptidasas bacterianas. Los principales contribuyentes al aroma del queso son los compuestos que contienen carbonilo y sulfuro; en el caso del queso Cheddar, el mayor contribuyente es el metanetiol, que procede de la metionina vía degradación de "Strecker"; hay otros compuestos importantes como el metanol, H₂S, y la 2-pentanona que también contribuyen en su aroma característico (El Soda, 1993).

Debido a estos cambios, la estructura del queso aún joven, cambia en la cuajada de fresca y chiclosa a suave, lisa y homogénea, propia de un queso maduro (Santos, 1994).

4.5.1 Papel de la fosfatasa ácida en la maduración del queso.

Las fosfatasas son enzimas que hidrolizan el enlace C-O-P de varios fosfatos, y ésteres fosfóricos. Ellas se clasifican en "ácidas" y "alcalinas", según el efecto que causa el pH en su actividad. Aunque ambas están presentes en el queso, la primera es más activa debido al pH relativamente bajo de éste, cerca de 5.2. Durante el añejamiento, las caseínas son "abiertas" por la renina, plasmina y proteinasas bacterianas hacia péptidos ricos en fósforo. Los residuos de fósforo ejercen un efecto protector contra las posibles hidrólisis posteriores de los péptidos. La degradación completa de la caseína durante la maduración puede ser ejecutada sólo por la acción combinada de proteinasas y fosfatasas. Por esto las fosfatasas pueden jugar un papel importante en el añejamiento y el desarrollo del sabor. En todo caso, la actividad de la fosfatasa ácida en queso es probablemente el último y mejor estudio realizado en los eventos hidrolíticos que tienen lugar durante la maduración del queso, y su significado es poderosamente supuesto. El nivel de fosfatasa ácida en queso permanece constante durante el añejamiento. La fosfatasa alcalina se inactiva por la pasteurización a 60°C, por 30 min o 72°C por 15 seg (Mc Sweeney and Fox, 1994).

El origen de las fosfatasas ácidas en queso es controversial. La enzima es una fosfomonoestearasa, y puede ser derivada de un variado número de fuentes. La leche bovina así como la de otras especies, contiene fosfatasa ácida termoestable, la cual no es inactivada por la pasteurización; el 95 % de su actividad sobrevive calentando a 75°C durante 3 min. Otras posibles fuentes de la enzima son las

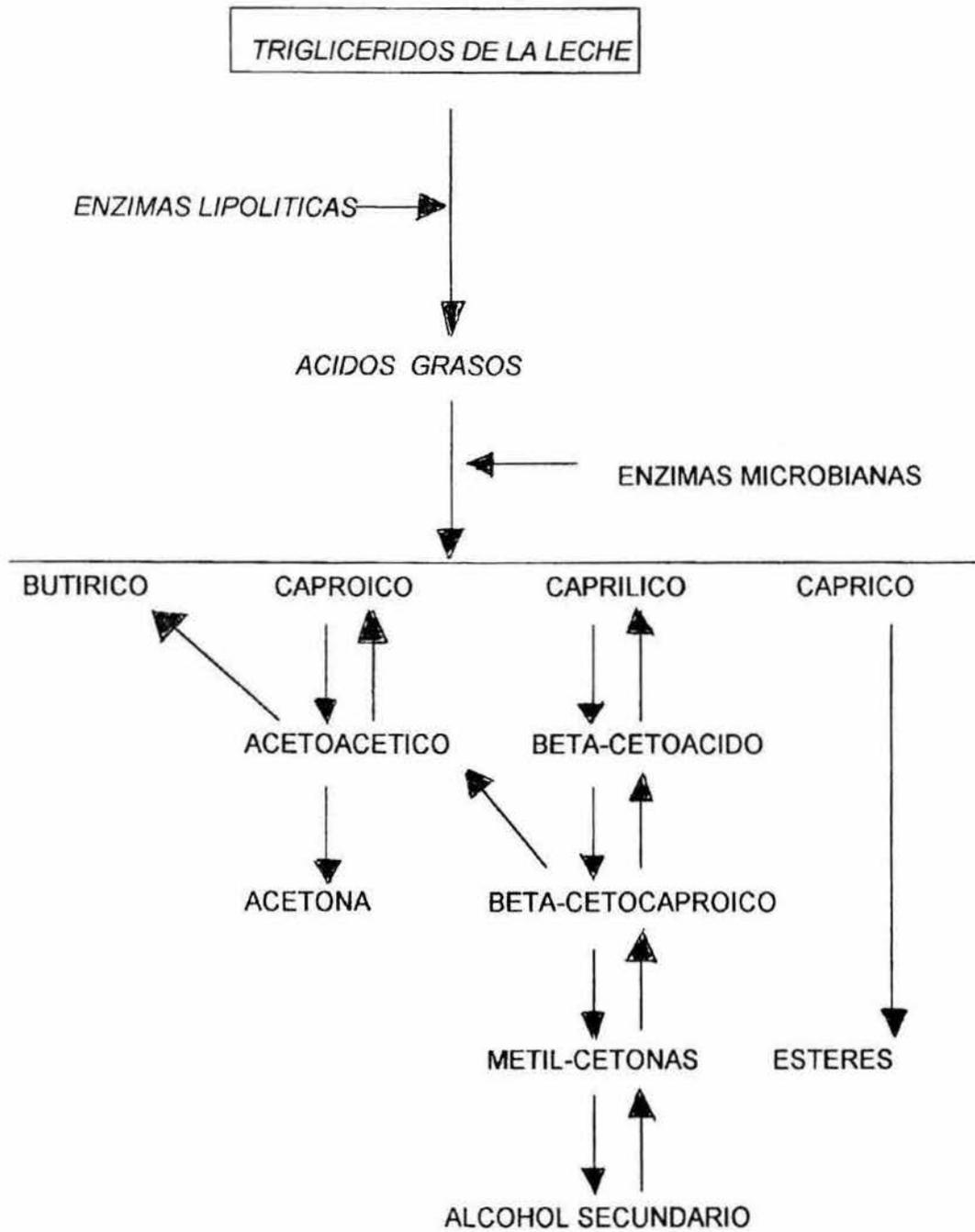
bacterias iniciadoras, Andrews & Alichandis (1999), sugieren que del 20 al 25% de su actividad procede de ellas, y Dulley & Kitchen (1997) del 50 al 60%; como ejemplo está el *L. cremoris* y también la flora secundaria (hongos y levaduras). La localización de estas enzimas en los *lactococci* no ha sido reportada, pero parece estar ligada a la membrana celular. Su peso molecular es alto; consiste en un glicopéptido conteniendo dos residuos de galactosa, dos de manosa y cuatro de N-acetil-ácido-muramínico por molécula. La enzima lactococcal, es muy activa sobre fosfoproteínas, se amarra fuertemente a las micelas caseínicas, pero no desfosforila en grado significativo a las caseínas; pero puede ser más activa en pequeños fosfopéptidos producidos a partir de la caseína. Su actividad óptima se encuentra en pH 5.2; En el caso de las fosfatasa ácidas fúngicas, el *Penicillium roqueforti* posee una enzima muy activa 7.3 veces más que *L. cremoris*; su pH óptimo está en 4.25; y presenta estabilidad térmica. Los quesos añejados con hongos presentan niveles más altos de fosfatasa ácida que los quesos madurados con bacterias. Esto sugiere que en el caso de los quesos añejados con hongos, la enzima microbiana, juega un gran papel en la desfosforilación de la caseína. Aunque el grado de desfosforilación en los quesos madurados con hongos no ha sido reportado (Tórrez, 2001).

4.6 Lipólisis.

En muchas variedades de queso ocurre relativamente poca lipólisis durante el añejamiento. La hidrólisis de la materia grasa tiene un papel en la formación del aroma; por el contrario no provoca modificaciones notables en la estructura del queso (Figura 3).

La leche contiene una potente lipoproteína lipasa la cual normalmente nunca alcanza su potencial. Esta lipasa ha sido aislada y bien caracterizada. Los quesos no madurados, normalmente muestran un bajo contenido de ácidos grasos. En el queso elaborado con leche pasteurizada, este valor se incrementa ligeramente durante el añejamiento porque la lipasa propia de la leche ha sido casi totalmente inactivada y las bacterias ácido lácticas poseen muy poca actividad lipolítica. Esta es la razón por la cual se agregan polvos enzimáticos a la leche en ciertas variedades queseras. Un ligero incremento en la lipólisis por la acción de las lipasas termoresistentes originarias de las bacterias psicotrópicas que crecen en la leche cruda fácilmente causan sabores desagradables. Por otra parte, los quesos elaborados con leche cruda muestran un fuerte incremento de ácidos grasos durante su maduración como Fontina, Ras y Kopanisti, y ello no significa que presenten sabores desagradables. Estos ácidos grasos probablemente contribuyen a el "deseado" sabor picante de ciertas variedades (El Soda, 1993).

Figura 3. La lipólisis durante la maduración del queso



FUENTE : Hefnawy, 1996.

La lipasa de la leche es altamente selectiva por los ácidos grasos en la posición Sn3; ya que mucho del ácido butírico en la grasa láctea es esterificado en la posición Sn3; esta especificidad explica probablemente la concentración desproporcionada de ácido butírico libre en el queso. Lipasas y esterasas cuyo nombre sistemático es "triacil-glicerol-acil-hidrolasas" (E.C. 3.1.1.3), son enzimas que hidrolizan tri, di, y monoglicéridos presentes en la interfase aceite-agua de la leche dando sabores deseados en los productos lácteos. Las lipasas presentan muy alta actividad frente a los triglicéridos, media actividad sobre los diglicéridos y virtualmente sin actividad frente a los monoglicéridos. La hidrólisis de un triglicérido por lipasa, producirá ácidos grasos, además de mono y diglicéridos. El grado de lipólisis varía según el queso; así como la composición de los ácidos grasos generados (Tabla 8).

Probablemente los de mayor importancia son el ácido butírico y el ácido caprónico (Godfrey and West, 1996).

Es preciso aclarar, que no todos los ácidos grasos volátiles se generan vía lipólisis; la proteólisis, puede generar ácidos grasos volátiles ramificados, como el isobutírico, el isovalérico, y el isocaprónico (Santos, 1994).

La diferencia principal entre lipasas y esterasas, es la manera en que ellas actúan sobre el sustrato en solución o en emulsión; se asocia a las esterasas con una relativamente alta actividad en sustratos en solución, y las lipasas exhiben proporcionalmente una actividad más alta en sustratos en emulsión. No se ha manifestado nunca una clara diferenciación entre lipasas y esterasas. En 1945, siguiendo la decisión de la FDA, en E.U.A. se prohibió la importación de pasta de renina tradicional de Italia; Merle Farnham, fundador de los laboratorios "Dairyland Food" ahora subsidiaria de "SBI", comenzó los experimentos hasta descubrir la fuente original de la estearasa productora de sabor, o del sistema lipasa. En 1946, él definió el lugar exacto de la región de la secreción en la base de la lengua de las terneras. Farnham también aisló esterasas de las correspondientes regiones de corderos y cabras. Las esterasas gástricas frente a las esterasas pregástricas, encontradas en la pasta tradicional de renina no han sido bien caracterizadas y resultan con inconsistencias en los productos finales. "SBI" es hoy el mayor abastecedor de polvos lipolíticos para la industria quesera Italiana, y se considera que la venta mundial de enzima lipasa representa el 3% del volumen total (Dairy Export Council, 2002).

Van den Berg, reportó que la mayoría de los países respondiendo a la "Federación internacional de lácteos " según la clave 2192 / B de 1992, consideran a las lipasas

TABLA 8 . CONCENTRACIONES TIPICAS DE ACIDOS GRASOS LIBRES EN QUESOS MADUROS .

VARIEDAD	ACIDOS GRASOS mg/Kg
Sapsago	211
Edam	356
Mozzarella	363
Colby	550
Camembert	681
Port Salut	700
Monterrey Jack	736
Cheddar	1028
Gruyere	1481
Gjetost	1658
Provolone	2118
Brick	2150
Limburger	4187
Parmesano	4993
Romano	6754
Azul	32230
Roqueforti	32453

FUENTE : Goldstein and Wingard, 1997.

como permitidas en la manufactura quesera. Cerca de la mitad de estos países, las usan en forma general; en otros, es sólo legal para un número restringido de variedades de queso (Tabla 9).

4.6.1 Lipasas de origen animal.

Las lipasas de origen animal son permitidas en muchos países, más que las lipasas de origen microbiano. En algunas naciones se permiten ambas; hay aún países donde la aplicación de lipasas es permitida pero, ellas no se usan en realidad. En la gran parte de los países donde son utilizadas para quesería, no se tiene que notificar su uso en el empaque (Tabla 10).

Las lipasas animales son preparaciones enzimáticas que se derivan de los tejidos pancreáticos animales bovinos y porcinos, llamadas "pancreatinas"; y tejidos pregástricos de terneras, corderos y cabras. Las pancreatinas no se usan comúnmente en quesería. Se han propuesto numerosas aplicaciones, la más importante comercialmente, se encuentra como ayuda digestiva; debido a su alto costo son reemplazadas por lipasas microbianas. Son empleadas también para mejorar el sabor de tipos especiales de queso. No se aplican en detergentes, aunque se ha hecho bastante investigación en este campo e inclusive existen patentes (Izco, Torre y Barcinia, 1999).

Los polvos lipolíticos animales se producen en forma edibible y son estandarizados antes de su empaque para así garantizar consistentemente su fuerza, uniformidad y pureza. "Abren" además de triglicéridos, aceites, grasas, ésteres de ácidos grasos y también ésteres arílicos. Debido a que las lipasas pancreáticas actúan solamente en la interfase entre los glóbulos grasos y la fase acuosa, el grado de reacción depende del grado de emulsificación, tamaño del glóbulo y estabilidad. La goma arábiga, polivinil-alcohol, o deoxicolato de sodio, promueven la emulsificación. Los iones Ca influyen ambas enzima y estabilidad, la cual es también dependiente de la cantidad de NaCl, cuya concentración óptima es de 0.5g/L. Estas lipasas animales catalizan preferentemente la hidrólisis de ácidos grasos con más de 12 átomos de carbono, y predominantemente en la posición C-1 del glicerol. El grado de reacción, disminuye considerablemente en el orden del substrato, tri, di y monoglicéridos. La fosfolipasa de páncreas porcino, es la única enzima usada a nivel industrial llamada "fosfolipasa A", y sirve para la transformación de lecitinas en lisolecitinas (Gerhartz, 1992).

4.6.2 Lipasas pregástricas.

Ramsey et al.,(1982) determinaron que con más de 10 mg de tejido obtenido de la región cercana o de la base de la lengua de cordero, cabra y ternera se produce

TABLA 9. PAISES EN DONDE SE PERMITEN LAS LIPASAS EN QUESERIA.

PAISES QUE PERMITEN
LIPASAS ANIMALES.

Australia
Dinamarca
España
Gran Bretaña
Grecia
Hungria
Italia
Japón
Holanda
Nueva zelanda
E.U.A.
Sud Africa

PAISES QUE PERMITEN
LIPASAS MICROBIANAS.

España
Japón
Rusia
E.U.A.
Sud Africa

PAISES SI
ESPECIFICAN
LA FUENTE

Bélgica
Finlandia

FUENTE : Herlan y Rizman, 1997 .

TABLA 10 . LAS FUENTES DE LIPASAS.

CATEGORIA	FUENTE	NOMBRE	COMENTARIO
Animal	Temera	Italasa C	1
	Cabra	Capalasa K	1
	Oveja	Capalasa L	1
	Higado de cerdo		1
Microbiana	<i>Aspergillus niger</i>	Palatasa A	1
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Palatasa M	1
	<i>Candida lipilitica</i>	Lipasa L	2
	<i>Candida rugosa</i>	Lipasa XX	2
	<i>Geotrichum candidum</i>	Lipasa GC	2
	<i>Humicola lanuginosa</i>	Lipasa CE	2
	<i>Mucor javanicus</i>	Lipasa M	2
	<i>Penicillium camembertii</i>	Lipasa GC	2
	<i>Penicillium roqueforti</i>	Lipasa R	2
	<i>Pseudomonas spp.</i>	Lipasa AK	2
	<i>Rhizopus arrhizum</i>	Lipasa S	2
	<i>Rhizopus delamar</i>	Lipasa D	2
	<i>Rhizopus niveus</i>	Lipasa N	2
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipasa F	2

1. Usada en la manufactura de queso.

2. Comercialmente disponible pero no es usada en la industria láctea .

FUENTE : Moskowitz and Noelck, 1995 .

suficiente estearasa pregástrica para inducir una rápida lipólisis en varias leches exceptuando la de búfala. Estas enzimas catalizan preferentemente la hidrólisis de ácidos grasos de cadena corta C4 - C10 y son usadas en la producción de quesos especialmente saborizados. El sabor exacto, picante, seguido por la degradación de la grasa láctea debido a la lipasa, ha sido siempre esencial, y característico en los quesos Pecorino, Romano y Provolone; la pasta de renina, ha sido desde siempre la fuente aceptada de lipasa. Los análisis reportados por Harper en 1957 han mostrado, que las lipasas pregástricas proporcionan un perfil de ácidos grasos casi idéntico al de la pasta de renina y por ello, muchos queseros ahora usan lipasa en polvo y un coagulante lácteo en vista de la pobre calidad microbiológica de la pasta tradicional de renina. Un extracto de renina de buena calidad, no contiene actividad de lipasa (Blom et al., 1996).

En contraste, la pasta de renina usada en la manufactura de algunos quesos italianos, contiene una potente lipasa llamada "estearasa pregástrica", que es usada en algunos países en forma purificada. La "estearasa pregástrica", muestra alta especificidad por los ácidos grasos de cadena corta esterificados en la posición SN3. Ya que los ácidos grasos de cadena corta en la leche están colocados predominantemente en la posición SN3, la acción de la "estearasa pregástrica" resulta, en liberar altas concentraciones de ácidos de cadenas cortas y medias, que son los responsables del sabor picante y característico de los quesos italianos. Existe "estearasa pregástrica" obtenida de ternera, cabra y oveja disponible comercialmente. Aunque estas enzimas son similares, muestran diferencias sutiles en cuanto a especificidad, lo cual facilita la manufactura de los quesos italianos con diferentes perfiles de sabor; muchas otras lipasas, son no-satisfactorias para la manufactura de este tipo de quesos debido a su incorrecta especificidad. Es ampliamente reconocido que la adición de "estearasa pregástrica" de 10 a 15 g por 100 L de leche en quesos como Cheddar, Feta, Domiati, Ras, Mozzarella, Parmesano, Samsó, Romano, Azul y probablemente otras variedades, mejora su calidad (Exterkate, 1994).

4.6.3 Lipasas microbianas.

Las lipasas microbianas se obtienen por fermentación y su proceso de fabricación depende ampliamente del tipo de lipasa producida. Las preparaciones comerciales son mezclas de lipasas y estearasas. Las lipasas microbianas no sólo hidrolizan grasas, también las sintetizan, además se han encontrado nuevas aplicaciones como son : transesterificación, hidrólisis estereoespecífica de ésteres racémicos, y su empleo en detergentes. El tamaño de la cadena del ácido graso y su posición en la molécula de glicerol, afectan significativamente la especificidad de éstas enzimas (Fox, 1993).

Sahani (1995), enlistó un número de lipasas microbianas incluyendo especies de levaduras como *Candida* y *Torulopsis*, hongos como *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotricum*, *Mucor*, *Pseudomonas*, e inclusive *Achromobacter* y *Staphylococcus*. Solamente unas cuantas de estas lipasas tienen aplicación en quesería a escala comercial (Golstein and Wingard, 1997).

Las lipasas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* presentan especificidad hacia las cadenas largas y cortas respectivamente; sus pesos moleculares son de 20 000 y 25 000, su pH óptimo es de 4.5 y 6.5; también actúan sobre aceite de coco, aceite de linaza, aceite de oliva con rendimientos de 48% y 93%. Además estas lipasas son usadas para acelerar la maduración del queso (Law, 1997).

La lipasa de *Mucor miehei*, es buen catalizador para la transesterificación en la posición 1,3 del gliceról. Los tipos enzimáticos diferentes son específicos para cadenas cortas o largas de ácidos grasos (Law and Fox, 1995).

La lipasa de *Candida cylindracea* tiene un peso molecular de 120 000, su punto isoeléctrico se encuentra a pH 4.2 y su actividad óptima a pH entre 5.2 y 7.2; hidroliza el aceite de oliva de 95 a 97% (Madrid, 1996).

Diferentes cepas de *Rhizopus*, son usadas para la producción enzimática, tales como *R. arrhizus*, *R. niveus*, o *R. delamar*. Los datos que se tienen pertenecen a *R. arrhizus*, su peso molecular es de 43 000, su punto isoeléctrico a pH 6.3, es un glicopéptido con 13% a 14% de manosa por molécula. Las lipasas de *Rhizopus*, presentan una 1-3 regio-especificidad; su pH óptimo 5.0 a 7.0 a una temperatura de 30-45°C (Santos, 1994).

Lipasa de *Pseudomona*, tiene un peso molecular de 29 000, y su punto isoeléctrico a pH 5.8; la enzima es activa y estable a pH alcalino, y por ello, se usa en detergentes. Y para este mismo propósito, ha sido recomendada la lipasa de *Humicola languinosa* (Jamieson y Jobber, 1994).

Las bacterias lácticas tanto *Lactococcus* como *Lactobacillus*, tienen una baja actividad lipolítica y estearásica, pero cuantificable. Hay un pequeño trabajo de aislamiento y caracterización de lipasas de extracto libre de células de *L. Lactis* y *L. cremoris* óptimamente activas a pH de 7 a 8.5 a 37°C, inhibidas por altas concentraciones de NaCl. Oterhoim et al., en 1991 purificaron parcialmente una acetil-ester-hidrolasa del extracto libre de células de *L. plantarum* cuya actividad óptima se encuentra en pH 6.7 a 40°C. La enzima muestra una preferencia por

los sustratos en solución más bien que en emulsión, y es por esto considerada como estearasa en lugar de lipasa. No reportó actividad en cadenas largas de esteres o triglicéridos. Se inhibe por agentes SH-bloqueadores (Moskowitz and Noelk, 1995).

Se estudió la producción de lipasas/estearasas de *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus*. Todas presentaron actividad en los derivados p-fenólicos de los ácidos grasos con más de 5 carbonos a una temperatura de entre 40 a 45°C. Piatkiewicz en 1989, reportó que *L. lactis*, *L. lactis subsp. diacetylactis* y *L. casei* producen ambas lipasas y estearasas. La actividad de estearasa es mayor que la actividad de lipasa en todas las cepas. Los *lactococci* producen una actividad de lipasa más alta que los *lactobacillus*. Estas enzimas fueron asociadas principalmente con la membrana celular (Huitrón, 1993).

L. casei subsp. pseudopantarum LE 2 parece poseer un potente sistema lipasa/esterarasa el cual fue aislado y caracterizado por Lee & Lee en 1992, cuya actividad óptima sobre los derivados de p-nitrofenilo de ácidos grasos se ubicó en pH 7.5 a 37°C. Khalid et al., en 1993 mostraron que *Lactobacillus helveticus* y *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* contienen dos estearasas intracelulares, capaces de hidrolizar los alfa y beta-naftil-ésteres; las estearasas no han sido caracterizadas (Visser, 1997).

Lawrence et al., en 1990 purificaron de *Micrococcus freudenreichii* una lipasa, cuya actividad decreció en 20% a 100°C durante 5 min. Siendo activa sobre cadenas largas y cortas de triglicéridos y ésteres, fuertemente inhibida por Zn, Hg, y organofosforados. Bhowmik & Marth en 1985, estudiaron el perfil de estearasa de *Micrococcus ssp.*, la enzima fue activada óptimamente a pH 8 a 40°C, fuertemente inhibida por NaF y NaCl a pH 5.0 (El Soda, 1993).

Los *Pediococci pentosaceus* (miembros de los organismos no-iniciadores), poseen actividad lipolítica/esterarásica. Sin embargo, los *Pediococci acidilactici* no. Las lipasas de *Propionibacterium shermanii* y *Brevibacterium linens*, fueron descritas brevemente por Sorhaug & Ordal en 1992 (Tucker y Woods, 1995).

Los quesos añejados con hongos, especialmente los Azules, presentan niveles muy altos de lipólisis en todas sus variedades; arriba del 25% del total de sus ácidos grasos pueden ser liberados en algunos casos; aunque el impacto de los ácidos grasos en el sabor de estos quesos es menor que en los quesos duros italianos, posiblemente debido a la neutralización en la elevación de el pH durante

el alejamiento y también debido al dominio de las metil-cetonas en el sabor del queso Azul. La lipólisis en los quesos añejados con hongos es debida principalmente a *Penicillium roqueforti* o *Penicillium camemberti*, ambas secretan lipasas extracelulares muy activas. Estas lipasas han sido aisladas y muy bien caracterizadas. El *P. camemberti* parece excretar sólo una lipasa con pH óptimo de 9.0 a 35°C; el *P. roqueforti* excreta dos lipasas, una con un pH óptimo de entre 7.5 y 8.0 o tal vez 9.0 a 9.5 y la otra pH de 6.0 a 6.5; las lipasas tanto ácida como alcalina, presentan diferentes especificidades (Fox, 1993).

Las lipasas actúan "abriendo" la grasa en ácidos grasos y monoglicéridos o glicerol. Cuando los ácidos grasos están enlazados al glicerol en un triglicérido, no hay sabor, y solamente después de la acción de la lipasa se libera éste. Los productos lácteos de origen bovino, presentan un mejor sabor que aquellos que contienen grasas de otro origen, porque la leche de vaca es naturalmente más alta en grasa conteniendo ácido butírico de cadena corta. En general, los ácidos grasos libres poseen sabor; los de cadena corta lo presentan más volátil que los de cadena larga (Tabla 11).

Las lipasas no son estables y el continuo desarrollo del sabor en queso disminuye con el tiempo. Los investigadores no han podido correlacionar el contenido de los ácidos grasos en varios tipos de queso, y el tipo de lipasa usada. En gran medida debido a la complejidad del sustrato y a los otros componentes del sabor, además de los ácidos grasos (Centeno y Alvares, 1994).

4.7 Catabolismo de los ácidos grasos.

El sabor y aroma del queso Azul, es dominado por las metil-cetonas, "2-heptanona" y "2-nonanona". El mecanismo de formación de las metil-cetonas, es vía "beta"-oxidación de ácidos grasos. La concentración de metil-cetonas es proporcional al nivel de lipólisis. Las esporas así como el micelio son capaces de oxidar ácidos grasos a metil-cetonas; los quesos Azules también contienen concentraciones considerables de alcoholes secundarios especialmente 2-pentanol, 2-heptanol, 2-nonanol, que se producen por la reducción de las metil-cetonas vía *P. roqueforti* (Figura 3).

En el queso Cheddar se han identificado más de 180 compuestos que componen su sabor, entre ellos ácidos grasos, metanetiól, dimetil sulfito, diacetilo, butanona, 2-pentanona, ácido láctico, ácido acético, metanol, lactonas, además de los productos obtenidos vía proteólisis (Pérez, Islasel Río, 1999).

TABLA 11. ACIDOS GRASOS LIBRES EN QUESO MADURO.

ACIDO GRASO	TIPOS DE QUESO.		AZUL	CHEDDAR
	FETA	ROQUEFORT		
	microgramos de ácidos / gramos de queso.			
Acético C2	521	N.D.	N.D.	500
Propiónico C3	167	N.D.	N.D.	T
Butírico C4	651	992	1146	111
Caprónico C6	37	751	777	33
Caprílico C8	73	715	546	38
Caprírico C 10	301	2104	1275	67

N.D. = No determinado T = trazas .

FUENTE : Hefnawy , 1996 .

4.7.1 Hidroxiácidos y lactonas ácido graso.

Las lactonas son ésteres cíclicos resultantes de la esterificación intramolecular de un hidroxiácido, a través de la pérdida de agua de la estructura anillar. Las "alfa" y "beta" lactonas son altamente reactivas y acostumbran ser intermediarios en la síntesis orgánica. Las "gama" y "delta" lactonas son estables y se han identificado en queso. Como grupo las lactonas poseen aromas fuertes, por ejemplo "frutal" y como a "durazno". Sin embargo ellas pueden ser importantes componentes en el sabor del queso. Se ha identificado una amplia gama de lactonas tanto en quesos como en otros productos lácteos. Holding & Taylor (1995), demostraron la formación de "delta" lactonas a partir de "delta" hidroxiácidos en la grasa de leche en presencia de agua. Los "gama" y "delta" hidroxiácidos o sus correspondientes lactonas, no han sido encontrados en los vegetales usados como alimento para rumiantes; por esto los hidroxiácidos, son resultado del metabolismo animal (Neelakantan, Mohanty and Kaushik, 1999).

No obstante la ausencia de enzimas capaces de reducir los "gama" y "delta" cetoácidos en la glándula mamaria, sugiere que estos compuestos no son precursores de "gama" y "delta" hidroxiácidos. Tuynenburg et al., en 1988 demostraron la posibilidad de producir "gama" y "delta" lactonas vía reducción de cetoácidos a hidroxiácidos por levaduras como *Clostridium spp.* y *Saccharomyces spp.*, algunos hongos incluyendo *Penicillium spp.*, y también por bacterias como *Sarcina lutea*. Wong et al., en 1992, encontraron en queso Cheddar rancio una incrementada desproporción de lactonas con cadenas largas (C14 - C16), comparadas con las otras lactonas. Se propusieron dos mecanismos de formación; el primero, involucra la reducción de los correspondientes ceto-ácidos, pero las investigaciones lo desaprobaron. El otro posible método, involucra el metabolismo microbiano del ácido homocionoléico en hidroxiácidos y lactonas de cadenas cortas. Las "delta" lactonas presentan un umbral muy bajo de sabor. Y varios autores han mencionado, la posibilidad de que las lactonas contribuyan al sabor del queso. Jolly & Kosikowski (1995), encontraron que la concentración de lactonas en queso Azul, fue más alta que en queso Cheddar, y concluyeron que la lipólisis exhaustiva del queso Azul, influencia la formación de lactonas; las principales encontradas en ambos quesos fueron "delta" 14 lactona y "delta" 16 lactona. O'Keeffe et al., en 1994 identificaron "gama" 12, 14, 16, y "delta" 10, 12, 14, 15, 16 y 18 lactonas en queso Cheddar. La presencia de estas "gama" 12, 16 y "delta" 10, 12, 14 lactonas en queso Cheddar, fue confirmada por Wong et al., (1996) quienes correlacionaron el número y la concentración de lactonas con la edad y sabor, sugiriendo que ciertas lactonas son significativas en el sabor del queso Cheddar (Walstra et al., 2001).

CAPÍTULO V. Queso Cheddar con maduración enzimática acelerada. La maduración del queso es un proceso complicado de cambios bioquímicos concertados, durante el cual, la cuajada blanda se convierte en un queso maduro presentando sabor, textura y aroma característicos de cada variedad. El añejamiento es un proceso lento y consecuentemente caro, que no es completamente predecible o controlable; por ello existen incentivos económicos, y posiblemente tecnológicos para acelerarlo. Además de ser costoso, se lleva a cabo durante largos períodos de tiempo, dependiendo de la variedad; típicamente el queso Cheddar es madurado durante 9 a 12 meses, y otros como el Parmesano usualmente 2 años. A causa del costo de añejamiento, hay obvias ventajas económicas que se aprovechan cuando se acelera este proceso. El costo de maduración del queso depende de muchos factores, pero se ha estimado que en la región Australiana cuesta 40 dólares por tonelada por mes. En Inglaterra es igual a 1 libra esterlina por tonelada diaria (Climme y Buchheim, 2001).

En México el costo de almacenamiento en cámara fría por tonelada es de \$450.00mn/mes más el 15% de I.V.A. (Fríalsa, 2004).

Después de que el queso permanece "guardado" 9 o 12 meses, resulta obvio que el mayor contribuyente en el valor final, es el costo del añejamiento. Es asimismo importante subrayar, que para satisfacer la creciente demanda por el queso, también se hace indispensable reducir el tiempo que este pasa en las cavas de maduración, sin detrimento en sus características. Hay otras razones además de las anteriores, para acelerar la maduración del queso :

- 1) se incrementa el margen de ganancia de los fabricantes.
- 2) aumenta la calidad en cuanto a sabor y aroma.
- 3) compensa los cambios de sabor implícitos por la introducción de nuevas tecnologías.
- 4) incrementa el rango de productos/sabores para el consumidor.

El objetivo de la aceleración de la maduración, debe ser acelerar todas las reacciones deseables involucradas en ella en una forma balanceada, controlando las no deseadas (Bourges, 1998).

Ya que las reacciones durante la glicólisis ocurren muy rápido, y debido a que la modificación del lactato en muchos quesos se considera de menor importancia, no hay necesidad de acelerar este proceso. Se reportó la pre-hidrólisis de lactosa por

"beta"-galactosidasa en leche, obteniéndose sólo un incremento marginal en la calidad del queso Cheddar, debido a que la mayor parte de la enzima agregada se perdió en el suero, lo cual únicamente incrementó su costo (Hefnawy, 1996).

La lipólisis no es tan importante, es de hecho indeseable para algunos quesos, por esto, los intentos por acelerar la maduración se han concentrado en la proteólisis. Tanto la industria como la academia están interesadas en la aceleración de la maduración. El grupo de trabajo F16 fue establecido en 1978 por la "Federación Láctea Internacional", determinó que los métodos de aceleración de la maduración son :

- a) elevación de la temperatura de añejamiento
 - b) incremento en el número de células viables por varios métodos
 - c) modificación de los microorganismos-iniciadores
 - d) "slurries" (pastas semi-sólidas)
 - e) adición de enzimas exógenas
- (Scott, 2000).

5.1 Elevación de la temperatura de maduración.

Tradicionalmente, el queso fue añejado en cavas probablemente a 15 – 20°C hasta por un año; con el empleo de la refrigeración se ha convertido en práctica normal el uso de bajas temperaturas de maduración, en las factorías modernas por ejemplo, el queso Cheddar y las variedades Holandesas se maduran de 6 a 8°C. Elevar la temperatura ofrece la alternativa más simple para acelerar la maduración; no se involucran costos adicionales, y se puede ahorrar, ya que los costos de refrigeración son reducidos. No hay barreras legales. Debido a que durante el añejamiento con altas temperaturas todas las reacciones que ocurren se aceleran, es posible que se puedan obtener sabores indeseables en el producto final. Basado en los resultados del estudio sobre la influencia de el tipo de microorganismo iniciador, nivel de bacterias no-iniciadoras y la temperatura de maduración (6 a 13°C), Law and Fox en 1995, concluyeron que el factor individual más importante que determina la intensidad del sabor del queso es la temperatura de añejamiento, independientemente del tipo de organismo iniciador empleado, y del nivel de microorganismo no-iniciador. El tiempo requerido para alcanzar la madurez fue por lo menos 50% menor a 13°C, que a 6°C. Se encontró que la amargura es más marcada a la temperatura de maduración más baja, posiblemente debido a la menor intensidad de sabor del queso Cheddar, o tal vez, porque las péptidasas necesarias para hidrolizar los péptidos amargos requieren temperaturas más altas para adecuar su actividad y así evitar la amargura (Law and Fox, 1995).

La maduración también puede ser acelerada sin efectos adversos por el incremento en la temperatura arriba de 20°C. Este método es eficaz en el control de los stocks de queso o si el período inicial a bajas temperaturas fue necesario por razones de calidad. Se recomienda no elevar la temperatura más de 15°C, para acelerar la maduración, y que el queso sobre el que se efectúa este proceso deba tener buena calidad fisicoquímica y microbiológica, de acuerdo a la especificación (Tabla 12).

Una gran población de microorganismos no-iniciadores, representa el riesgo de sabores no deseados en los quesos con temperatura de añejamiento elevada; durante el prensado deberá contener menos de 10,000 UFC/g y no debe exceder los 10, 000, 000 UFC/g a los 14 días; éstos pueden ser controlados por enfriamiento a 10°C. Por tanto, se acepta en general que la maduración del Cheddar y, presumiblemente de otros quesos semi-duros, puede ser acelerada con el uso de temperaturas de 13 a 15°C, siempre y cuando se trate de productos de buena calidad. El éxito del uso de temperaturas elevadas no es sorprendente, simplemente representa el retorno a las prácticas tradicionales; la inherente calidad del queso producido en nuestros días es superior al elaborado antaño, debido al uso de leche de mejor calidad, a mejores condiciones de manufactura, y especialmente a mejores organismos iniciadores.

Ventajas : no hay barreras legales, es técnicamente simple, presenta la posibilidad de ahorrar en el costo.

Desventajas : presenta una acción no específica, y se incrementa la posibilidad del deterioro microbiano por *lactobacillus* (Fedrick, 1992).

5.2 Incremento en el número de células viables por varios métodos.

Este método se basa en la adición de un estimulante para empezar el desarrollo y crecimiento bacteriano. Los más comunes son los elementos traza, hidrolizados de proteína, aminoácidos y células autolisadas. Como es de esperar, el queso presenta variantes, además de un sabor más ácido debido al incremento en el número de organismos iniciadores. La evolución lógica es el uso de células iniciadoras atenuadas (El Soda, 1993).

5.2.1 Tratamiento con lisozima.

La lisozima (E.C.3.2.1.1.7), actúa como conservador, reduciendo las cuentas bacterianas en la leche, sin afectar la actividad del *L. bifidus* (forma parte esencial de la flora intestinal en los recién nacidos). Está ampliamente distribuida en pájaros, insectos, plantas, reptiles, y mamíferos; ha sido aislada en las

Tabla 12 . Especificacion de Fedrick para el queso Cheddar con temperatura elevada durante la maduración .

Humedad	> 37 %
Grasa	< 50%
Sal	3.8 - 5.0 %
pH	< 5.3
Coliformes	< 10x10 ⁻¹
E. coli	Ausente
S. aureus	Ausente
Hongos y Levaduras	< 10/g-1
Micro org. no-iniciadores	< 1000/g-1
Esporas anaerobias	Ausentes en 5 ml de leche cruda

Fuente : Fedrick, 1992.

secreciones nasales, saliva, lagrimas, intestinos, orina, y leche, además es un componente de los alimentos perecederos como los huevos; los protege de infecciones favoreciendo la bacteriólisis. El primero que la describió fue Fleming en 1922. Se han hecho intentos por sustituir el uso de nitrato en quesos, empleando liozima de huevo blanco, que es una de sus principales fuentes (contiene 0.3% en peso de la enzima); suprime el crecimiento de *Clostridium butyricum*, que desprende grandes cantidades de dióxido de carbono e hidrógeno en la fermentación de lactosa; éstos gases pueden afectar la calidad del queso (Law and Fox, 1995).

La liozima actúa hidrolizando los polisacáridos que contienen N-acetilglucosamina, alternada con N-ácido-acetil-muramínico de la pared celular. Cataliza la hidrólisis en los enlaces glucosídicos beta-(1-4), lisando las células. Liozima es estable en queso 80% - 90%, y se usa en la cuajada; 500 Unidades/ml de leche para quesería son suficientes para inhibir a clostridia, sin inhibición de los organismos lácticos iniciadores. Es muy específica en su acción y también actúa sobre *Staphylococcus ssp.*, y algo en *Lactobacilli* pero sólo en altas concentraciones. La aplicación de liozima u otras enzimas bacteriostáticas, ofrece una opción valuable pero costosa como alternativa al indeseable uso de nitratos. Es una proteína cuyo pH óptimo se encuentra en 6.0 a 7.0 a 20°C, es más estable a pH ácido y mantiene su actividad por encima de los 100°C; en medio alcalino pierde rápidamente su capacidad de lisis. Los quesos de alta calidad no pueden ser elaborados de leche conteniendo alto nivel de organismos formadores de esporas, a menos que la leche haya sido tratada con nitratos o liozima y haya sido bacteriostática. Este método es preferido en las naciones adonde los nitratos han sido censurados y los equipos de bacteriostatación son caros. Su uso es legal en Alemania, Italia y Francia. La dosis recomendada es de 25 mg de polvo de liozima por litro de leche, pero si es necesario se puede incrementar a 35 mg/L. Su nombre es derivado de la función que realiza sobre la pared celular (Gerhartz, 1992).

Law et al., (1980), agregaron liozima a la leche de quesería. La lisis de las células ocurrió con liberación de las dipeptidasas intracelulares, y resultó en un significativo aumento en la concentración de aminoácidos libres a los seis meses, comparados con los controles; aunque no afectó el grado de desarrollo del sabor o intensidad del sabor. Ello concluyó que las enzimas intracelulares no juegan un papel directo sobre el desarrollo del sabor del queso. Económicamente el uso de liozima no es viable para la manufactura de quesos a gran escala debido al alto costo de la enzima (Neelakantan, Mohanty and Kaushik, 1999).

5.2.2 Adición de extracto crudo o parcialmente purificado de células a la cuajada.

Ahora está bien establecido que las reacciones que gobiernan el desarrollo del sabor en queso, son el resultado de las enzimas intracelulares de las bacterias lácticas. Por ello se ha sugerido el uso de extractos con sistemas enzimáticos de cepas seleccionadas, como agentes aceleradores de la maduración. Se han realizado algunos intentos en ésta área. En quesos con flora bacteriana controlada conteniendo sólo renina y una aminopeptidasa de *L. lactis*, se observó un gran incremento en el nitrógeno soluble, comparado con el control conteniendo sólo renina. La adición de extracto crudo de *L. casei* a la cuajada de queso Cheddar, causó un incremento significativo en el nitrógeno soluble comparado con un queso no tratado; aunque se notó un defecto de amargura en el queso resultante. El defecto se atribuye a la diversidad del sistema peptídico del *L. casei*, y a la irresolución en el orden de la reacción enzimática llevada a cabo en el queso. Cuando se usan otros extractos crudos de *Lactobacillus* con sistemas peptídicos menos complejos también se observa el defecto de amargura. Esto permitió a los autores concluir que las razones para el desarrollo de amargura, no están bien entendidas, y que se pueden adoptar otros sistemas enzimáticos (Law and Fox, 1995).

En 1991 Trepanier et al., homogenizaron células de *Lactobacillus casei* cepa L2A, su adición no incrementó el grueso de la proteólisis, pero si aceleró el rompimiento peptídico. Como resultado, se incrementó la cantidad de aminoácidos y se detectó una menor amargura. También se han evaluado los sistemas péptido-hidrolásicos tanto de *Brevibacterium linens* como de *Propionibacterium freudenreichii*, y extractos crudos de *L. helveticus*, *Propionibacterium shermanii*, *Pediococcus ssp.*, en queso Cheddar; estos mostraron niveles significativamente más altos de nitrógeno soluble; no se detectó amargura pero ninguno exhibió un sabor pronunciado. Las cepas mezcladas y seleccionadas de organismos ácido lácticos han sido usadas por muchos años, desde 1935 en Nueva Zelanda, Australia, Irlanda y E.U.A. Durante la introducción de estos organismos iniciadores en Irlanda, se realizó un estudio comparativo para determinar el nivel de proteólisis, en quesos hechos con mezclas de cepas no definidas y productos elaborados con cepas bien definidas; la proteólisis resultó ligeramente más rápida en el primer caso, y las evaluaciones sensoriales fallaron al no detectar diferencias de sabor entre ambos. Hay diferencias considerables en la actividad proteolítica determinada en leche descremada entre cepas de *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*; las cepas más proteolíticas no son necesariamente aquellas que producen queso amargo. Es interesante notar, que los cultivos de

Streptococcus cremoris mueren más rápido, y presumiblemente se lisan mucho más rápido que los cultivos de *Streptococcus lactis*. Las bacterias ácido lácticas, han mostrado diferir en cuanto a su grado de autólisis, se demostró que factores tales como temperatura, iones de sodio pH, y también la congelación pueden afectar el grado de autólisis. Las cepas de *lactococcus* con buenas propiedades autolíticas, pueden acelerar la maduración del queso Gouda. Por lo tanto parece razonable concluir, que algo de aceleración en la maduración del queso se puede conseguir vía los microorganismos ácido lácticos (Fox, 1993).

5.2.3 Estimulación de la actividad bacteriana iniciadora.

Es generalmente reconocido que las proteinasas y peptidasas de las bacterias ácido lácticas, son esenciales para el desarrollo de sabor en queso, por ello, parece obvio el explotarlas para acelerar la maduración. La inclusión de hongos productores de compuestos no-alcohólicos, con los organismos iniciadores, estimula la flora vía la formación de aminoácidos y vitaminas. La adición de un pequeño volumen de leche hidrolizada por la proteinasa de *M. caseoliticus* (conocida como rulactina), a la leche lista para elaborar algunas variedades queseras; presumiblemente los péptidos y aminoácidos en el hidrolizado, estimulan la microflora, y la rulactina residual puede también contribuir a la proteólisis. Un rango amplio de estimulantes han sido usados para acelerar el añejamiento del queso "Ras" (egipcio) empleando hidrolizados de suero lácteo y caseína o con elementos traza (El Soda, 1993).

5.3. Modificación de los microorganismos iniciadores.

Las cepas de *Streptococcus lactis*, alcanzan cantidades más altas en queso que las cepas de *Streptococcus cremoris*, debido a que el primero tiene más tolerancia al calor. Se esperaría por esto, que *Streptococcus lactis*, causaría una maduración más rápida del queso, pero las altas cantidades de microorganismos lácticos están asociadas con la amargura. Un posible mecanismo para incrementar el número de células sin crecimiento concomitante es el uso de microorganismos atenuados o modificados; en ésta forma se previene el crecimiento pero sin dañar las enzimas asociadas.

Ventajas : no hay barreras legales, y presenta a las enzimas deseadas en concentraciones apropiadas.

Desventajas : se encuentra aún en fase experimental, y se necesita su evaluación económica (Visser, 1997).

5.3.1 Células provocadas con calentamiento o con enfriamiento.

La habilidad de producir ácido láctico puede ser drásticamente reducida por tratamientos térmicos sub-letales, los cuales causan una marcada reducción en las actividades proteínica y peptidásica; la técnica más popular es probablemente el choque térmico el cual fue descubierto por Petterson & Sjostrom en 1975, sugiriendo algunas temperaturas calidas, por ejemplo de 69°C por 15 seg para *L. helveticus* adicionado a la leche de quesería al 2% (v/v), resultando de que más o menos el 90% de las células quedaron atrapadas en la cuajada; pero la eficiencia del entrampamiento disminuyó cuando se adicionaron niveles más altos. El queso obtenido por este método resultó con un incremento en su sabor; no se observó amargura. Bartels et al., en 1990 reportaron resultados en queso Gouda, intentando con *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, y *S. thermophilus* a 70°C por 18 seg, el primero dio los mejores resultados, los otros dos tuvieron defectos en la calidad del sabor debida principalmente a la amargura. Se detectó un sabor parecido a "yogurt" o "acetaldehído" en la mayoría de los quesos conteniendo lactobacilos tratados térmicamente. Se ha desarrollado un método de flujo continuo de pasteurización para *lactobacillus*, siendo las condiciones óptimas 64°C por 18 seg. Exterkate et al., en 1987 reportaron que las condiciones óptimas para el choque térmico de *lactococci*, fueron 56.5°C a 17 seg, lo cual resulta en 93 a 97% de reducción en la producción de ácido, y sólo del 15 - 30% de pérdida de actividad de las proteinasas y aminopeptidasas, respectivamente (Huitrón, 1993).

Un incremento de 2°C inactiva drásticamente las actividades de las proteinasas y aminopeptidasas asociadas a la pared celular. Bajo estas condiciones, las actividades proteínica y peptidásica no son marginalmente inhibidas (Tabla 13).

Asimismo se ha sugerido al tratamiento a base de congelación para dañar la pared y membrana celular e inducir la lisis; esto permite la pérdida de la habilidad para producir acidez. El enfriamiento también mata a las bacterias sin inactivar sus enzimas. El método fue propuesto por Bartels et al., en 1987; el autor observa un incremento substancial en los péptidos solubles en agua y aminoácidos en queso Gouda experimental adicionado de células de *L. helveticus* CNR2 enfriadas por choque, sin efectos adversos. La mayor diferencia detectada en el sabor de los quesos tratados, comparados con el control fue evidente después de las 5 semanas de maduración. La adición de células de *L. helveticus* no enfriadas por choque, también aceleró la maduración, pero causó sabores indeseables (Fedrick, 1992).

TABLA 13. INFLUENCIA DEL CHOQUE TERMICO EN LA PRODUCCION DE ACIDO Y LA ACTIVIDAD DE ALGUNOS MICROORGANISMOS .

MICROORGANISMO	CONDICIONES DE CHOQUE	% REDUCCION DE ACIDO	% REDUCC. ACT. PROT.
<i>Lactobacillus helveticus</i>	69° C / 15 s	90%	10 - 30 %
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> .	69° C / 15 s	N.D.	N.D.
<i>Lactobacillus helveticus</i>	70° C / 18 s	N.D.	N.D.
<i>Cepa mixta lactococci</i>	56.5° C / 17 s	93-97%	15%
<i>Lactobacillus helveticus</i>	64° C / 18 s	89%	10%
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	63°C / 20 s	N.D.	N.D.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	67° C / 15 s	39%	74 % A.P. 35 % E.P.
<i>Lactobacillus casei</i>	67° / 22 s	98%	37%

N.D. = No determinado , AP = Actividad aminopeptidasa ; EP = Actividad endopeptidasa .

FUENTE : Madrid, 1996.

Es posible agrupar la mayoría de los intentos descritos para la acelerar la maduración del queso usando células con choque en frío (Tabla 14).

5.3.2 Células atenuadas por secado por aspersion.

El más reciente procedimiento físico usado para atenuar la habilidad para producción de ácido de las cepas bacterianas, sin dañar su sistema peptidásico, es el secado por aspersion, Jhonson & Etzel en 1991, desarrollaron una técnica para producir cultivos en seco; polvo estable conteniendo microorganismos no-viables con enzimas intracelulares. El decremento en la viabilidad se obtuvo sin impacto significativo en las actividades de las enzimas intracelulares. En éste momento no hay resultados de estudios realizados en quesería por este método (El Soda, 1993).

5.3.3 Células tratadas con solventes.

Exterkate & Van de Veer (1995), reportaron que el tratamiento de células con solventes orgánicos (4% butanol) activaron algunos enlaces membrana-proteinasas y peptidasas presumiblemente por el incremento en la accesibilidad por el sustrato. La adición de una suspensión de células tratadas con butanol a la leche de quesería, aceleraron ligeramente y tal vez más importantemente, redujeron la intensidad de la amargura comparados los quesos control. Este método es impráctico y complejo, y posiblemente presenta barreras legales (Madrid, 1999).

5.3.4 Cultivos microbianos neutralizados e inactivados.

Shushedushnov & D'Yachenko (1993), describieron un método para la preparación de *Lactobacillus spp.*, inactivado por neutralización continua del medio de cultivo (suero o leche descremada), usando chispas de mármol. Después de tres días, la mayoría de las células habían muerto, pero sus enzimas proteolíticas permanecieron activas. La adición del cultivo inactivado (1-1.5%), junto con el cultivo iniciador normal (1-1.5%), en la leche para elaborar queso Cheddar, intensificó la proteólisis y aceleró su añejamiento (Moskowitz and Noelck, 1995).

5.3.5 Microorganismos mutantes.

Las mutaciones inducidas artificialmente también pueden ser empleadas en las bacterias acidolácticas para incrementar su actividad proteolítica y engrandecer su capacidad de potenciar el añejamiento. Dilanyan et al., describieron en 1976, el uso de microorganismos lácticos iniciadores conteniendo mutantes inducidos de *lactobacilli* con rayos "X" o rayos "gama", con incremento en la actividad

TABLA 14 . CONDICIONES USADAS PARA CHOQUE TERMICO CONGELADO EN LOS MICROORGANISMOS .

MICROORGANISMO	CONDICIONES DE CONGELACION
<i>Lactobacillus helveticus</i>	24° C / 24h
<i>Lactobacillus casei</i>	20° C / 20h
<i>Pediococcus halophilus</i>	30° C / 36h
<i>Lactobacillus helveticus, Lactobacillus casei</i>	20° C / 20 h
<i>Lactobacillus casei, Pediococcus sp.</i>	24° C / 24h

FUENTE : Visser, 1997 .

proteolítica. Algunos laboratorios consideraron la incorporación de mutantes "lac-" incrementando la población microbiana sin afectar la tasa de desarrollo de acidez. El uso de mutantes "lac-" (lactosa-negativo), "prt-" (proteínasa-negativo), y *Streptococcus lactis* C2, para acelerar la maduración del queso, se describió por Dulley & Grieve en 1983. Mutantes concentrados conteniendo más o menos 100,000,000,000 UFC/ ml fueron agregados a la leche de quesería, provocando niveles más altos en la cuenta microbiana durante la molienda de la cuajada de entre 10 a 60 veces su valor, en con los quesos control; no se detectó amargura, la proteólisis se aceleró en los quesos experimentales y el sabor fue mejorado por encima de los controles a las 12 semanas. En la misma forma se aplicó mutante "prt-" sobre queso Cheddar obteniéndose los mismos resultados. Los mutantes "lac-" de *L. casei*, fueron evaluados y mostraron mejores resultados (Hefnawy, 1996).

5.3.6 Cepas genéticamente modificadas .

En los años recientes se ha visto incrementado el interés en la genética de las bacterias ácido lácticas. Algunos esfuerzos se han hecho para modificar estos microorganismos genéticamente. Uno de los blancos de este desarrollo es investigar la posibilidad de acelerar la maduración del queso vía la modificación o sobre "expresión" de los genes proteínásicos. Van de Guchte et al., en 1990, exitosamente "expresaron" el gen de la proteasa neutral de *Bacillus subtilis* en *Lactococcus lactis*. Los autores concluyeron que *Lactococcus lactis*, puede hacerse secretar una proteínasa neutral activa. Se estudió el efecto que causa el sistema proteolítico bacteriano en la maduración y el desarrollo del sabor en queso Cheddar. Para ello, se emplearon las siguientes cepas modificadas genéticamente : *L. lactis* UC 317 como control, *L. lactis* AM 312 conteniendo una proteínasa de *B. subtilis*, *L. lactis* AC322 "lac+ prt+", *L. lactis* AC311 "lac+prt+" conteniendo la aminopeptidasa de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, y *L. lactis* JLC3601 conteniendo una proteínasa. Todos los microorganismos fueron transformados por electroporación, usando un "Gene pulser" (Bio-Rad, Richmond California). Se adicionó el inóculo (2%), con el microorganismo respectivo en cada caso a la leche de quesería y, siguiendo el método tradicional se obtuvo el queso Cheddar, que fue madurado a 8°C durante 6 meses con una humedad relativa controlada del 85% aproximadamente. Los resultados reportaron que UC 317 cuando ha sido usado sólo como iniciador, produce un queso de con excelente sabor y textura; la cepa JL3601, produce aproximadamente tres veces más proteínasa que la UC317. En los casos UC 317, AC 311 Y AC 321, la caseína "alfa-s1" fue hidrolizada más rápidamente que la caseína "beta". Asimismo se observó el incrementó del contenido de nitrógeno soluble durante los seis meses, y resultó más rápido

durante los primeros tres meses del período, que durante la segunda mitad de él en todos los casos, la extensión del incremento dependió fuertemente del microorganismo usado. En los quesos inoculados con JL 3601, el nitrógeno soluble formado ligeramente más bajo que en los demás. En cambio con AM 312 y AC322, resultó lo contrario, ya que presentaron los valores más altos de cualquiera de los quesos; su incremento se presentó durante el primer mes. Sus porcentajes fueron muy similares entre sí a los tres meses y, a los seis se notó que AC311 bajó en un 5%. El nivel de nitrógeno soluble en queso, es un índice de la extensión de la actividad proteolítica, ya que sólo los aminoácidos y pequeños péptidos del queso son solubles en agua.

Ventajas: es fácil de incorporar, y será muy promisorio cuando este disponible.

Desventajas: presenta barreras legales, además se necesita más investigación (Mc Garry, Law and Fox, 1994).

5.4 Slurries (pastas semi-sólidas).

Una cuajada "slurry" de queso ha sido recientemente definida como una pasta semi-sólida conteniendo cerca del 40% de sólidos, que posee el sabor característico de un queso en particular según su preparación. El proceso involucra la adición de agua y de 1 a 3% de difosfato disódico (sal emulsificante), al queso. Los elementos traza y el glutation reducido también se usan como aditivos. El slurry es incubado bajo condiciones anaeróbicas a 30°C durante 4-5 días con agitación, el método fue desarrollado por Kristofersen et al., en 1970. Desde entonces, algunos aditivos fueron evaluados para intensificar el desarrollo del sabor típico, el más efectivo es el glutation, otros aditivos incluyen citrato, sulfato de manganeso, riboflavina y cobalto, pero éstos han mostrado menor efectividad. El glutation (100 ppm), se reportó como potenciador de la liberación de péptidos en los slurries probablemente a través de la activación de ciertas enzimas. También se reportó que los slurries tratados con glutation presentaron una más alta actividad de estearasa. El mecanismo del incremento del sabor en los slurries, no está totalmente entendido, pero probablemente es debido a las bacterias ácido lácticas presentes en el queso usadas en su manufactura. El rol de las bacterias ácido lácticas quedó demostrado por Kristofersen & Singh en 1971. Cliffe & Law en 1989, demostraron que las bacterias ácido lácticas también pueden actuar como agentes contra la amargura en los slurries, el método encierra la adición de *Lactococcus lactis*. Los slurries madurados son después agregados a quesos naturales o procesados; por razones de composición, el nivel de slurry debe ser restringido a no más del 20% de la mezcla final. Los slurries queseros han sido vistos en un amplio rango de aplicaciones: botanas, galletas "crackers", y en

imitación de productos lácteos. También son un ingrediente en la producción de "quesos modificados enzimáticamente" (en inglés enzyme modified cheese), constituyendo un medio abrigador para las proteinasas y peptidasas seleccionadas que aceleran la maduración del queso.

Ventajas : desarrollo de sabor muy rápido.

Desventajas : mucha dificultad para controlar el proceso a temperatura mayor o igual a 30°C, que puede inducir el crecimiento de contaminantes y alto riesgo de deterioro microbiano.

La inclusión de proteinasas, lipasas o elementos traza en los slurries incrementa su efectividad (Campos, 1992).

Dulley (1994), usó un slurry madurado como aditivo en la fabricación de queso normal para incrementar el desarrollo del grado de sabor, el tiempo de añejamiento se redujo en un 25%, la introducción de un número alto de *Lactobacilli* fue considerado responsable de la aceleración del desarrollo del sabor. La adición de 0.3% de sorbato de sodio al slurry, eliminó el crecimiento de hongos y previene el desarrollo de sabores indeseables. Labeault & Revah en 1989, intentaron con éxito desarrollar un slurry para producir sabor del queso Azul en la cuajada granular fermentada con *Penicillium roqueforti*, a el que se agregó una lipasa. Se reportaron valores de 8 a 10 veces más altos en la concentración de carbonilos que en el queso tradicional. Los slurries de queso Cheddar, adquieren el sabor característico de queso Brick en maduración extendida por 7 días, y el sabor de queso Romano puede desarrollarse con la adición de lipasa. Asimismo, se ha aplicado ésta técnica sobre la cuajada de queso Feta y Suizo, acelerando su añejamiento. Una técnica parecida fue usada por Bockelmann & Lodkin en 1974, donde el queso maduro fue homogenizado con Na₃-citrato, y se agregó a la leche de quesería antes de la manufactura; la maduración del queso resultante fue acelerada, aparentemente debido al incremento de la población de lactobacilos. "Novo" emplea un método para preparar queso modificado enzimáticamente (E.M.C.). Se mezcla queso medio-añejado en agua se emulsifica, homogeniza y pasteuriza para ayudar al control de la microflora nativa. Después de enfriarse, se agrega la enzima exógena "Palatasa M" (lipasa de *Mucor miehei*, dosis = de 10 - 100 LU por gramo de grasa en el slurry), o "Neutrasa" (proteasa neutra de *Bacillus subtilis*, dosis = de 0.0003 a 0.0030 AU por gramo de proteína en el slurry), se incuba a 40°C por 12-96 h. Después se repasteuriza de 66 a 72°C por 4-8 min (para inactivar la enzima); no hay necesidad de ajustar el pH.

La pasta resultante puede ser usada como tal en queso procesado (2-3% w/w), en sopas, dips, aderezos, botanas, o también puede ser secada por aspersión. La pasta "E.M.C." presenta de 5 a 20 veces el impacto de sabor del queso Cheddar. "Miles Marschall Co.", adoptó un método similar en la preparación de su queso modificado enzimáticamente (E.M.C.), que son usados en quesos procesados o en recetas conteniendo queso. Un rango de preparaciones enzimáticas se encuentran disponibles: EMC 130-245 para queso Cheddar (dependiendo de la intensidad de sabor requerida), EMC 310 para queso Romano, y EMC 400 para queso Suizo. Las preparaciones enzimáticas se agregan a las pastas de queso que contienen de 40 a 55% de sólidos, en un nivel de 1% aproximadamente. Una variación de este método, es descrita por Lee en 1986, en la cual un queso medio-maduro o cuajada fresca se mezcla con crema, adicionando una combinación de proteasa neutra (Neutrasa), y lipasa (preferentemente una mezcla de lipasas pregástrica y gástrica, o lipasa de *Mucor miehei*), incubando a 35°C por más o menos 48 horas, obteniéndose resultados similares en menos tiempo (Pérez, Islas y del Río. 1999).

5.5 Adición de enzimas exógenas.

Ya que la maduración del queso involucra la acción de las enzimas propias endógenas y exógenas más que a organismos viables, parece lógico evaluar la posibilidad de acelerarla aumentando éstas enzimas, conociendo el importante papel que juegan en éste proceso.

Ventajas : en contraste con las reacciones químicas regidas por la termodinámica, el uso de enzimas permite modificar sitios específicos del sustrato, bajo condiciones más suaves, y con niveles de uso inferiores que van de 0.1% a 5% en general. Sumado a esto, las enzimas son biodegradables y no forman demasiados subproductos, tampoco es necesario eliminarlas usando algún método de purificación; por lo que los costos de tratamiento de desperdicios son considerablemente menores comparados con la catálisis química. Los sistemas enzimáticos empleados son inactivados sometiéndolos a tratamientos térmicos. Además, éste método presenta facilidad de incorporación.

Desventajas : barreras legales posibles, dificultad para asegurar la incorporación uniforme (algunas enzimas son difíciles de manejar), posible riesgo de sobre-maduración; elección limitada de enzimas comercialmente disponibles; representa un costo más (Izco, Torre y Barcinia, 1999).

Los estudios realizados en esta materia, se han concentrado en las proteinasas con menor énfasis en las lipasas y peptidasas; no se puso atención a los millares de reacciones secundarias que ocurren durante el añejamiento. Asimismo, se

debe mencionar que las investigaciones realizadas se han enfocado en los quesos duros, y semi-duros añejados internamente con bacterias, en los cuales es económicamente razonable, ya que éstos requieren largos períodos de maduración (Blom et al., 1996).

Las enzimas son siempre vendidas tomando como base su actividad, pero sus precios son difíciles de comparar porque cada fabricante tiene su propio método de análisis. Además que las propiedades de las enzimas de diferentes fuentes algunas veces varían. Esto quiere decir que una comparación basada en una determinación analítica de la actividad puede ser engañoso porque es usualmente realizado bajo condiciones las cuales se desvían de las aplicaciones reales. La única manera propia de comparar enzimas de diferentes fuentes, es por su desempeño en la aplicación referida. El costo de la enzima depende de las condiciones del proceso, y desde luego, de factores que usualmente influyen los precios, tales como las costumbres, las políticas comerciales locales, y competencia. Los costos de enzimas son generalmente muy pequeños comparados con el valor agregado obtenido por el proceso enzimático. La calidad y confianza, son por esto mucho más importantes que un precio mínimo de un producto enzimático. El costo de renina microbiana para la manufactura de queso es de 0.1 dólar americano/L de leche (Goldstein and Wingard, 1997).

Algunas enzimas se producen en grandes cantidades arriba de miles de toneladas, pero su valor es relativamente pequeño 10 a 20 dólares americanos por kilogramo (Dairy Council Digest, 2002).

En México, actualmente el costo de lipasa pancreática porcina es de 137 dólares americanos por kilogramo, más el 15% de I.V.A., y la proteasa de *Bacillus subtilis* es de 115 dólares americanos por kilogramo, más el 15% de I.V.A. (Enzimas de México, S.A. DE C.V., 2004).

Esta es la manera más popular de reducir el tiempo de añejamiento del queso que se ha desarrollado. Ya que la proteólisis, lipólisis e hidrólisis de la lactosa son los mayores eventos bioquímicos durante la maduración, proteinasas, peptidasas, lipasas y "beta-galactosidasa" fueron evaluadas para su uso potencial. Las enzimas también fueron obtenidas de otras fuentes de la misma familia del queso, o extraídas de microorganismos relacionados con él. Se muestran las proteinasas más populares usadas en la aceleración de la maduración (Tabla 15).

La "Neutrasa" (peptidasa de *Bacillus subtilis*), es probablemente la enzima más común usada para éste propósito, sola o acompañada de peptidasas; reduce en

TABLA 15. ENZIMAS PROTEOLITICAS USADAS EN LA ACELERACION DE LA MADURACION DEL QUESO .

ENZIMA	FUENTE	FABRICA
Neutrasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Novo
Maxatasa	<i>Bacillus subtilis</i>	Gist Brocades
Maxazima	<i>Bacillus subtilis</i>	Gist Brocades
Rulactina	<i>Micrococcus caseoliticus</i>	Roussel U.
Corolasa	<i>Aspergillus sp.</i>	Rohm Tech.
Prozima	<i>Aspergillus sp.</i>	Amarno
Proteasa àcida	<i>Aspergillus orizae</i>	Pfizer

FUENTE : Pèrez, Islas y del Rio , 1999 .

50% el tiempo de maduración. La adición de proteinasas induce al incremento en la degradación de las proteínas, pero muchas veces, resulta el desarrollo de sabor amargo y con ello el rendimiento quesero disminuye. Por ello Law & Wigmore en 1983, mostraron que combinando neutrasa con peptidasas de *lactococcus*, se proporcionaba un mejor sabor al queso tratado. Sus experimentos permitieron el desarrollo de un producto comercial llamado "Accelasa" (Imperial Biotechnology U.K.), conteniendo estas mismas enzimas (El Soda, 1993).

El uso de lipasas para reducir el tiempo de maduración del queso, y proporcionar diversas variedades queseras como Provolone, Ras, Cacciocavallo, con su sabor picante característico también han sido evaluadas (Tabla 16).

La aceleración de la proteólisis sin el concomitante incremento en el grado de peptidólisis, y muy probablemente de lipólisis, puede resultar en el desarrollo de un sabor no-balanceado en el queso (Fox, 1993).

Debido a que el uso de una enzima individual muchas veces causa disturbios en el equilibrio de los componentes del sabor del queso provocando defectos, los fabricantes han desarrollado "cocteles" de enzimas (Tabla 17).

La aceleración de la glicólisis parece no ser de gran valor para la aceleración de la maduración del queso, ya que el metabolismo de la lactosa, normalmente ocurre en un tiempo relativamente corto. Parece que el efecto en los tratamientos de "beta-galactosidasa" para acelerar el añejamiento del queso se debe a la contaminación con proteinasas. Estos métodos también son usados para acelerar la maduración de los quesos no convencionales, tales como los elaborados por ultrafiltración, bajos en contenido de grasa, hechos con leche recombinada, y quesos manufacturados con otras leches como de oveja y búfala (Anon, 1997).

5.5.1 Métodos para agregar las enzimas al queso.

Si las enzimas se agregan directamente a la cuajada, solo una pequeña parte se retiene en ella (del 5% al 10%), lo cual incrementa el costo. La adición de enzimas a la cuajada es eficiente solamente en los casos de quesos tipo Cheddar en los cuales el suero es removido antes de que la cuajada hubiere sido prensada y moldeada a su forma final. Su adición en la leche de quesería, también resulta en una reducción en el rendimiento quesero y defectos de sabor debido a la proteólisis que se desarrolla en las etapas tempranas de la maduración, durante la manufactura; el suero de queso resultante estará contaminado con enzimas activas lo que lo hará no-apto para ciertas aplicaciones alimenticias posteriores. La adición directa a la cuajada usando sal como vehículo, es factible para los quesos

TABLA 16 . ENZIMAS LIPOLITICAS USADAS EN LA ACELERACION DE LA MADURACION DEL QUESO .

ENZIMA	FUENTE	FABRICA
Italasa	Animal	Daryland
Capalasa	Animal	Daryland
Lipasa de cabra	Animal	Hansen Lab.
Lipasa de borrego	Animal	Hansen Lab.
Palatasa	<i>Mucor miehei</i>	Novo
Piccantasa	<i>Mucor miehei</i>	Gist Brocades

FUENTE : Arenas , 1998 .

TABLA 17. MEZCLAS DE ENZIMAS USADAS PARA ACELERAR LA MADURACION DEL QUESO .

NOMBRE	MEZCLA ENZIMATICA	FABRICA	NOMBRE
Naturage	Proteasa + peptidasa + cultivo	Miles	Naturage
Flavourage	Proteasa + lipasa	Hansen Lab.	Flavourage
Accelasa	Proteasa + peptidasas	Imperial B.	Accelasa

FUENTE : Herian y Rizman , 1997 .

salados en seco, y quesos duros; una buena distribución requiere una buena formulación de la enzima en la sal; su almacenamiento puede ser difícil. Aunque con tal optimización, éste modo de adición no es aplicable a los quesos salados por salmuera. La cantidad de enzima adicionada es inferior, aproximadamente 10 veces menos que si fuera agregada directamente a la cuajada. Para vencer éstas dificultades, se ha propuesto el entrapar enzimas, y células atenuadas. Se han evaluado dos métodos: encapsulación de extractos libres de células provenientes de bacterias, o bacterias completas con sustratos adecuados en cápsulas de grasa de leche (Arenas, 1998).

Y el entrapamiento de agentes añejantes tales como peptidasas en liposomas. Esta tecnología fue descubierta por Magee & Olson en la Universidad de Wisconsin en 1981, y brevemente, consiste en la microencapsulación de la enzima, el extracto libre de células, o microorganismos en liposomas. Existen tecnologías aplicadas en el área alimenticia, y farmacéutica; gelatina, grasa de leche, y liposomas de fosfolípidos. Los liposomas son una opción muy promisoriosa porque los que se usan, son compatibles con los alimentos, y no alteran la composición del queso. También son muy útiles ya que se rompen cuando la liberación de sus componentes es requerida. Los liposomas son muy fáciles de hacer, simplemente dispersando fosfolípidos en la solución de enzima, secando la mezcla, después, rehidratando bajo condiciones controladas. Esta deshidratación/rehidratación de los liposomas atrapa arriba del 40% de la mezcla enzimática y representa un sistema muy eficiente que no requiere solventes desnaturalizantes para funcionar. Los liposomas pueden ser colocados en la tina de quesería donde permanecerán intactos; a través de la formación de la cuajada, y solamente son rotos cuando la cuajada ha sido colocada en los toneles después de que ha sido prensada, liberando las enzimas. Solo para efectos de comparación, del 5 al 10% de las enzimas agregadas directamente a la leche permanecen en la cuajada; los liposomas incrementan la retención del 90 al 95%. En el presente, ésta tecnología es relativamente costosa, ya que el precio de los lípidos es alto, pero representa la única manera eficiente del uso de enzimas sólo para algunas variedades queseras como Cheddar, Manchego, y Feta (Tucker and Woods, 1995).

La producción a gran escala de liposomas también es posible usando equipos que hoy están disponibles en el mercado tales como el "microfluidizador", o el "liposomat".

Ventajas : fácil de incorporar, buena distribución, es posible a gran escala, las vesículas fosfolípidas protegen a los sustratos protéicos de la leche contra acciones enzimáticas hasta después de que el queso ha sido formado y prensado; pueden

por esto evitar la formación de amargura durante el añejamiento y las pérdidas en el rendimiento, lo cual resulta cuando se añaden las enzimas directamente a la leche de quesería; debido a que los liposomas están contenidos en la cuajada, el suero de queso resultante está libre de enzimas; también ofrece la posibilidad de preparar un amplio rango de vesículas variando su talla, carga neta, sensibilidad al pH, y/o temperatura, es posible obtener liposomas con estabilidad variable; esto permite la selección de la preparación liposomal apropiada para cada tipo de queso en particular.

Desventajas : altos costos, aún en fase experimental (Walstra et al., 2001).

5.5.2 Evidencias de la elaboración de queso Cheddar vía maduración enzimática acelerada .

a) Uno de los primeros reportes del uso de enzimas exógenas para acelerar la maduración del queso engloba a 41 preparaciones comerciales grado alimenticio o "GRAS", de proteasas ácidas y neutras, lipasas, descarboxilasas, y lactasas que fueron introducidas a las cuajadas con la sal para el desarrollo rápido del sabor en queso Cheddar (Iwasaki and Kosikowski, 1973).

b) Se usaron preparaciones enzimáticas comerciales grado alimenticio o "Gras", americanas y japonesas (Tabla 18).

Se incluyeron 26 preparaciones individuales de reninas fúngicas (*M. miehei* y *M. pusillus*), proteasas ácidas (*Aspergillus orizae*), proteasas neutras (*Streptomyces ssp.*), lipasas (*Aspergillus ssp.*), y descarboxilasas bacterianas. La leche se pasteurizó a 72°C por 16 seg, y fue inoculada con 2.26g, 2.59g, 5.61g, y 13g de preparación enzimática, mezclada con sal y se agregaron a 5.9 Kg de cuajada cada una. Se siguió el método de elaboración descrito en el capítulo III. La maduración de los quesos se realizó a 10°C, 20°C, y 32°C durante 1 mes con una humedad relativa controlada del 85%. Cuando se introducen las preparaciones enzimáticas conteniendo sal sobre la cuajada, éstas influyen el sabor, el porcentaje de proteína soluble y, los ácidos grasos volátiles del queso. En altas concentraciones de enzima, se notó rancidez, pero en bajas no fue pronunciada, y su perfil fue placentero. De acuerdo con Hylinka & Hood (1971), se requiere algo de rancidez en el queso Cheddar madurado, sin exceso ya que haría más rigurosa su aceptación. El queso que presentó el sabor más deseable fue el que resultó preparado con 2.59g y 13g de enzimas, mantenido por 1 mes a 20°C; su contenido de ácidos grasos libres de 73.3 y 145.5 ml N/10 NaOH por 100g comparados con 16.5ml de el control; el contenido de proteína

TABLA 18 . PREPARACIONES ENZIMATICAS COMERCIALES Y SUS FUENTES.

ENZIMA	FUENTE
Renina fúngica	Wallerstein Co. (U.S.A.)
Renina fúngica	Daryland Lab. (E.U.A)
Proteasa fúngica	Miles Lab. (E.U.A)
Neutrasa	Amano Pha. (Japòn)
Coronasa	Wakamoto Pha (Japòn)
Molsin	Molosin Pha (Japòn)
<i>Proteasa R. CH.</i>	Osaka M.U. (Japòn)
Takadiastasa SS	Sankyo Pha. (Japòn)
Prozima	Amano Pha. (Japòn)
Tasinasa	Kyowa F. (Japòn)
Peptidasa	Nutricional B. (E.U.A.)
Aminopeptidasa	Enzyme D.C. (E.U.A.)
Carboxipeptidasa	Kyowa F. (Japòn)
Capalasa K	Daryland Lab. (E.U.A)
Capalasa L	Daryland Lab. (E.U.A)
Capalasa KL	Daryland Lab. (E.U.A)
Italasa C	Daryland Lab. (E.U.A)
Lipasa microbiana	Wallerstein Co. (U.S.A.)
Lipasa microbiana	Miles Lab.
Lipasa microbiana	Wallerstein Co. (E.U.A.)
Tirosina descarboxilasa	Nutricional B. (E.U.A.)
L-arginina descarboxilasa	Nutricional B. (E.U.A.)
L-histidina descarboxilasa	Nutricional B. (E.U.A.)
Lisina descarboxilasa	Nutricional B. (E.U.A.)
L-descarboxilasa aspàrtica	Nutricional B. (E.U.A.)
Descarboxilasa-àcido-glutàmica	Nutricional B. (E.U.A.)

FUENTE : Kosikowski and Iwasaki , 1974 .

soluble de 8.6 y 9.6% comparado con 5.8% de el control el control; su textura fue ligeramente tosca, pero en los controles resultó casi similar; se observó suero libre en el queso tratado y en el control. El queso mantenido a 10°C, presentó textura normal sin suero libre. El queso conteniendo 13g de enzimas, desarrolló un sabor rápidamente, el cual más adelante se deterioró especialmente a 32°C, exhibiendo significativamente más suero libre, que los controles; los quesos control mantenidos a 32°C, mostraron sabores a sobremadurado y a quemado con una textura desmoronable. El pH de los quesos Cheddar control y experimentales, después de 1 día, fue de 5.1 y no hubo cambios ocurridos posteriormente después de 30 días. El queso Cheddar procesado hecho de queso Cheddar añejado durante dos meses y al cual se le añadieron 10, 20, y 40% de porciones de enzimas; al 10% mostraron un notable incremento en su sabor parecido al Cheddar tradicional, y al 20% un sabor muy al punto (Kosikowski and Iwasaki, 1974).

c) Se obtuvo queso Cheddar de buena calidad con la siguiente combinación de enzimas, proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* 0.005% (31000 Miles Lab.), lipasa fúngica de *Candida cylindracea* 0.00005 a 0.0002% (MY Meito Sangyo Co.), proteasa bacteriana de *Bacillus subtilis* 0.0035% (P-53 Rohm & Haas). Los quesos Cheddar tratados con enzimas microbianas desarrollaron la proteína soluble y ácidos grasos más altos y desplegaron mejor sabor y mejor aceptabilidad que los quesos control. Las proteasas microbianas contribuyeron al rompimiento de la caseína, especialmente la caseína "beta". También la caseína "alfa-s1", y aminoácidos fueron más altos en los quesos tratados con proteinasa. El incremento en el grado de proteólisis en los quesos tratados con enzimas, tiene una relación directa con la aceleración de la maduración. La leche se trató a 65°C por 15 seg, y se obtuvo el queso Cheddar de acuerdo al capítulo III. Cantidades medidas de preparaciones enzimáticas se mezclaron con la sal y se agregaron a la cuajada. Se maduró cada uno a 4.5°C o 10°C. Los quesos fueron removidos y analizados por duplicado; se evaluaron en cuanto a sabor, cuerpo, textura y apariencia por los autores usando el "American Dairy Science Association Score Card for Cheddar Cheese" como guía. El pH de los quesos después de 3 meses a 10°C resultó en un rango de 4.9 a 5.2 sin ninguna influencia aparente por la adición de preparaciones enzimáticas microbianas. Los quesos Cheddar conteniendo la preparación enzimática lipásica, mostraron ácidos grasos volátiles más altos que los quesos sin adición de enzimas. Los ácidos grasos se incrementaron en el queso con el incremento de los niveles de lipasa y el tiempo de maduración (Tabla 19).

TABLA 19 . ACIDOS GRASOS VOLATILES EN QUESOS* TRATADOS CON DIFERENTES CANTIDADES DE LIPASA Y QUE HAN SIDO MADURADOS A 10° C .

%Concentración de la preparación de la lipasa.	Acidos grasos volátiles	
	2 meses (ml de NaOH 0.1N / 100g de queso Cheddar.	3 meses
0	6.87	7.55
0.004	21.96	27.35
0.003	20.17	23.75
0.001	13.61	16.21
0.0002	10.27	11.77
0.00005	8.34	9.97

* Promedio de 5 a 10 lotes.

FUENTE : Sood and Kosikowski , 1979.

La concentración de proteína soluble del queso se incrementó con la adición de proteinasa microbiana y el tiempo de maduración (Tabla 20).

La proteólisis y lipólisis fueron más intensas en los quesos añejados a 10°C que a 4.5°C, y resultaron con sabor más alto con mejor cuerpo y textura. La combinación más deseable y concentraciones para producir un queso Cheddar de buena calidad, madurado 3 meses a 10°C fueron : 0.005% de proteasa fúngica 31000 de "Miles Lab.," más 0.00005 a 0.00002% de lipasa MY de "Meito Sangyo", o 0.0035% de proteasa P53 (*B. subtilis*) de "Rohm & Haas", más 0.00005 a 0.0002% de lipasa MY de "Meito Sangyo". La adición de más de 0.0002% de lipasa MY, producen queso Cheddar con un marcado sabor rancio. El estudio de los efectos causados por la exposición del queso tratado con enzimas después de madurarlo a 10°C durante 4 meses y, transferido a 23°C durante 8 días, incrementó su sabor, sin amargura o rancidez. Los quesos tratados con enzimas (0.005% proteasa de "Miles Lab.," mas 0.002% lipasa "Meito Sangyo"), y los quesos control, exhibieron los mismos aminoácidos que están en la caseína. El total de aminoácidos generalmente incrementado durante el añejamiento, fueron más altos en los quesos tratados con enzimas que, en los quesos control; y resultaron más elevados en los quesos madurados a 10°C que a 4.5°C. La aspargina, glutamina, valina, leucina, fenilalanina, y arginina se encontraron en mayor cantidad en todos los quesos, mientras que prolina y histidina existieron inicialmente sólo en trazas, y se incrementaron al último. Los quesos madurados a 4.5°C no mostraron aceleración pronunciada en su maduración. Esto sugiere que los quesos madurados con enzimas a 10°C pueden ser almacenados a 4.5°C con un mínimo de actividad enzimática microbiana. Recíprocamente, los quesos tratados enzimáticamente y añejados a 10°C, no desarrollaron defectos en el sabor cuando se los sometió a 22°C durante 8 días. La cuajada prensada y fresca del queso Cheddar, consiste en su mayoría de agua, grasa, paracaseína, sales, ácido láctico, y proteína soluble. Durante el añejamiento, las enzimas solubilizan una porción de la caseína y modifican la estructura, de ahí que la masa se convierta en más suave, integrada y lisa (Sood and Kosikowski, 1979).

d) Una evaluación realizada entre "Accelasa", "Flavourage", "Naturage", "Neutrassa" y sistema de maduración "Werrabee" (Tabla 21).

La primer diferencia es que dos de ellos se agregaron a la leche de quesería antes de iniciar el proceso de fabricación, mientras otros dos, fueron aplicados en seco mezclados con la sal, y aplicados durante el salado. Todos ellos contienen proteinasa, lo cual enfatiza la importancia de la proteólisis en el proceso de

TABLA 20 . PROTEINA SOLUBLE* EN QUESOS SELECCIONADOS CUYA MADURACION SE ACELERO ENZIMATICAMENTE Y SE LLEVO A CABO A 10° C ** .

QUESO	TIEMPO DE MADURACION EN DIAS			
	0	30	60	90
Control	1.31%	2.98%	3.53%	4.97%
0.005%Proteasa fúngica de <i>Aspergillus oryzae (Miles)</i>	1.37%	4.45%	5.32%	6.58%
0.0035%Proteasa bacteriana <i>Bacillus subtilis (Rohm & H.)</i>	1.42%	5%	5.57%	6.90%

*Porcentaje de queso

** Estos quesos contienen niveles óptimos de enzimas .

FUENTE : Sood and Kosikowski, 1979 .

TABLA 21 . COMPARACION ENTRE VARIOS PRODUCTOS ENZIMATICOS QUE ACELERAN LA MADURACION DEL QUESO .

	Agregada a leche/cuajada		Bacterias viables	Proteinasa	Peptidasa	Lipasa	Temp.de maduración
ACCELASA (Mauri)	-	+	-	+	+	-	12° C
Flavourage (Hansen)	+	-	-	+	-	+	-
Naturage (Miles)	+	-	+	+	-	-	10° C
Neutrasa (Novo)	-	+	-	+	-	-	-
Sistema de maduración Werribee (GCID)	+	-	+	-	-	-	-

FUENTE : Fedrick , 1992 .

maduración. "Chr.Hansen Lab." es el único fabricante que incorporó una lipasa en su producto. Ellos han demostrado que ésta enzima promueve la liberación de ácidos grasos en cantidad similar a la concentración de éstos ácidos en el queso Cheddar elaborado por el método tradicional. Solamente un producto (Naturage), incluye organismos viables alrededor de 100, 000, 000,000 lactobacilos/g, siendo una combinación de por los menos dos cepas. Cuando se adiciona en la dosis recomendada (0.01%), contribuye con cerca de 10, 000, 000 organismos /ml de leche de quesería; también se agrega una reducida y ligera cantidad de organismo iniciador. Posiblemente como resultado de éste inóculo adicional, se recomienda que se enfríe el interior del queso a una temperatura de 6°C dentro de 7 a 10 días. Esto puede requerir arreglos especiales de enfriamiento en algunas fábricas. Se entiende que el "Naturage" está siendo reformulado, por esto algunos detalles pueden ser sujetos de cambio. Dos de los productos (Naturage y Accelasa), recomiendan una temperatura de manipulación durante el almacenamiento de 10°C; lo cual está arriba de la norma industrial (8-9°C). La "Accelasa" y su sugerencia de 12°C, como temperatura de maduración, refuerza ampliamente la creencia de que la temperatura de almacenamiento tiene un papel vital. El sistema de maduración "Werribee", posee una base puramente microbiana. La leche de quesería es inoculada con cepas de bacterias viables antes de iniciar el proceso de elaboración del queso, en adición al organismo iniciador normal. No se agregan enzimas exógenas y, no hay alteraciones en la manufactura o en las condiciones de maduración del queso. El costo es estimado en esta región en 20 dólares americanos por tonelada de queso. El beneficio de éste método incluye aumento de la calidad, y se reduce el tiempo de maduración en una tercera parte. Las altas temperaturas de maduración, parecen tener un costo menor, con mucha facilidad, aunque su adopción depende del adecuado control de calidad. En un queso valorado en 3,000 dólares americanos por tonelada, se ofrece un beneficio de 110 dólares americanos por tonelada. "Flavourage" y "Naturage" ofrecen un mínimo de desviaciones en la maduración y durante todo el proceso de elaboración, por simple adición de un polvo en la tina antes de empezar la fabricación. "Naturage" ofrece una reducción del 10 al 15% del uso del organismo iniciador, debido a la actividad de las bacterias presentes. Tal vez el 15 % de reducción no es suficiente, probablemente se requiera del 20 al 25%. Con el iniciador "DVS", el costo del iniciador se ubica en 70 dólares americanos por tonelada, este ahorro debe ser incluido en los cálculos. Los productos a los cuales se le han aplicado "Accelasa" y "Neutrassa" en la cuajada, deberían ser más baratos que los otros, debido a la gran eficiencia de incorporación. "Hansen Lab.", reconoce que el 90% de su proteinasa se pierde en

el suero. En vista de esto, el costo de "Accelasa" es probablemente una imagen del gasto de la amino-peptidasa purificada en el producto. Estas enzimas pueden ser pre-mezcladas con la sal antes del salado normal. La desventaja principal de éste procedimiento, es la distribución no uniforme de la enzima en el queso. Como la sal, las enzimas simplemente cubren las piezas de cuajada y se difunden lentamente en su interior. Esto puede originar manchas, un tipo de defecto que ha sido notado con el uso de "Neutrasa". Es obvio que hay un incentivo financiero contemplado en el método de maduración con altas temperaturas. El costo de "Flavourage", "Naturage" y "Accelasa", son relativamente altos comparados con los beneficios inherentes; pero resulta que ésta metodología está basada en dos premisas, las cuales son primero los ahorros en costos de almacenamiento debido a la reducción del tiempo de maduración, y segunda, la disponibilidad de una mayor cantidad de queso de buena calidad elaborado por ésta vía. Aunque el potencial de ahorro en el costo del queso es relativamente pequeño comparado con el método de altas temperaturas, bien vale la pena evaluar, que si representa una buena opción en contraste con el método tradicional de fabricación del queso Cheddar. Es importante remarcar que el uso de "Accelasa" demanda el control de la temperatura del queso a 12°C, ya que ésta hace parte del trabajo (Fedrick, 1992).

Con el animo de comparar simplemente los efectos en un queso madurado durante seis meses se realizo un breve estudio, en donde los costos de varios tratamientos han sido suplementados por las compañías involucradas y son exactos hasta éste momento. Todos los productos han sido importados y por ello habrá fluctuaciones en las cotizaciones. Los precios podrían ser reducidos debido a las grandes cantidades que se desplazan en Australia. Los beneficios económicos fueron evaluados por un profesional en economía el Profesor Ken Smith, basado en estimaciones razonables. Aunque probablemente cada factoría estará en una ligera y diferente posición, particularmente considerando que el precio de venta del queso Cheddar aquí es de 3,990 dólares americanos por tonelada, y el porcentaje de interés bancario es del 18%. Se muestra el análisis del costo/beneficio de varias opciones (Tabla 22).

e) Desde que el nivel en la proteólisis en quesos semi-duros es muy limitada, parece que una proteinasa con especificidad limitada sería requerida. Ya que el coagulante (renina), tiene la primicia como proteinasa en la mayoría de los quesos. El incrementar su concentración y/o actividad merece consideración. Normalmente sólo el 6% de la renina agregada a la leche de quesería es retenida en la cuajada después del prensado; la proporción retenida se incrementa ligeramente cuando el pH se reduce durante el drenado del suero. Cuando la concentración de

TABLA 22 . ANALISIS COSTO/BENEFICIO DE LA ACELERACION DE LA MADURACION DEL QUESO .

Temperatura	***En queso de 6 meses / mes.	Costo/Ton. US dolares	Beneficio / Ton.US	Beneficio neto / Ton. US dolares
15° C	3	10	120	110
13° C	4	10	80	70
Flavourage	3	94	120	26
Naturage	3	115	120	5
Accelasa	3	105	120	15
Neutrasa	4.5	20	80	40
Sist. Werrabee	4	20	80	60

*** Considerando 6 meses como tiempo de maduración del queso Cheddar .

FUENTE : Fedrick , 1992 .

renina se elevó más de 4 veces en la elaboración de queso Cheddar, el porcentaje de formación de nitrógeno soluble, pero no de aminoácidos, se incrementó. Esto concluye que cuando se incrementa la proporción de coagulante se obtiene mediante la hidrólisis de la caseína peptidos amargos, pero no aminoácidos que son los responsables del sabor. El queso elaborado con acidez excesiva sufre una proteólisis más rápida de lo normal, debido a la mayor accesibilidad de las caseínas en la rápida acidificación de la cuajada resultado de la solubilización del fosfato cálcico coloidal. Lo cual confirma que la acidificación promueve la proteólisis en queso Cheddar elaborado con renina de ternera. Por esto la posibilidad de acelerar la maduración del queso Cheddar a través del el uso de un mayor nivel de renina parece ser no realista (Fox, 1993).

f) *Lactobacillus casei-casei* L2A, fue aislado de un queso Cheddar de excelente calidad, y fue mezclado con *Lactobacillus cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, los cuales se usaron como microorganismos iniciadores. El queso inició su manufactura pesando 225 L de leche, la cual fue pasteurizada a 73°C por 16 seg. El iniciador se agregó a la leche en una concentración de 1.5% v/v. La renina (50% bovina y 50% porcina), se adicionó al 0.02% v/v. Después de seguir el método descrito en el capítulo III, el queso obtenido fue almacenado 1 semana a 4°C, seguido por un añejamiento durante 2 meses a 13°C. Para atenuar a los *Lactobacillus casei-casei* L2A vivos, con choque térmico, se metieron a baño de agua a 67°C durante 22 seg; su mortalidad fue de 94.5%, pero su actividad proteolítica no fue afectada; fueron agregados antes de adicionar la renina a la leche. La "Neutrasa" proteasa extraída de *Bacillus subtilis*, se obtuvo de Novo Inds., en forma granular con una actividad de 1.5 AU/g; se prefirió en ésta forma que en líquido, debido a su altísima estabilidad y su facilidad para ser mezclada con la sal. En los análisis del queso a 1 mes de añejado, se compararon la grasa, humedad, y sal. Aunque el contenido de proteína fue significativamente más alto en los quesos experimentales que en los controles durante la maduración. Los parámetros fisicoquímicos fueron estables a través del añejamiento excepto el pH, el cual se incrementó con el tiempo y fue significativamente inducido a la baja por las bacterias adicionadas. La fracturabilidad del queso como función del tiempo, mostró un decremento sobre la maduración. El queso control fue uno de los menos fracturables durante los 9 meses del período de maduración. La adición de la "Neutrasa" en concentración de 4.0×10^{-5} AU/g en queso, mostró la más alta eficiencia en reducir la fuerza necesaria para fracturar al queso. Después se suplementaron los quesos con "Neutrasa" al 1 y 2×10^{-5} AU/g. La cohesión seguida de un decremento en la curva a través de la maduración, fue influenciada principalmente por la concentración de "Neutrasa"; los quesos control presentaron casi el mismo esquema que los quesos experimentales, sus valores de cohesividad

permanecieron más altos a través de la maduración. La composición del queso, fue modificada por los tratamientos usados. El contenido de proteína de los quesos experimentales, mostró un ligero pero significativo incremento, el cual persistió a través de la maduración. Este incremento puede ser explicado por la presencia de la parte proteínica de las bacterias y enzimas adicionadas. Los valores de pH de los quesos experimentales, fueron más bajos a través del proceso de maduración, comparado con los quesos control. La producción de ácido láctico por la presencia de *Lactobacilli* vivo, fue el principal factor que generó la baja en el pH. Mientras que la "Neutrasa" liberó péptidos que neutralizaron parcialmente el efecto del ácido láctico. El pH bajo es reconocido como contribuyente en la textura del queso por el decremento en la fuerza de fracturación. Aunque en éste estudio, el efecto del pH no fue claramente observado debido al muy pronunciado efecto de la "Neutrasa" en el debilitamiento de la red caseínica. Este descenso en el pH fue general en todos los quesos como resultado de las diferentes sendas metabólicas durante la maduración. El análisis de variancia de los índices fisicoquímicos mostraron que el balance entre los componentes básicos del queso, no fueron alterados por los tratamientos. Basados en la clasificación propuesta por Lawrence et al., en 1984, todos los quesos se ubicaron dentro de los estándares de "Primera clase", y muchos calificaron como de "Excelente calidad". El "score" de intensidad de sabor dado por los expertos permitió el cálculo del % de incremento en el sabor durante la maduración que resultó del 60%. Los resultados muestran en base corta y media una buena correlación entre el % de incremento y la intensidad del tratamiento. Se consiguió la reducción del tiempo de maduración de un 30 a 50%. En los quesos suplementados con "Neutrasa" se observó una alta concentración de amargura. Los defectos de textura no fueron directamente asociados con la intensidad de los tratamientos, pero si parcialmente por el pH. El proceso recomendado es la adición de "Neutrasa" cuya concentración se encuentre en 1.0×10^{-5} AU/g. Para controlar la microflora indeseable, se puede adicionar *Lactobacillus casei-casei* L2A, en una concentración no mayor de 4.0×10^{-5} AU/g para mantener el pH en un nivel balanceado (Varman and Shuterland, 1995).

g) La adición de *Lactobacillus casei-casei* L2A vivo atenuado por choque térmico y "Neutrasa", fueron probados por su habilidad para acelerar la maduración de queso Cheddar. Una evaluación de las propiedades fisicoquímicas mostró que el pH del queso fue más bajo debido a los aditivos enzimáticos y bacterianos, y la fracturabilidad y cohesividad fue influenciada por la "Neutrasa". El proceso integrado recomendado está compuesto por tres partes : la primera es la adición de *L. casei-casei* L2A, para controlar la

microflora indeseable; segundo, células atenuadas por choque térmico de la misma especie en una concentración de 1.0%; y tercero, "Neutrassa" en una concentración no más alta de 1.0×10^{-5} AU/g de queso. Este proceso permite obtener un queso Cheddar de muy buena calidad con un 60% de incremento en la intensidad del sabor, comparado con el queso control. La producción de queso Cheddar madurado representa un costo considerable para la industria del queso. Además de esto, los requerimientos para la pasteurización, bajando el contenido de bacterias ácido lácticas en la leche incrementaría el tiempo necesario para producir el queso madurado. Estos dos aspectos enfatizan la importancia de investigar como reducir el tiempo de maduración. La maduración es un proceso más bien complejo, que involucran cambios en el sabor y también en la textura. La hidrólisis de la caseína por la renina provoca un debilitamiento en la red caseínica; la humedad, grasa, y contenido de sal, así como el pH también como la temperatura de almacenamiento afectan el porcentaje de degradación de la caseína, la consistencia del queso, por acción directa de cada uno o por interacción recíproca. Todos los reportes están de acuerdo en el decremento de los parámetros de la textura en relación a la hidrólisis de la caseína. Además los extractos bacterianos y/o las enzimas agregadas al queso, para acelerar su maduración resultan en cambios más pronunciados en textura como consecuencia de la proteólisis. Este estudio, tiene la expectativa de acortar el proceso de maduración del queso Cheddar por lo menos al 50% o más. Los quesos fueron suplementados con "Neutrassa" comercial ("Novo"), y/o células de *L. casei-casei* L2A. Se prefirieron los lactobacilos a los lactococos, por su buen crecimiento en queso, además ésta cepa es conocida por su alto perfil de proteasa, permitiendo la degradación de péptidos responsables de la amargura (Godfrey and West, 1996).

h) Se agregó plasmina (E.C.3.4.21.7), a la leche de quesería para contribuir a la proteólisis de queso Cheddar; la actividad de la plasmina en queso fue incrementada en niveles de 1.5 a 6 veces más que en los quesos control. Aún en el nivel más alto de adición de la plasmina no se detectó actividad en el suero. La caseína "beta", fue degradada más rápidamente en los quesos experimentales que en los controles, y la concentración de péptidos se incrementó concomitantemente. El total de nitrógeno soluble se fue para arriba más o menos 20% más alto que en los quesos control, pero el nitrógeno obtenido vía "ácido- fosfotungsténico", no fue afectado por la actividad de la plasmina en el queso. La calidad organoléptica de los quesos enriquecidos con plasmina, fueron juzgados como superiores comparados con los controles; el añejamiento fue considerablemente acelerado; el nivel óptimo de adición de la plasmina, se ubicó de 3 a 4 veces su valor normal

en leche. No se detectó amargura en ninguno de los quesos. La renina de ternera se obtuvo de "Chr. Hansen Lab.", la plasmina se obtuvo de "Sigma Chemical Co." de origen porcino en paquetes de 50 U, y el microorganismo iniciador fue *L. lactis subsp. lactis* UC 317, obtenido del banco del departamento de microbiología alimenticia de la Universidad de Cork Republica de Irlanda. Cada paquete de plasmina se disolvió en 90 ml de agua destilada, de ahí se tomó por un lado 30 ml y por otro 60 ml; estas se adicionaron directamente a 22.5 L de leche de quesería a 30°C; previamente pasteurizada a 72°C por 15 seg, para garantizar su incorporación la leche se agitó 3 minutos, se adicionó 2% (v/v) del iniciador y 6 ml de renina; se desarrollo el procedimiento descrito en el capítulo III, y el queso Cheddar resultante se maduró durante 6 meses 10°C. Todos los quesos obtenidos presentaron calidad aceptable o buena. La plasmina puede contribuir con amargura en el queso porque a través de su acción, se producen péptidos hidrófobos los cuales se piensa que son amargos; en éste estudio, la amargura no fue detectada en ninguno de los quesos en ningún tiempo durante la maduración. La habilidad de la plasmina para enlazarse a las micelas caseínicas, es una característica muy atractiva ya que garantiza una cobertura completa y una distribución uniforme en la cuajada. Por esto, el uso de la plasmina para acelerar la maduración del queso es promisorio, ya que agregada a la leche de quesería en forma acuosa, se incorpora totalmente a la cuajada. La más seria limitación del uso de la plasmina para éste propósito, es que resulta muy costosa (Neelakantan, Mohanty and Kaushik, 1999).

CAPÍTULO VI. Evidencias de acelerar enzimáticamente la maduración de otros tipos de queso, diferentes al Cheddar.

La técnica de acelerar el tiempo de maduración por medio de enzimas se ha empleado en diversos productos alimenticios, tal es el caso de los siguientes :

a) La mayoría de los quesos requieren un período mínimo de maduración para adecuar el grado de la intensidad de su sabor, y sólo ante ello, son aceptables al consumidor. Ya que el añejamiento debe ser llevado a cabo bajo condiciones controladas, el almacenamiento representa una porción en el costo de la operación en la industria quesera actual. La maduración es un tiempo más prolongado para quesos duros que para quesos con alta humedad, como resultado, la aceleración de la maduración ha sido usada preferentemente con ésta clase de quesos. El queso "Feta" es suave, salado en salmuera y se elabora a partir de leche de ovejas; y es ampliamente consumido en los "Balcanes", necesita 3 meses de maduración. Se obtuvo exitosamente la aceleración de la maduración de ésta variedad, mediante la adición de 2% de cultivo de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* (1:3), atenuados por choque térmico de 40 a 63°C durante 4 min, o la adición de 2g/5ml de solución de proteinasa ácida de *Aspergillus oryzae* (Proteinasa S), o agregando 720 mg/5ml de solución de proteinasa neutra de *Bacillus subtilis* (Proteinasa N), antes de la adición de la renina a la leche para quesería; para guardar un debido balance en el sabor del queso resultante, en todos los ensayos se les agregó lipasa de borrego de 0.1 a 0.2g/100Kg de leche; los quesos fueron madurados más de 8 meses a 5°C. El pH de los quesos varió de 4.8 a 4.9 en el tercer día de añejamiento, y descendió hasta 4.4 - 4.6 cuando los quesos tuvieron 8 meses. Ello no se consideró como diferencia significativa. A los 40 días en todos los casos se encontró al nitrógeno soluble hasta en un 35% más alto comparado con el queso no tratado. Además en este periodo de tiempo los quesos tratados desarrollaron intensidad de sabor, cuerpo y textura típicos de un queso con 80 días de maduración. Aumentando las cantidades de enzimas y/o de cultivo atenuado sólo se consiguió amargura. Los quesos que presentaron mejores características organolépticas fueron los tratados con cultivo atenuado por choque térmico, seguidos por aquellos tratados por proteinasa neutra o proteinasa ácida (Vafopoulou, Alichanidis and Zerfiridis, 2000).

b) Se estudió el efecto acelerante de las enzimas lipolíticas, proteolíticas y glicolíticas, en la maduración del queso duro tipo español, de acuerdo método de elaboración del queso "Manchego". Por largos años se han intentado por varios caminos acelerar la maduración del queso, inclusive en diversos países. Uno de los métodos más promisorios empleados es la adición de enzimas disponibles comercialmente a la cuajada; Sood & Kosikowski (1979), en queso Cheddar y

Rhida et al., 1984 en queso egipcio (Ras), Panhkala 1985 en queso Edam, Gripon et al., 1982 en queso Saint Paulin, Jolly & Kosikowski 1975 en queso Azul, entre otros, emplearon éste método con mucho éxito. Los resultados de estos estudios indican que el efecto de la adición de enzimas no es exactamente el mismo para diferentes tipos de queso, y de aquí las conclusiones alcanzadas para un queso no pueden ser extrapoladas a otros quesos. Ya que no hay datos disponibles acerca de la maduración del queso español, y desde que el queso Manchego es la más importante variedad quesera fabricada y consumida con leche de vaca en España, es nuestro interés el establecer las condiciones para la aceleración de la maduración bajo la adición de enzimas. Para tal efecto se emplearon : "Palatasa A 750 L", una lipasa obtenida de *Aspergillus niger*, "Lactozima 3000 L" una beta-galactosidasa obtenida de *Kluiveromices fragilis*, y "Neutrassa 0.5 L" una proteasa neutra obtenida de *Bacillus subtilis*, todas ellas fueron abastecidas por Novo Inds. Todos los quesos fueron manufacturados el mismo día y de la misma leche, de acuerdo a el método tradicional para la producción industrial de queso Manchego. Después de la pasteurización se dividió en 4 lotes siendo el número 1 el testigo, el dos con la "Palatasa A 750 L" (1ml/20 L de leche), se agregó antes de la renina; el tres con la "Lactozima 3000 L" (8ml/3Kg de cuajada), y el último con la "Neutrassa 0.5 L" (0.075ml/ Kg de cuajada). La Maduración se llevó a cabo durante 45 días a 12°C con la humedad relativa del 85%. Se concluyó que con la presencia de "Neutrassa" se incrementó considerablemente el grado de proteólisis. La adición de "Lactozima" no afectó el contenido de nitrógeno soluble ni el de nitrógeno no proteico. Se han encontrado diversos estudios con incremento en las fracciones solubles de nitrógeno, cuando se ha adicionado "Maxilact" (beta-galactosidasa de *Kluiveromices lactis*), al queso Cheddar; pero así también, se determinó que estos incrementos son debidos a la presencia de proteasa contaminando al "Maxilact". El uso de "Palatasa", no presentó más que una ligera contaminación en la actividad proteásica; sin embargo se reportaron cambios significativos en el contenido de ácidos grasos con la adición de ésta lipasa (alrededor del 20%, comparando contra el patrón); este incremento no fue parejo en todos los ácidos grasos, se notó básicamente en los de cadena larga como mirístico, palmítico, esteárico, y oléico. Desde el punto de vista sensorial, la textura de los quesos fue apreciablemente mejor en aquellos a los cuales se les agregó "Palatasa", y "Lactozima", ya que los quesos adicionados con "Neutrassa", presentaron una consistencia "desmoronable", acompañada de un ligero sabor amargo (Fernández-García y Ramos, 1992).

c) La maduración es un proceso lento, costoso, y parcialmente no controlado, con algunos resultados no predecibles. Por ello consecuentemente existe interés en acelerarlo a través de la adición de proteinasa bacteriana, y proteinasa fúngica

sobre la cuajada. Este estudio determinó el efecto de agregar concentrado proteolítico de *Bacillus subtilis* (1,2, y 3 mg/ 100 Kg de cuajada), y proteasa fúngica de *Aspergillus orizae* (4,5, y 6mg/100 Kg de cuajada), en la calidad del queso egipcio "Ras". Las evaluaciones las llevaron a cabo 10 panelistas entrenados en el departamento, dando 100 como calificación máxima. El queso "Ras" fue elaborado de acuerdo a Hofi et al., a partir de leche fresca de vaca; después de 120 días de añejamiento el queso control presentó consistencia firme y lisa, sabor a queso y aroma medio, su puntuación fue de 86; el queso tratado con 4mg de proteasa fúngica/100 Kg de cuajada, desarrolló un sabor típico de queso "Ras" y obtuvo una calificación de 89; el queso tratado con 5mg de proteasa fúngica en 100 Kg de cuajada, mostró una consistencia buena y compacta y un típico sabor calificado con 89 (sólo después de 90 días de añejamiento); el queso tratado con 6mg de proteasa/100Kg de cuajada, presentó sabor desagradable y su puntuación fue de 71. El queso tratado con 1mg de concentrado proteolítico de *B. subtilis*, tuvo buen cuerpo, y aroma distintivo, calificó con 89; los quesos con 2 y 3mg de concentrado enzimático presentaron amargura, lo cual indica el rompimiento proteínico con liberación de péptidos amargos, cuerpo desmoronable y calificados con 86 y 69 respectivamente. Por esto la adición de 4 y 5mg de proteasa fúngica en 100 Kg de cuajada incrementan la calidad y acortan el período de maduración del queso elaborado por ésta vía (Mohamed et al., 1992).

d) Las enzimas comerciales han sido ampliamente probadas como agentes potenciales para acelerar la maduración del queso, beta-galactosidasas, lipasas, proteasas, y también las mezclas de ellas se han probado. El queso Manchego es uno de los principales quesos duros españoles, que originalmente se elaboran con leche de oveja; aunque actualmente en su elaboración se emplea una parte importante de leche de vaca; la aceleración de la maduración se haría en éste último tipo de queso debido a que el original posee "Apelación de origen", y en el cual el uso de enzimas sería probablemente no autorizado. El estudio se realizó empleando la preparación comercial conocida como "Flavorage" (Christian Hansen Lab.), que consiste en una mezcla de proteinasa, peptidasa y lipasa de *Aspergillus orizae*, su actividad lipolítica muestra que tiene alta especificidad para hidrolizar triglicéridos de cadena media; se debe agregar antes de la adición de renina, aunque más del 90% de la lipasa permanece en la cura mientras que el mismo porcentaje de proteasa se pierde en el suero. Para el experimento, se usaron como microorganismos iniciadores a *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. La leche usada fue 70% de oveja y 30 % de vaca la cual se pasteurizó a 74°C durante 30 seg. Se adicionó "Flavorage" 50 mg/ Kg de leche 5 minutos antes de la renina. La maduración se llevó a cabo durante 150 días a 10°C con humedad relativa del 85%. La adición de ésta cantidad de

"Flavorage" se seleccionó, siendo el doble de lo que recomienda el fabricante considerando que las caseínas ovinas son más resistentes que las bovinas a la acción de las proteasas. No se detectó amargura en los quesos elaborados con esta alta cantidad de mezcla enzimática, el nitrógeno soluble resultó mayor en el queso tratado; la calificación que recibió el queso con enzimas, fue superior al no adicionado con ellas (Fernández-García y Olano, 1993).

e) Una preparación enzimática obtenida por extracción acuosa de las flores de cardoon (*Cynara cardunculus*), han sido usadas desde la era romana en la región mediterránea para la manufactura de queso elaborado de leche de vaca. La actividad coagulante de este extracto resulta de por lo menos tres enzimas proteolíticas localizadas en la parte violeta de las flores. Estas enzimas llamadas "Cinarasas o Ciprosinas", han sido purificadas y caracterizadas. Las "Ciprosinas" son endopeptidasas glucosadas perteneciendo al grupo de proteinasas aspárticas, cuya actividad máxima se encuentra a pH de 5.1; estas proteinasas abren la caseína "kapa", en la misma forma que lo hace la quimosina, liberando un glicomacropéptido. También pueden exhibir hidrólisis no específica sobre las proteínas de leche ovina y bovina. Los quesos elaborados con esta preparación enzimática son altamente apreciados, pero su rendimiento, se reduce considerablemente por la alta actividad proteolítica de las "Ciprosinas"; las pequeñas diferencias (0.1%), en el rendimiento, son económicamente importantes. La encapsulación de las "Ciprosinas", en liposomas provee buena distribución en la cuajada, por la prevención de la interacción con las proteínas de la leche durante el proceso de manufactura quesera, eliminando la disminución del rendimiento y las pérdidas de enzima en el suero. El objeto del estudio, fue determinar el efecto causado por la adición de "Ciprosinas" encapsuladas en la aceleración de queso Manchego. La leche fue pasteurizada a 75°C durante 15 seg se inoculó con 1% de cultivo de *L. lactis*, se adicionó renina 5.3 ml (1:15 000 v/v), y 40 ml de suspensión de liposomas; se elaboró el queso de acuerdo al método tradicional, y se maduró durante 60 días a 12°C. Los resultados muestran, que las características químicas, texturales, y sensoriales del queso Manchego fueron influenciadas por la adición de "Ciprosinas" encapsuladas sobre la leche de quesería, su efecto fue más perceptible en los primeros días del añejamiento; de la misma forma la proteólisis fue considerablemente incrementada, no se encontró amargura y la textura del queso tratado fue más ligera que la del queso control. De acuerdo a la literatura, la aceleración de la intensidad del sabor resultó menos pronunciado, que el debido a la acción de la proteinasa neutra de *B. subtilis* (Serrano, Picon y Gaya, 1995).

f) Se estudió el efecto de agregar dos enzimas pepsina y tripsina, para acelerar la maduración del queso "Ras". Los resultados muestran que las dos enzimas no tienen efectos particulares en los cambios en la humedad, contenido de sal, grasa, pH, y nitrógeno total durante el añejamiento. La pepsina tiene un considerable efecto en la acumulación del grado de nitrógeno soluble en queso, cuando es comparada contra la tripsina y el control. El queso "Cephalotere", mejor conocido como "Ras" es en el mercado egipcio, el más popular y con mayor aceptación. Se elaboró el queso "Ras" de acuerdo a Hefnawy; 0.9g de polvo de pepsina (Merck Lab.), se disolvió en 100 ml de agua y se agregó a 7Kg de cuajada, se mezclaron perfectamente, se colocaron en los moldes y se prensaron. Asimismo, 0.6g de polvo de tripsina (Merck), se disolvieron en 100 ml de agua y la solución con la enzima se mezcló de la misma manera descrita anteriormente. Las muestras se tomaron a las 6 y 12 semanas. Los efectos de agregar pepsina y tripsina, sobre la cuajada de queso "Ras", mostraron que el contenido de humedad fue considerablemente más alto en el queso fresco y tendiente a la baja con el añejamiento acelerado. Contrariamente, el contenido de grasa se incrementó durante el añejamiento; se notó un incremento gradual del contenido de sal con el desarrollo de la maduración, y la progresiva pérdida de humedad probablemente debido a la absorción de la sal esparcida por ósmosis. El contenido de nitrógeno total se incrementó gradualmente durante el añejamiento, lo cual se atribuye a la pérdida de humedad durante la maduración. El contenido de nitrógeno soluble en el queso tradicional se encuentra entre 0.15 a 0.17%; los valores se incrementaron durante el añejamiento con amplias variaciones; para los quesos madurados por 6 semanas con tripsina 0.67%, con pepsina 0.87%, y 0.62% para el control. Quedó claro que los valores más altos de nitrógeno soluble se encontraron en queso mezclado con pepsina. El pH del queso fresco se ubica entre 5.6 y 5.7; en los diversos tratamientos, se alcanzó 4.9 en seis semanas, estos cambios en el pH ofrecen una cómoda atmósfera para la activación de la pepsina. El decremento gradual en el pH fue principalmente debida al desarrollo de ácido láctico vía fermentación de la lactosa. Un ligero incremento en el valor del pH se notó al término del período de maduración, el cual puede ser debido a la formación de materiales alcalinos de las sustancias nitrogenadas solubles. Las evaluaciones organolépticas mostraron que el queso tratado con pepsina fue aceptado para el consumo y puede ser comercializado después de seis semanas de maduración (Hefnawy, 1996).

g) En el centro de investigación de Zilina Republica Checoslovaca, se han estudiado las propiedades proteolíticas de los cuajos disponibles que pueden ser adecuados para dirigir la proteólisis y para acelerar la maduración de quesos ya que ésta técnica se usa solo indirectamente. Se conocen dos métodos para añadir

las proteasas, en la leche pasteurizada o en la caseína después de eliminar una parte del suero. Las cantidades de enzimas que añaden a la leche, son desde 0.0002 hasta 0.05%; en caso de añadirlas a la caseína disminuye hasta 10 veces. Se han probado las siguientes enzimas proteolíticas : cuajo de ternera con una fuerza de 1: 10 000 SU, pepsina de cerdo con una fuerza de 1: 10 000 PJ, "Renilaza 14 L" (cuajo líquido de *Mucor miehe*), cuya fuerza 1:14 000 SU, pepsina de pollo con una fuerza de 15 000 PJ, y proteasa natural en polvo (Protosubtilina G10). Las pruebas se realizaron bajo condiciones de laboratorio debido a que ahí se encontró un ambiente más controlado. La elaboración de el "Ladrillo de Eidam", tradicional queso de bola, se realizó una vez que la leche se pasteurizó a 72°C por 15 seg inoculada con 0.05% de cultivo láctico, 10gr de cloruro cálcico, y 0.02% de enzima proteolítica; se completó el proceso de elaboración según Udajová. Las pruebas se realizaron tres veces en paralelo. Se observó que la mayor proteólisis la presentó la proteasa natural, seguida por la pepsina de pollo, pepsina de puerco, "Renilaza" y por último el cuajo de ternera; expresada en un 17% más de nitrógeno soluble, una consistencia 14% más blanda y una mejor calificación sensorial (Herian y Rizman, 1997).

h) Se determinó el efecto de encapsular la lipasa de *Penicillium caseisolum* en liposomas, adicionándola a la leche para preparar un tipo de queso Manchego. La actividad de la lipasa producida por *Penicillium caseicolum*, es más específica hacia los ácidos grasos de cadena corta, en especial el ácido butírico; y estos últimos son en parte los responsables del aroma y sabor característico de los quesos tipo Cheddar (Manchego). Se pasteurizó la leche a 63°C durante 30 min, se adicionó el cultivo láctico, además 555 ml de la suspensión de lipasa encapsulada en liposomas, se agregó el cuajo 15ml/100 L de leche (1: 10 000), se obtuvo un queso tipo Manchego, y se maduró a 5-6°C durante 3 meses, con humedad relativa del 50 al 60% (en un Refrigerador "Kelvin"). El perfil de ácidos grasos libres generado durante el proceso de maduración en las condiciones mencionadas sufrió un cambio paulatino y progresivo, el testigo liberó ácidos grasos más despacio que el queso tratado con lipasa; el ácido butírico fue similar al principio de la maduración en ambos quesos, pero al finalizar el período de los 90 días, presentó más del doble en su concentración en el queso adicionado con enzima, asimismo, existió una disminución en el contenido de ácidos "mirístico", "palmítico", y "oléico" de los 30 a los 60 días de maduración, esto se puede atribuir al hecho de que éstos ácidos están siendo degradados y transformados en otros compuestos como "metil-cetonas", principalmente la "2-nonanona", debido a la flora bacteriana presente. Estos ácidos a su vez, son importantes porque son el principio de la cadena de reacciones que se producen para generar

una gran variedad de compuestos, como metil-cetonas y alcoholes secundarios, que son los responsables del sabor de estos productos. Diversos autores como Law en 1984 y Moskowitz en 1987, señalaron la importancia de los ácidos grasos en el sabor de los quesos madurados, así como el de otros productos principalmente de los derivados de la degradación de las proteínas. Conocer el contenido de ácidos grasos libres de un queso no explica en su totalidad los aspectos de la composición de su sabor y olor. Del análisis sensorial, se desprende que, la nota a sabor lácteo se percibió con mayor intensidad en el queso testigo; el sabor y aroma del queso tratado enzimáticamente son diferentes a la del queso control. Se confirma que el sabor lácteo es un atributo característico de los quesos poco madurados, y el sabor a rancio es una nota característica de los quesos madurados, provocado principalmente por una alta concentración de ácido butírico; el queso adicionado con lipasa, presentó una nota más amarga que el testigo, lo cual probablemente se deba a una mayor presencia de ácidos grasos libres de cadena larga y mediana generados al principio de la maduración (Arenas, 1998).

i) Se usaron preparaciones enzimáticas para elaborar el queso "Petit-Ossau-Iraty", elaborado con leche bronca o pasteurizada de oveja en el sur de Francia, y es uno de los 33 quesos acordados con "Apelación de origen" cuya maduración debe ser por lo menos de 90 días. Numerosos estudios se han desarrollado para acelerar la maduración del queso, cuyo interés se ha despertado a nivel mundial, en particular sobre el queso Cheddar elaborado con leche de vaca; sin embargo un poco de investigación se ha enfocado en los quesos elaborados con leche de oveja, debido a su bajo nivel de producción, y porque algunos se encuentran regulados bajo normas regionales muy estrictas, sobre todo en España con el queso "Manchego", y con el "Feta" en Grecia. La maduración del queso involucra una serie de cambios fisicoquímicos, resultado de reacciones lipolíticas, proteolíticas y glicolíticas, soportada por un número de elementos siendo los más importantes aquellos que afectan el desarrollo de las características sensoriales durante el añejamiento. Dentro de los procesos bioquímicos, la proteólisis puede ser el contribuyente más importante en el aroma, sabor y textura. Se puede definir la proteólisis primaria como el uso de las caseínas "alfa", "beta" y "gama" como sustratos resultando en la liberación de aminoácidos y péptidos, que contribuyen directamente en el sabor y aroma del queso, o indirectamente a través de el rompimiento de aminoácidos en aminas, ácidos, tióles, péptidos y productos formados por la hidrólisis de la caseína. Cinco lotes experimentales de y un control, se prepararon con 200 L de leche de oveja pasteurizada a 72°C durante 20 seg, incubándose con cultivo iniciador (Flora Danica 50 U, Sochal 92300 Levallois-Perret), 2 g/100 L; se adicionó 10 g/100 L de preparación enzimática (Tabla 23).

TABLA 23. PREPARACIONES ENZIMATICAS USADAS EN CADA LOTE .

LOTE	TIPO	COMPOSICION
T	Control	
L1	Lipasa	Lipomod 187 (1000UE)
PP	Proteasa	Promod 215 (200UE)
P1	Proteasa	Promod 215 (80UE)
P2	Proteasa	Promod 192 (40UE)
L3	Lipasa	Lipomod 338 (1000UE)

FUENTE : Izco, Torre y Barcinia , 1999 .

Después de adicionó la renina 18 ml/100 L. El queso obtenido se elaboró de acuerdo al método tradicional y se añejó a 12°C, durante 120 días, con humedad relativa no mayor al 80%. Los estudios realizados mostraron que el grado de proteólisis aumentó en los quesos tratados con enzimas proteolíticas en 60%; no así con aquellos en los que solamente se agregaron enzimas lipolíticas (Izco, Torre y Barcinia, 1999).

6.1 Evidencia del uso de la maduración enzimática acelerada en productos alimenticios, distintos al queso .

El concepto de elaborar queso y embutidos es en muchas maneras muy similar por ejemplo, el decremento del pH debido a la acción de las bacterias lácticas, con cambios en la textura después del período de añejamiento adonde se consigue un producto maduro. Nuestro laboratorio ha tomado la investigación del uso de proteinasas de bacterias lácticas como aditivos para obtener la aceleración en la maduración de embutidos secos fermentados. Esta estrategia fue seleccionada por dos razones :

- 1) debido a que las bacterias ácido lácticas tendrán una influencia más ubicada y adaptada para funcionar durante el proceso de fermentación.
- 2) la probabilidad de obtener éxito en el "traje a la medida" con las cepas produciendo proteinasa "in situ", por la ingeniería genética, es más alta si se usan genes de bacteria de la misma familia.

El trabajo se enfocó a la serino-proteinasa de *L. paracasei subsp. paracasei* "NCDO 151". Después de 14 días los embutidos con proteinasa NCDO 151, mostraron una pérdida de peso de alrededor del 30%, mientras que los embutidos testigo, necesitaron otros 14 días más para perder el 37% de su peso. Esto demuestra uno de los potenciales económicos de la inducción de proteinasa en la producción de embutidos secos fermentados. La cantidad de productos de degradación protéica, también fueron superiores. El efecto de agregar lipasa a los embutidos secos ya se ha estudiado por Fernández et al., en 1995; no se detectó efecto acelerante con la adición de lipasa. Aparte de la contribución de las especies empleadas, los componentes del sabor son derivados de proteínas, grasa y del rompimiento de carbohidratos, y es un proceso dependiente de la actividad de las enzimas endógenas y exógenas. La actividad de las enzimas endógenas, junto con el ácido láctico producido por el cultivo iniciador, se cree que son los más importantes en el desarrollo del sabor cárnico fermentado; la contribución de las bacterias no-lácticas en la formación de color y sabor es reconocida

como se demuestra por el uso de cultivos iniciadores no productores de ácido de la familia *micrococcaceae*. Se concluye que la serino-proteinasa de *L. paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151, puede ser usada para acelerar la producción de embutidos secos fermentados. El tiempo de elaboración se reduce de 30 a 50% con el uso de ésta proteinasa (Blom et al., 1996).

CAPÍTULO VII. Regulación.

7.1 Antecedentes.

Los conservadores anti-microbianos de los egipcios y griegos se seguían utilizando, además de otras sustancias nuevas que conferían ciertas características a los alimentos más importantes como el pan. Eran muy usados los alumbres, como el potasio para esponjar, y el yeso como blanqueador. Se le adjudicaban propiedades como conservador del vino a la mostaza, origen de su nombre, ya que deriva del mosto, al que se añadía para que no se fermentara, el bórax era muy utilizado con el mismo fin, empleándose como conservador hasta que la legislación británica lo prohibió en 1925. Referencias de adulteraciones y fraudes ocurren con frecuencia en la literatura clásica, teniéndose que implementar castigos a los infractores, el ejemplo más antiguo existe en el Código de Hamurabi, y posteriormente en Roma y Atenas eran frecuentes las adulteraciones del vino con olores y especias, nombrándose inspectores especiales para vigilar que esto no sucediera. En Inglaterra, por el año 1200, en el reinado de John, se proclamó un "Edicto" para cuidar la calidad del pan, y en el reinado siguiente de Henry III se castigaba con la picota, "pillory and tumbrel" a los panaderos deshonestos, junto a los carniceros, cerveceros, vinateros y otros, con el fin de proteger al consumidor. En el Rin de Alemania en 1482, un falsificador de vinos fue condenado a beber seis litros de su vino, lo que le ocasionó la muerte. Paracelso (Teofrasto Bombastus von Hohenheim), revoluciona la medicina cuando comenta que la diferencia entre un medicamento y un veneno "es únicamente cuestión de dosis". Conviene recordar que "Pharmakon" significa en griego veneno, y así aparece en el juramento hipocrático. Por una mala traducción se asigna el significado de veneno a tóxico, cuando en griego "Toxikoi" significa flecha. El remedio más socorrido por Paracelso eran las sales de mercurio, para casi cualquier padecimiento; no es de extrañar, que el pueblo comentara en voz baja, "que muchas veces era peor el remedio que la enfermedad". Un gran impulso al control de calidad sanitaria de los alimentos surge en el siglo XII con los "Gremios". Para ingresar a pertenecer a un "Gremio" se exigían bastantes requisitos y un aprendizaje de cinco años, con "Ordenanzas" que se tenían que respetar, pues los castigos eran muy severos. En Francia existen "Ordenanzas" que abarcan desde 1330 hasta 1672, prohibiendo la mezcla de dos vinos diferentes, el castigo era su confiscación. Por esas épocas todos los reyes empiezan a vigilar las condiciones adecuadas para la distribución y venta de los alimentos. Era habitual que el responsable de esa vigilancia fuera su médico de cabecera, al que se le conocía como "Protomédico". En la ciudad de México el primer "Protomédico" fue Francisco Hernández, médico de Felipe II. Ponía especial cuidado en las carnicerías y al que

vendía carne descompuesta, le cortaba una oreja, con ese castigo era difícil que reincidieran más de dos veces; sus funciones eran múltiples, tenía que vigilar que los médicos estuvieran titulados para poder ejercer, y debía visitar las farmacias periódicamente y cuidar de los servicios de agua y la recolección de la basura. El tribunal de "Protomedicato" fue eliminado hasta el año de 1833, cuando se sustituyó por el "Establecimiento de Ciencias Médicas" el cual ejerció hasta el 24 de enero de 1842, día en que el gobernador del Distrito Federal Luis J. Vieyra, publica un "Reglamento de la Enseñanza y Policía Médicas", cambiando su nombre por el de "Escuela de Medicina". El 4 de enero de 1841, se creó el "Consejo Superior de Salubridad" para llenar las funciones de sanidad pública, que dependía de la "Secretaría de Gobernación". El Dr. Eduardo Liceaga presidente del "Consejo" somete al Ministerio de Gobernación un proyecto de "Código Sanitario" que se promulga el 15 de julio de 1891, proponiendo simultáneamente la necesidad de crear un "Ministerio de Salubridad", aunque tendrían que transcurrir 50 años para que se cristalizara la segunda proposición. La inspección de alimentos y bebidas empieza en nuestro país en 1875 teniendo que cumplir con las medidas sanitarias en vigor. Merece notarse que el primer "Código Sanitario Mexicano" antecede a la "Wiley act" por 15 años. En 1883, el Dr. Harvey Wiley es nombrado químico principal del "Department of Agriculture of the U.S.A.", y su misión principal fue la de mejorar la calidad sanitaria y la seguridad de los alimentos. Entre las sustancias que podrían presentar riesgo para la salud, se pensó en primer lugar en los pigmentos que se estaban empleando. El interés de Wiley, originó la "Pure Food and Drug Act" en 1906, conocida coloquialmente como la "Wiley Act", mediante la cual, se consiguió prohibir el uso de sustancias que eran nocivas a la salud, así como evitar que los colorantes se utilizaran para enmascarar una calidad inferior y no para restituir los colores originales. En el año de 1878, el gobierno del Distrito Federal, publica un bando relativo a las sustancias que por dictamen del "Consejo Superior de Salubridad" deben usar los fabricantes de dulces: los colores que se permitirían a los confiteros serán azul ultramarino, el añil, tornasol, rosilla (flor de camelina tuberculosa), rojo con cochinilla, carmín, palo del Brasil, flor roja de malva, tornasol y un ácido "inocente". Todos eran colores naturales, no se autorizaba ningún colorante sintético. "Los fabricantes o confiteros de dulces teñidos que en adelante usen colores declarados venenosos, serán castigados conforme a la ley". El artículo 846 dice: se impondrá pena de arresto menor y multa de segunda clase al que comercie con bebidas o comestibles adulterados con sustancias nocivas a la salud. Firma Pablo Macedo secretario de gobierno. En 1917 se crea el "Departamento de Salubridad Pública", existiendo hasta 1943, en que se fusionó con la "Secretaría de Asistencia Pública". Con esto pasamos a la siguiente época crucial para el control sanitario de los alimentos, cuando en Estados Unidos de América y Europa se empiezan

a desarrollar los métodos analíticos que permitieron determinar la composición de los alimentos, y que iban a hacer posible la implementación de sistemas científicos de control de calidad, que provocaron una revolución, pero en este caso química, esta etapa se considera desde 1951 hasta 1980. Mientras tanto en 1924 según el interés de los países latinoamericanos, y de acuerdo a la necesidad de un Código de Alimentos, durante el primer Congreso Latinoamericano de Química se adoptó una resolución tendiente a la formación de un "Codex Alimentorum Latinoamericanus", pero hubo que esperar hasta el Sexto Congreso de 1958, casi 35 años después, para formar un Comité con representantes de 20 países, que procediera a redactarlo. El documento se aceptó al año siguiente y por fin, en 1960, se publicó el Código Latinoamericano de Alimentos. En México se publicó el Reglamento de Aditivos para Alimentos en 1958, y este ha permanecido vigente hasta el Código Sanitario de 1973. A partir de él, la Secretaría de Salubridad y Asistencia ha emitido una serie de Normas, con el objeto de afinar y actualizar los estándares establecidos (Gracia- Galiano, 1994).

7.2 Legislación europea.

En 1860, se promulgó la "English Food Law", vigilando que los alimentos no estuvieran adulterados ni descompuestos y evitando que se añadieran sustancias extrañas que no fueran nutritivas. Actualmente, la política alimentaria de la Unión Europea está construida alrededor de estándares altos y seguros los cuales sirven para proteger y promover la salud del consumidor. La producción y consumo de alimentos es central en cualquier sociedad, y tiene consecuencias económicas, sociales y ambientales en muchos casos. Aunque la protección de la salud debe tener siempre prioridad. En adición el estado y calidad del ambiente, en particular los ecosistemas, pueden afectar diferentes etapas de la cadena alimentaria. El sector agro-alimenticio, es el que ocupa mayor importancia para la economía europea, como un todo. La industria de alimentos y bebidas es la que liderea el sector industrial en la comunidad europea, con una producción anual de casi 600 billones de euros, o cerca del 15% del total manufacturado. Una comparación internacional muestra a la Unión Europea como el productor mundial más grande de alimentos y bebidas. La industria de alimentos y bebidas es el tercer empleador más grande en la Unión con más de 2.6 millones de empleados, de los cuales el 30% son negocios pequeños y medianos. Por otro lado, el sector agrícola tiene una producción anual de cerca de 220 billones de euros, y provee el equivalente a 7.5 millones de trabajos de tiempo completo. Las exportaciones de productos agrícolas, alimentos y bebidas se consideran de más de 50 millones de euros al

año. La importancia económica y la ubicuidad del alimento en nuestras vidas sugiere que debe ser de interés primordial la seguridad alimentaria en la sociedad en su conjunto y en particular por las autoridades públicas y los productores (Visser, 1997).

A los consumidores se les debe ofrecer una amplio rango de seguridad y calidad en los productos provenientes de los estados miembros de la U.E. Este es el rol esencial del mercado interno. Cada eslabón en la cadena productiva alimenticia debe ser tan fuerte como los otros ya que la salud del consumidor debe ser adecuadamente protegida. Este principio debe aplicarse si el alimento es elaborado en la Unión o importado de otros países, asegurando que la Unión Europea posea los más altos estándares de calidad (Corsetti, 2000).

7.3 Regulación en Estados Unidos de América.

El término "aditivo" se usó por primera vez en 1951, aplicado a los alimentos presentado por el "Comité de Sustancias Químicas del Congreso de E.U.A." junto con su moción de que "el uso de aditivos que afecten el valor nutritivo de los alimentos no debe permitirse". Antes se utilizaba este término sólo en matemáticas y en plásticos. Una de las recomendaciones al "Comité de evaluación de Sustancias Químicas del Congreso de E.U.A.", fue la de revisar entre los 704 compuestos utilizados en 1950, cuáles se consideraba seguros, procediendo a seleccionar unas 200 sustancias químicas que consideraron seguras "Recognized by competent experts, as have been shown to be safe under the conditions of their intended use". Este fue el origen de la denominación "GRAS" (Generally Regarded as Safe) por esa razón la ley tuvo que excluir al principio de la definición de "aditivo" alimentario, a las sustancias reconocidas generalmente como seguras o "GRAS", para que no se les aplicara la ley. La lista de sustancias "GRAS", que eran unas 200 en 1958, ha ido creciendo, ya para 1968 eran 700 y continua en aumento; de 1998 a 2002 se adicionaron a la lista 110 nuevas sustancias, incluyendo a las enzimas : proteasa de *Aspergillus orizae*, proteasa de *Aspergillus niger*, lipasa de *Candida rugosa*, lipasa derivada de *Aspergillus orizae*, lipasa de *Penicillium camembertii*, "lisozima" de huevo, proteinasa aspártica de *Aspergillus orizae*, conteniendo un gen de *Rhizomucor miehei*, pululanasa derivada de *Bacillus subtilis*, y exopeptidasa derivada de *Aspergillus orizae*, además de las cepas de *Bifidobacterium lactis* Bb12 y *Streptococcus thermophilus* Th4, entre otras. Y se reportan como "FDA has no question" (U.S. Food and Drug Administration, 2002).

La especificación de la U.S.D.A (Departamento de Agricultura de E.U.A.), para el queso Cheddar, establece que: se considera como queso "Cheddar" a aquel producto que está elaborado mediante el proceso de "Chedarización" u otro proceso el cual produce un queso terminado que posee las mismas propiedades físicas y químicas del queso fabricado bajo el proceso "Cheddar", y esta hecho con leche de vaca con o sin adición de materia colorante y sal común, si es coloreado debe ser medio anaranjado-amarillo brillante y uniforme, y que contiene no más del 39% de humedad y en la materia libre de agua contiene no menos del 50% de grasa láctea, y está conforme a las provisiones de la "Definitions and Standards of Identity for Cheese and Cheese Products 19.500", según "F.D.A" (21 CFR-19.500). El pH no debe exceder 5.35; su sabor debe ser característico a queso Cheddar. No debe contener materiales extraños, y no se permite que tenga signos visibles de crecimiento ya sea de hongos o de cualquier otro microorganismo en su superficie o en su interior, debe ser atractivo a la vista, su textura no debe ser floja, pastosa, ni desmoronable. Las condiciones para su añejamiento deben ser no menos de 10 días de 3.5°C a 5.5°C (USDA, 2001).

7.4 Regulación internacional .

El "Model of Food Standards Regulations" en 1986, H9 sección (1), parte (C), subpartes (IV) y (V), establece claramente, que el queso puede contener microorganismos iniciadores y enzimas. Pero debido a que las regulaciones no han sido adoptadas uniformemente por las naciones, es relevante y necesario observar la legislación de cada país (Fedrick, 1992).

La relación de aditivos autorizada, y publicada por la F.A.O., en 1996 incluye el uso de enzimas (Tabla 24).

7.5 Regulación mexicana.

En México la "Dirección General de Normas" dependiente de la SECOFI determinó en 1985 la especificación para el queso "tipo" Cheddar NOM - F - 93 - 1985 (Tabla 25).

Asimismo el "Diario Oficial de la Federación" fechado el viernes 23 de febrero de 1996, publicó la "Norma Oficial Mexicana NOM - 121 SSA1-1994" Secretaria de Salud, Subsecretaria de Regulación y Fomento Sanitario, Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. "Especificaciones Sanitarias para Quesos Frescos, Madurados y Procesados" El objetivo es el de establecer las especificaciones sanitarias que deben cumplir los quesos frescos, madurados y

TABLA 24 . ADITIVOS AUTORIZADOS POR LA FAO, PUBLICADOS EN 1996 .

CANTIDAD	EFFECTO BUSCADO POR LOS ADITIVOS.
106	Aromas
104	Colores
82	Emulsificantes
75	Estabilizadores
68	Espesantes
65	Reguladores de acidez
57	Enzimas
56	Conservadores
53	Medicinas de uso veterinario
40	Secuestrantes
39	Antioxidantes
37	Antiaglomerantes
31	Contaminantes
30	Disolventes para extracciones
28	"Carriers", transportadores
28	Tratamiento de harinas
25	Potenciadores de sabor
20	Educorantes
16	Humectantes
15	Nutrientes de levaduras
13	Retenedores de sabor
13	Agentes para conferir consistencia
11	Acidos
11	Leudantes y esponjadores
11	Sinergistas
10	"Glazing", cubrientes y brillantadores
8	Coadyuvantes
8	Agentes rellenanates
8	Gelificantes
6	Filtroayudas
6	Suplementos nutrimentales
6	Impulsadores o propelentes
5	Antiespumantes
5	Lubricadores
4	Miscelaneos
3	Empañantes
3	Congelantes
3	Tóxicos naturales
2	Espumantes
1	Adsorbentes
1,112	TOTAL

FUENTE : Blom et al , 1996

TABLA 25. ESPECIFICACIONES FISICOQUIMICAS DEL QUESO TIPO CHEDDAR.

PARAMETRO	VALOR MINIMO	VALOR MAXIMO
HUMEDAD		43%
GRASA BUTIRICA	29%	
PROTEINAS LACTEAS	24%	
SOLIDOS TOTALES	57%	
pH	5	5.5
CENIZAS TOTALES		5.00%
CLORURO DE SODIO		3.00%

FUENTE : NOM-F-1985 SECOFI-DGN.

procesados; con el fin de reducir los riesgos de transmisión de enfermedades causadas por alimentos, así como propiciar que se procesen e importen productos de la calidad sanitaria necesaria para garantizar la salud del consumidor y la nutrición. El logro de estos propósitos será posible mediante el cumplimiento de las disposiciones establecidas en el presente reglamento, así como de su vigencia por parte de la Secretaría de Salud. Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

Se entiende por aditivos para alimentos, aquellas sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas durante su elaboración, para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor para mejorar su estabilidad y para su conservación. La leche para consumo humano, es el producto proveniente de la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas, o de otras especies animales. Se excluye el producto obtenido 15 días antes del parto y 5 días después de éste o cuando tenga calostro. El límite máximo, es la cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, radionúclidos, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides que no se deben exceder en un alimento, bebida o materia prima.

Se entiende por quesos a los productos elaborados con la cuajada de leche pasteurizada y estandarizada de vaca o de otras especies animales con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos, pudiendo por su proceso ser : frescos, madurados o procesados.

Los quesos madurados, son alimentos que en general cumplen con lo señalado en el punto anterior y se caracterizan por ser de pasta dura, semi-dura, o blanda, con o sin corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante la adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto de que se trate; lo que le permite prolongar su vida de anaquel; los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración. Los productos objeto de esta norma, por su proceso se clasifican en :

- Frescos (Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado)
- Frescos de pasta cocida (Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera).
- Frescos acidificados (Cottage, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel).
- Madurados prensados de pasta dura (Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito).
- Madurados prensados (Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Ámsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarati, Saint Paulin, Samsøe, Svecia, Tilster, Bola, Jack, Romadur).
- De maduración con hongos (Azul, Cabrales, Camembert, Limburger, Roquefort).

7.5.1 Especificaciones sanitarias.

Como disposiciones sanitarias los quesos deben cumplir con lo siguiente: la leche de vaca o de otras especies animales o sus mezclas debe estar libre de sustancias ajenas a su composición y debe ser pasteurizada.

7.5.2 Organolépticas.

Los quesos madurados son de consistencia desde blanda hasta extra-dura sin aromas y sabor ajenos, pueden presentar o no ojos típicos de fermentación o vetas coloreadas de los mohos empleados para su maduración

7.5.3 Microbiológicas.

Los quesos objeto de esta norma deberán cumplir con la microbiología descrita (Tabla 26).

Los productos objeto de esta norma deben contener según corresponda cultivos inocuos, bacterias y mohos característicos de la variedad del queso de que se trate.

7.5.4 Químicas.

Los productos objeto de esta norma no deberán rebasar 12 UFC/g de fosfatasa residual.

En cuanto a metales pesados y metaloides, se señalan al arsénico con un máximo de 0.2 mg/Kg, y al plomo con un máximo de 0.5mg/Kg.

TABLA 26 . ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS PARA QUESOS MADURADOS.

MICROORGANISMOS	LIMITE MAXIMO
Coliformes fecales (NMP/g)	50
<i>Staphylococcus aureus</i> (NMP/g)	100
Hongos y levaduras (UFC/g)	500
<i>Salmonella</i> en 25 g	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25g	Negativo

FUENTE : NOM-121-SSA1-1994 .

Los productos objeto de esta norma debe estar exentos de materia extraña.

El cloruro de calcio no debe exceder el 0.02% como máximo.

En la elaboración de los quesos madurados y procesados objeto de esta norma se permite el empleo de los siguientes colorantes naturales: beta-caroteno, clorofila, oleoresina de paprika, riboflavina, achiote o annato (10 mg/Kg máximo), beta-apo-8-carotenal (35mg/Kg máximo).

Se permite el empleo de los siguientes conservadores y en los límites que se señalan a continuación para los quesos madurados prensados: ácido sórbico o propiónico o sus sales de sodio o potasio (0.1% máximo), mezclados o individualmente sólo en la superficie de los quesos; natamicina o pimaricina sólo en la superficie de los quesos (0.002% máximo); nitrato de sodio o potasio dentro de la pasta, sólo para los quesos madurados prensados de pasta dura (0.005% máximo).

Se permite el empleo de peróxido de hidrógeno en la elaboración de los quesos denominados Cheddar en la cantidad máxima de 0.5%.

En la elaboración de los quesos objeto de esta norma se permite el empleo de las siguientes enzimas de acuerdo a las "Buenas Practicas de Manufactura". Enzimas de origen microbiano para cuajar la leche derivadas de: *Bacillus cereus*, *Endothia parastica*, *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, pepsina derivada de estómagos de bovinos y porcinos, quimiosina derivada de la *Escherichia coli* K12 y *Kluiveromices marcianus var. lactis*.

7.6 Concordancia con normas internacionales.

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

7.7 Vigencia.

La presente Norma Oficial Mexicana entra en vigor con carácter de obligatoria a los noventa días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación, México D.F. a 15 de diciembre de 1995.

Discusión.

La presente recopilación documental, tuvo su origen debido a varios factores entre ellos, tenemos que considerar en primerísimo lugar, la deficiente vinculación entre la academia y la industria sobre todo en el planteamiento y ejecución de temas prácticos y productivos (de Tesis e Investigaciones de Grado), así lo percibimos desde nuestra trinchera como empresario y como tecnólogo en alimentos; en segundo lugar, la escasa o nula política gubernamental en lo referente a programas sociales con una verdadera nutrición hacia la población en general, a los grupos vulnerables y en particular al amplio sector de escasos recursos; así lo reportó el Centro de Estudios Económicos de Sector Privado (CEESP), el 20 de julio del presente año; México ocupa el quincuagésimo tercer lugar (53), en índice de Desarrollo Humano (IDH), la Organización de las Naciones Unidas, al dar a conocer los últimos resultados de su estudio sobre desarrollo humano, este se basa en cuentas variables como las de esperanza de vida, nivel educativo y de salud, así como el Producto Interno Bruto (PIB), per-cápita. De 177 países, los que tienen la mayor calificación son Noruega, Suecia, y Australia. Estados Unidos de América se encuentra en la posición 8, China en la 94, y Brasil en la 72. El país en la Región Latinoamericana con la mejor calificación según el CEESP, fue Barbados, en la posición 29, reportándosele un PIB per cápita medido en términos de poder de compra de 15 mil 290 dólares contra 8 mil 970 en México.

La inversión gubernamental del 1% del PIB, en ciencia y desarrollo en el país no es suficiente; en China, en los últimos años, numerosas fuentes han documentado su progreso económico; pocos países han experimentado un cambio tan contundente como lo ha hecho la Republica Popular de China a partir de los años setenta, su desempeño económico en la última década ha sido impresionante, de 1991 a 2003, la economía ha crecido a una tasa promedio de 8.9 por ciento, contra el 1.2% anual en México y el 2.4% en España (en México hay más del 40% de habitantes en pobreza extrema, en España el 8%). Además de su alta tasa de crecimiento, particularmente en flujos de inversión extranjera, el progreso económico de China, también se ha caracterizado por su determinación para desarrollar industrias con un alto contenido tecnológico. El país ha venido implementando una serie de medidas para insertarse en la nueva economía del conocimiento. Para alcanzar sus objetivos, está invirtiendo fuertemente en la educación y el entrenamiento de sus ingenieros. En menos de seis años el porcentaje del PIB invertido en este país en investigación y desarrollo se ha duplicado. El estudio más reciente de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), en febrero del 2004, señala a China como el tercer país con mayor gasto en materia de investigación y desarrollo durante el

2003, solamente detrás de Estados Unidos de América y Japón, pero arriba de otros países altamente industrializados como Alemania y Francia.

Se pensó en un producto con valor agregado, y rico en proteínas, debido al triste panorama alimentario en México. En 1988, la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud (SSA), levantó la Primera Encuesta Nacional de Nutrición. Este estudio, incluyó a niños menores de cinco años y a mujeres de entre 12 y 49 años de edad. Se encontró que, cerca del 40% de los niños menores de cinco años estaban desnutridos (la magnitud del problema varía según la zona de que se trate), es de llamar la atención, de que en la ciudad de México la frecuencia de niños desnutridos (independientemente del grado o tipo de desnutrición), ascendía a 17.9%, mientras que en el sureste prácticamente se duplico (35.5%).

Posteriormente, en 1993, la Secretaría de Educación Pública (SEP), y el Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF), levantaron el primer censo Nacional de Talla en niños de primer grado de primaria. La estatura o talla es un indicador de desnutrición crónica o de retardo del crecimiento, que tiene bajo costo y es fácil de medir. La medición de la estatura en niños de alrededor de siete años de edad proporciona información útil sobre la calidad del crecimiento en los primeros años de vida. A través de este censo, se encontró una prevalencia nacional de niños con déficit de estatura de 18.4%, lo que significa que alrededor de la quinta parte de los niños de primero de primaria del país, tienen una estatura menor a la esperada. Chiapas y Oaxaca tuvieron las prevalencias mayores (45.1 y 42.0% respectivamente), mientras que las menores correspondieron a Baja California Sur (3.5%), y Baja California (4.5%). Como sea, es preocupante que 10 estados en orden ascendente, hayan presentado prevalencias de déficit de estatura superiores a la media nacional, Tabasco, Veracruz, Hidalgo, Campeche, Quintana Roo, Puebla, Guerrero, Yucatán, Oaxaca y Chiapas. Más que un simple problema de disponibilidad de alimentos, la desnutrición con frecuencia es un asunto de insalubridad y de malas condiciones de vida en general. Así algunos indicadores de naturaleza sociológica (vivienda con piso de tierra, agua entubada dentro de la vivienda, existencia de un refrigerador, excusado con agua corriente, etc.), pueden ayudar a esclarecer el porqué de la distribución desigual de la desnutrición a lo largo del territorio nacional.

En 1999, se levantó la Segunda Encuesta Nacional de Nutrición, la cual contó con información relativa a la prevalencia de anemia en los preescolares. Gracias a ello pudo observarse que uno de cada cuatro niños está anémico. Al respecto, no se

lado, se detectó que alrededor del 5% de los preescolares presentaron sobrepeso u obesidad, presentándose la mayor prevalencia en el norte del país con 7%. En el grupo de mujeres en edad reproductiva se observó una elevada prevalencia de anemia. Se estima que más del 20% de la población urbana adulta joven padece algún grado de sobrepeso u obesidad. Algo paradójico parece estar ocurriendo con los hábitos alimenticios y los trastornos y patologías que de ellos derivan en el mundo de hoy. Aquello que pareciera mal de los ricos, propio de quienes tienen resuelto el problema del hambre y que antiguamente se asociaba a la fortaleza y en los niños a la buena salud: la obesidad, se ha tornado hoy en día en enfermedad de los pobres, sobre todo en el mundo no desarrollado. Son numerosos los problemas de salud asociados con este mal que tienen entre sus principales factores explicativos la desigualdad, expresada ésta en los niveles educativos como en los de ingresos. Se ha demostrado, también la relación entre pobreza y los menores gastos destinados a la alimentación, un menor consumo de vegetales y frutas y dietas de baja calidad, así como una relación directa entre desnutrición y obesidad. Las dietas de baja calidad son más baratas, pero son menos ricas en proteínas. En los países desarrollados, la obesidad tiene una importante incidencia en los grupos de mayores ingresos, apareciendo a edades tempranas; en los países pobres, tiene mayor prevalencia en los grupos de menores ingresos y esta asociada con episodios de desnutrición en los primeros años de vida, la obesidad regularmente se acompaña de deficiencias en los nutrientes. Es un hecho que en los años recientes se han modificado de manera sustancial los hábitos alimenticios de la población mexicana, con un amplio mosaico de expresiones regionales y locales, asumió tendencias de cambio orientadas a homogeneizar los patrones de consumo mediante la incorporación paulatina de nuevos componentes de la alimentación cotidiana. Así por ejemplo, el consumo de trigo ha ido sustituyendo en cierta medida al de maíz, a la par que ha disminuido la ingestión de alimentos autóctonos. Entre los principales cambios alimentarios que se presentan en México, destaca el menor consumo de frijol, una mayor ingestión de pastas, arroz, azúcar, sal, aceite y grasas, golosinas, refrescos embotellados y comidas rápidas. Estas tendencias de cambio se han dado por igual en los medios rural y urbano, aunque han sido mucho más marcadas en este último, sobre todo en los estratos de ingresos medio y alto. Quizá, debido a que se ha estigmatizado a la dieta denominada en forma tradicional como "mexicana", la población ha visto como un ejemplo a seguir la dieta de los países industrializados que constituye un símbolo de abundancia. Por otro lado, no se ha encontrado evidencia alguna del uso de enzimas en la maduración de cualquier tipo de queso en el mercado quesero mexicano, con el fin de acelerarla, esto se desprende de las

visitas de campo realizadas a las diferentes factorías como son : Nestlé, Cuadritos, New Zeland Milk Products, Chilchota Alimentos, Carranco, Esmeralda, Lyncott, Zona de Michoacán/Jalisco (San José de Gracia, Lagos de Moreno), Zona de Queretaro/Estado de México (Acúlco, Ecatepéc), Zona de Hidalgo/ Veracruz (Tulancingo), La Mesa, El Sabino, Productos Chen, Alpura, Unión de Ganaderos de Sinaloa, Sigma Alimentos, Quesos Querétaro, Lácteos Vai, Chálco Estado de México, Campos Menonitas en Chihuahua, Frico, y Kraft-General Foods.

Sin embargo se encontraron las siguientes evidencias del uso de enzimas en aplicaciones industriales lácteas debido a que se conocen bien las reacciones que ocurren durante el añejamiento y pueden ser aplicadas en otros productos:

Arbige M., and S. Scott. 1990. Genecor Inc. *Retención de enzimas en la cuajada del queso*. Es un método innovador que permite retener las lipasa o proteasas dentro de la cuajada, mediante un tratamiento de solubilidades. Patente 3940501 E.U.A.

Bakal A. and M. Elisenstadt. 1990. Cumberland Pack. *Método para producir gránulos con sabor a mantequilla*. Se describe el método para preparar gránulos a partir de maltodextrinas, con una pequeña cantidad de grasa y mantequilla modificada enzimáticamente. Dichos gránulos son bajos en calorías, y tienen una gran intensidad de sabor a mantequilla y se disuelven al contacto con alimentos calientes. Patente 3765905 E.U.A.

Nauth K., and K. Raijinder. 1993. Kraft-General Foods, Inc. *Método para la manufactura de un pre-queso y queso natural*. Se describe el método de preparación para un prequeso que puede ser convertido a un queso natural, mediante el uso de enzimas de diversas operaciones unitarias, y el uso de cultivos, proteasas y lipasas a partir de *Micrococcus*. Patente 4045587 E.U.A.

Kratky H., V. Zdenek and Dharam I. 1993. Nestec S.A. *Preparación de saborizantes a queso*. Los saborizantes a queso se preparan mezclando una crema lipolizada a partir de crema rica en grasa y queso lipolizado preparado a partir de un queso madurado. Se utiliza una lipasa específica para hidrolizar ácidos grasos de hasta 12 carbonos. Patente 4119732 E.U.A.

Groesbeck Ch. and K. Stevenl. 1995. Nestec S.A. *Proceso para la preparación de un sabor a "Blue cheese"*. En un medio acuoso conteniendo un agente amortiguador se disuelve cierta cantidad de queso azul y se incuba con lipasas y proteasas provenientes de *Penicillium roqueforti*. Patente 4020190 E.U.A.

Meilinger J., H. Brown, G. Montgomery. 1995. Raskas Foods Inc. *Proceso para la manufactura de un queso sin grasa*. Se describe un método para la preparación de dicho producto, que aproxima el sabor y consistencia de un queso crema con grasa, mediante el uso de diversos microorganismos y extractos enzimáticos. Patente 4172900 E.U.A.

¿Por qué se hace énfasis en el uso de enzimas? Debido a que el reporte del "Comité Mancomunado de Expertos sobre Alimentos de la F.A.O. (Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación), y la O.M.S. (Organización Mundial para la Salud), en 1956 definió a los "aditivos alimenticios" como sustancias no nutritivas añadidas intencionalmente al alimento, generalmente en pequeñas cantidades, para mejorar su apariencia sabor, textura o propiedades de almacenamiento. La sustancias añadidas principalmente para aumentar el valor nutritivo tales como vitaminas y minerales, no están considerados en esta categoría; y en Estados Unidos de América, el "Comité de Protección de los Alimentos" de la "Academia Nacional de Ciencias", define un aditivo alimenticio como una sustancia o una mezcla de sustancias que no son un producto alimenticio básico, que están presentes en el alimento, como resultado de cualquier aspecto de la producción, procesamiento, almacenamiento o empaçado.

Por ello, las enzimas provenientes de microorganismos lácticos, se consideran dentro de estas clasificaciones; y estas mismas han sido usadas por un largo período de tiempo demostrando su alta confiabilidad, seguridad, inocuidad, y por estar exentas de riesgos para la salud.

Para efecto de poder normar criterio, se comparó el precio promedio en el mercado mexicano de un queso parecido en su elaboración al Cheddar, que sería el Manchego/Chihuahua, contra el precio promedio resultante de los datos recabados personalmente en el campo de trabajo descrito anteriormente, sumando los costos de fabricación del queso Cheddar propuesto en la presente revisión bibliográfica. De manera que tendríamos las siguientes cifras :

1.- Estructura del precio promedio de queso Manchego/Chihuahua en el mercado mexicano por kilo :

- | | | |
|----------------------------------|---|-----------------|
| 1.1.- Costo de la leche fresca | = | \$3.20MN/Kg |
| 1.2.- Costo de fabricación 20% | | |
| 1.3.- Costo de maduración 1 mes | = | \$0.52MN/Kg/Mes |
| 1.4.- La utilidad por venta 33 % | | |

2.- Pero tenemos que tomar en cuenta que para obtener 1Kg de queso necesitamos aproximadamente 10 L de leche, o sea que la proporción es de 1 a 10, por esto tenemos lo siguiente.

2.1.- Costo de 10 L de leche fresca	= \$ 32.061MN
2.2.- Costo de fabricación 20%	= \$ 6.42MN
2.3.- Costo de maduración 10.5 meses	= \$ 5.46MN
2.4.- El subtotal de esta suma es	= \$ 43.94MN
2.5.- La utilidad por venta 33%	= \$ 14.50N
2.6.- El precio promedio sería	= \$ 58.44MN

3.- La estructura de costos del queso Cheddar propuesto en esta revisión bibliográfica estaría así :

3.1.- Costo de 10 L de leche fresca	= \$ 32.061MN
3.2.- Costo de fabricación 20%	= \$ 6.42MN
3.3.- Costo de maduración 1 mes	= \$ 0.52MN/Kg
3.4.- Costo de las enzimas	= \$ 0.70MN/Kg
3.5.- El subtotal de esta suma es	= \$ 39.70MN
3.6.- La utilidad por venta 33%	= \$ 13.10N
3.7.- El precio promedio sería	= \$ 52.80MN

Como se puede ver existiría una diferencia entre ambos productos, del orden de \$5.64 MN/Kg, que correspondería al 10.68% de ahorro. Para tener una idea más amplia de lo que estaríamos hablando, podríamos considerar que el mercado de queso Manchego/Chihuahua, en México en el 2003, se compone de el total de TON de fabricación nacional más el sub-total correspondiente a las importaciones de estas mismas variedades queseras en el mismo periodo, de tal manera tendríamos:

Volumen en TON de queso Manchego/Chihuahua/México durante 2003	= 15,575
Volumen en TON de queso Manchego/Chihuahua importado en 2003	= 31,027
Total de queso Manchego/Chihuahua en el mercado nacional en 2003	= 46,602

Mediante el método tradicional de elaboración, el precio promedio del queso Manchego/Chihuahua sería de \$ 58.44 MN/Kg, que multiplicado por el volumen total de este tipo de queso en el mercado mexicano en 2003 (46,602 TON), nos daría el valor del mismo, igual a \$ 2'723,420,880.00 MN (dos mil setecientos veinte y tres millones, cuatrocientos veinte mil ochocientos ochenta pesos con 00/100 MN).

Pero si aplicáramos la técnica descrita en este trabajo, esta cifra se reduciría así : precio del queso Cheddar \$ 52.80 MN/Kg por el total de queso de este tipo, en el mercado mexicano (46,602 TON), debido a que lo estaríamos produciendo totalmente en el país, nos daría \$ 2´460,585,600.00 MN (dos mil cuatrocientos sesenta millones quinientos ochenta y cinco mil seiscientos pesos 00/100 MN), con un ahorro de \$ 262´835,280.00 MN (doscientos sesenta y dos millones ochocientos treinta y cinco mil doscientos ochenta pesos 00/100MN). Lo que representaría alrededor de 4,977.94 TON., más de queso Cheddar con muy buena calidad y disponible para satisfacer las deficiencias nutricionales que aquejan al país, o en el último de los casos para exportación.

CONCLUSIONES.

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, se puede concluir lo siguiente:

A) Se considera que entre las razones principales para acelerar la maduración del queso Cheddar y en general del queso se encuentran, el incremento en el margen de ganancia para los fabricantes, así como también el aumento tanto en la calidad, como el rango de oferta y disponibilidad del producto en el mercado, para los consumidores.

B) No obstante que el queso es un alimento rico en nutrimentos, y que es considerado como un sustituto de la carne por las amas de casa, en nuestro país su consumo ocupa un lugar secundario dentro de nuestra dieta.

C) Se hace evidente que la tendencia en el consumo de queso en nuestro país, está visiblemente orientada hacia los quesos frescos y procesados (amarillo).

D) Se considera que de los tres fenómenos principales ocurridos durante la maduración del queso, que son proteólisis, lipólisis y glicólisis, la proteólisis tiene mayor importancia, debido a que a través de ella se obtiene la textura, sabor característico de cada variedad; y además es considerada como el índice de madurez. La lipólisis, no es tan importante, es de hecho indeseable para algunos quesos, por ello, los intentos por acelerar la maduración se han concentrado en la proteólisis; y en cuanto a la glicólisis, la modificación del lactato en muchos quesos se considera de menor importancia.

E) Contrariamente a lo que se creía antiguamente, los agentes proteolíticos en el queso que son los responsables en buena medida de su maduración, incluyen a las proteinasas propias de leche, así como también a el coagulante (renina) o su sustituto, a las enzimas proteolíticas de los organismos no-iniciadores, las proteinasas y peptidasas de las bacterias ácido lácticas, y por último las proteinasas y peptidasas de la flora secundaria (sólo en algunas variedades queseras).

F) Asimismo se considera actualmente que la degradación completa de la caseína durante la maduración, puede ser solamente ejecutada por la acción combinada de proteasas y fosfatasa; lo que indica el papel relevante de la fosfatasa alcalina en este proceso.

G) El aumento en la concentración de coagulante (renina), para tratar de acelerar la maduración, es un hecho no realista y sólo trae consigo una mayor amargura en el producto final, y un incremento substancial en el costo.

H) El uso de solo una clase de enzima para tratar de acelerar la maduración del queso no es conveniente; ya que la aceleración de la proteólisis debe acompañarse de la consecuente aceleración en la peptidólisis y lipólisis, evitando así disturbios y desbalance entre los componentes del sabor.

I) Aunque existan otros métodos para acelerar la maduración tanto del queso Cheddar como de otras variedades, el uso de enzimas exógenas agregadas a la cuajada con el objeto de reducir el tiempo de maduración sea de 1, 2, 3 y hasta 6 meses, representa alrededor del 50% menos de este largo período comparándolo con estos otros métodos incluyendo el tradicional, resultando muy satisfactorio para los consumidores debido a que impacta directamente en su precio final abatiéndolo.

J) El método de agregar enzimas proteolíticas y lipolíticas en un balance, sigue siendo un método confiable, manejable y costeable debido a que por tonelada de queso fabricado de esta forma, es posible el ahorro de hasta 110 dólares americanos, lo cual representa una gran ventaja para el fabricante; pero también trae consigo ventajas para el consumidor.

K) El uso de lisozima no es viable para la manufactura de quesos a gran escala, debido a su alto costo.

L) Es posible acelerar la maduración del queso Cheddar, con plasmina, pero la más seria limitación de su uso para este propósito, es que resulta muy costosa.

M) Esta metodología no presenta restricciones regulatorias, ni en Estados Unidos de América, ni en Europa, aunque aquí en México, la regulación no está actualizada, es muy escueta, limitada y obsoleta; por ello la bibliografía internacional señala puntualmente la autorización del uso de enzimas provenientes de organismos lácticos iniciadores y no iniciadores para este propósito, y que ha sido desarrollado con éxito en centros de investigación de: Australia, Egipto, España, Estados Unidos de América, Grecia, Holanda, Irlanda, y Republica Eslovaca, en quesos Cheddar, Ras, Manchego, Gouda, Edam, Saint Paulin, Azul, Feta, Petit-Ossau-Iraty y Ladrillo de Eidam. Además ésta técnica se ha extendido al área de embutidos secos fermentados en Noruega.

N) Como puede observarse, en México actualmente no se aplica esta técnica, por ello es necesario desarrollarla y aplicarla en los quesos "madurados" de fabricación nacional (tipo Manchego, tipo Chihuahua, tipo Mozzarella, tipo Parmesano, tipo Gruyere, tipo Emmetal, etc.), y así de esta manera determinar con toda precisión cual sería su costo.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Anon, X. 1997. *Relación de Eficiencia de la Proteína (P.E.R.), de diferentes proteínas vegetales y animales*. Manual de Referencia para productos norteamericanos de suero. United States Dairy Export Council USDEC. Arlington, VA. **1** : 34-35.
- 2.- Arenas, B.D. 1998. *Aceleración en la maduración de quesos mediante lipasas de " Penicillium caseicolum " encapsuladas en liposomas*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F.. :3,5,9,11,28,30,34,47,48,62.
- 3.- Berry, D. 2002. *Choices a plenty in cheese*. Cheese Trends. U.S. Minnesota Dairy Board. **3** : 9-19 .
- 4.- Blom, H., B.F. Hagen, B.O. Pedersen, A.L. Holck, L. Axelsson H. Naes. 1996. *Accelerated production of dry fermented sausage*. Meat Science, **43 (S)** :229-242. Norwegian Food Research Institute, Oslovn, Norway.
- 5.- Bourges, H.R.1998. *Valor nutritivo para la gran diversidad de alimentos procesados*. Tecnología de Alimentos, Industria y Mercado. México D.F. Edita ATAM. **1(6)** : 56-65 .
- 6.- Cámara nacional de productos alimenticios elaborados con leche. 2000 *Informe anual*. Jefatura de estadística. México D.F. **4**: 180 .
- 7.- Campos, A. 1992. *Composición de saborizantes-biotecnología*. Lácteos Mexicanos. Alfa Editores. México D.F. **3 (4)** : 16-18,45-47 .
- 8.- Casanueva ,E., M.H. Kaufer, A.B. Pérez, y P. Arroyo. 2002. *Nutriología Médica*. Editorial Médica Panamericana. Fundación Mexicana para la Salud. México D.F. 2ª. Edición. : 31, 72, 125, 217, 278, 321.
- 9.- Centeno, M. y M.G. Alvares. 1994. *Determinación de pH y actividad de agua en quesos mexicanos*. Tecnología de Alimentos. Edita ATAM. México D.F. **29 (2)** : 35-40.
- 10.- Corsetti, A.K.2000. *Boletín anual Legislación Alimentaria en la Unión Europea*. Comisión Alimentaria Europea. Bruselas Bélgica. **1** : 3 - 33.

- 11.- Climme, E. y W. Buchheim. 2001. *Leche y sus componentes*. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza España. 1ª Edición : 3, 4, 29, 53, 73, 96, 246, 607.
- 12.- Dairy Council Digest (DCD) 2002. *Health benefits of cheese*. National Dairy Council. Rosemont Il., USA. Sept-Oct. **73 (5)** : 25-30 .
- 13.- Dairy Management Inc.(DMI)1998. *Making cheese better*. Dairy Industry Technology Review. Utah State University, U.S.A. June : 1-6 .
- 14.- Dairy Management Inc. (DMI) 2001. *Cheese in/ away from home*. Dairy Industry Technology Review. Utah State University, U.S.A. November : 5.
- 15.- Dairy Proteins 2002. *Cheese Milk Protein Review*. Wisconsin center for dairy research and the Wisconsin market board. U.S. Wisconsin Dairy Board : 2-5 .
- 16.- El Soda, M. 1993. *Accelerated Maturation of Cheese*. Int.Dairy Journal. Department of Agricultural Industries, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Alexandria Egypt. **3** : 531-544 .
- 17.- El Soda, M. 1993. *The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening*. Federation of European Microbiological Societies (FEMS). Department of Agricultural Industries, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Alexandria Egypt. **12** : 239-251 .
- 18.- Enzimas de México S.A. DE C.V. (ENMEX) 2004. *Boletín informativo*. Departamento de Investigación y Desarrollo. Tlalnepantla Edoméc. México. **1** :67-86.
- 19.- Exterkate, F.A.1994. *EL mecanismo y la posible aceleración de la maduración del queso*. Microbiología ambiental aplicada. Departamento de Química Biofísica Universidad de Ede, Provincia de Güeldres, Holanda. **15** : 23-26 .
- 20.- Farkye, N. and P.F. Fox. 1992. *Contribution of plasmin to Cheedar cheese ripening: effect of added plasmin*. Journal of Dairy Research. Department of Food Chemistry, University College . Cork, Irish Republic. **59** : 209-216 .

- 21.- Fedrick, I. 1992. *Technology and economics of the accelerated ripening of Cheddar cheese*. Australian Journal of Dairy Technology. Queensland Food Research Laboratories, Queensland Department of Primary Industries, Hamilton, Queensland. March/June. : 33-36 .
- 22.- Fernández-García, E. y M. Ramos. 1988. *Enzyme Accelerated Ripening of Spanish Hard Cheese*. Food Chemistry. Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva Madrid, España. **28** : 63-80 .
- 23.- Fernández-García, E. y A. Olano. 1993. *Accelerated ripening of Manchego type cheese by added commercial enzyme preparation from "Aspergillus oryzae"* Enzyme Microb. Technol. Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva Madrid, Spain. **15** :519-524 .
- 24.- Fox, P.F. 1993. *Acceleration of Cheese Ripening*. Food Biotechnology. Department of Food Chemistry, National Food Biotechnology Centre University College, Cork Ireland. **2** : 133-185 .
- 25.- Fox, P.F. 1993. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Edited by Chapman & Hall. Boundary Row 2-6 London U.K. Second edition. **1** :1-37,69, 101-141, **2** : 193-225,257-279, **3** : 389-415.523-580.
- 26.- Frialsa (Frigoríficos Alimenticios S.A.) 2004. *Reporte mensual: Mercado, Oportunidades y Estadísticas*. Departamento Técnico. Blvd. Bernardo Quintana S/N. Querétaro. 76180 Querétaro. Agosto. : 45,53.
- 27.- García-Galiano, E. 1994. *Seguridad de los aditivos en los alimentos, Evolución o Revolución*. Tecnología de Alimentos, Industria y Mercado. Edita ATAM .México D.F. **1** : 20-40 .
- 28.- Gerhartz,W. 1992. *Enzymes in industry, production and aplicaciones*. V.C.H. Printers, 1a. Edit. Federal Republic of Germany. : 85-199 .
- 29.- Godfrey,T. and S. West. 1996. *Industrial Enzymology*. Mc Millan Press LTD. London U.K. 2a. Edition : 135-153 .
- 30.- Golstein, L. and L.B. Wingard. 1997. *Production of Intracellular Microbial Enzymes*. Academic Press Inc., London England. 1a Edition. **2** : 1-3,28-69.

- 31.- Hernández, M., A. Chaves, H. Bourges. 1987. *Valor Nutritivo de los Alimentos Tablas de uso práctico*. Instituto Nacional de la Nutrición. México D.F., 10ª Edición. (L-12) :18 .
- 32.- Hefnawy, S.H.A. 1996. *Accelerated Ripening of Ras Cheese by Using Some Enzymes*. Egyptian J. Dairy Science. Animal Production Research Institute Dairy Sec. Ministry of Agriculture, Dokki, Cairo. **14** : 59-63.
- 33.-Herian, K. y M. Rizman.1997.*Nuevas Posibilidades para el mejoramiento de la tecnología de producción y la calidad de los quesos naturales*. Lecherías del centro de Eslovaquia, Empresa Nacional, planta Krupina. The British Library Document Suply Centre, Boston Spa, Yorkshire, U.K.: 73-77 .
- 34.- Huitron, C. 1993. *Biotecnología de Enzimas*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. México D.F. : 89, 90, 331.
- 35.-Ivarson, L.E. 1992. *El Cheddar de Inglaterra (Método corto)*.Tecnología Quesera. Industria Alimenticia. Alfa Editores. México D.F. **2** : 54,55.
- 36.- Iwasaki,T. and F.V. Kosikowski. 1973. *Increasing flavor in cheese with commercial microbial enzyme preparations*. Journal of Dairy Science. Cornell University, Ithaca New York . **56 (5)** : 623-625 .
- 37.- Izco, J.M., P. Torre and Y. Barcinia. 1999. *Capillary electrophoresis: Evaluation of the effect of added enzymes on casein proteolysis during the ripening of a ewe ´s milk cheese*. Adv. Food Science (CMTL) Area de Nutrición y Bromatología, Dpto. Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España. **21 (34)** : 110-116 .
- 38.- Jamieson, M., y P. Jobber. 1994. *Manejo de los Alimentos: técnicas de conservación*. 2a. Ed. Editorial PAX-México. 2 : 275-288, 292-300 .
- 39.- Kosikowski, F.V. and T. Iwasaki. 1974. *Changes in Cheddar Cheese by Commercial Enzyme Preparations*. Journal of Dairy Science. Department of Food Science Cornell University, Ithaca, NY. **58 (7)** : 963-970.
- 40.- Law, B. 1997. *Short cuts to faster flavour*. Food. National Institute for Research in Dairying. Reading England. March . : 17-19 .

- 41.- Law, J. and P.F. Fox. 1995. *Enzymology of Cheese Ripening*. Food Biotechnology. Department of Food Chemistry and Microbiology University College, Cork, Ireland. **5 (3)** : 239-262 .
- 42.- Madrid, A. 1996. *Curso de Industrias Lácteas*. Editorial Mundi-Prensa-Libros, S.A. Madrid España, 1ª. Edición : 56,89,92,103,119,137,178,191 .
- 43.- Madrid, A. 1999. *Tecnología Quesera*. AMV Ediciones / Mundi Prensa. Madrid España. 2a.Edición : 9-31,51-82,10,109,112,115,306-311.
- 44.- Mc Garry, A., J. Law and P.F. Fox.1994. *Effect of Genetically Modifying the Lactococcal Proteolytic System on Ripening and Flavor Development in Cheddar Cheese*. Applied and Environmental Microbiology. Department of Food Microbiology, National Food Biotechnology Centre, and Department of Food Chemistry, University College, Cork, Ireland. December. **60 (12)** : 4226-4233 .
- 45.- Mc Sweeney, P.L.H. and P.F. Fox. 1994. *Cheese: Methods of Chemical Analysis*. Academic Press, Inc., London England .2a. Edition : 341-383.
- 46.- Mohamed, A.A., M.S El Safty, A.I. El Zayat and A.M. Abu El Nour. 1989. *Acceleration of Ras Cheese Ripening by Using some Proteolytic Enzymes*. Egyptian Journal of Dairy Science. Food Science Department, Faculty of Agriculture Suez Canal University. **17** : 337-347 .
- 47.- Morales de León, J., V. Babinsky, H. Bourges, M.E. Camacho. 2000. *Tablas de composición de alimentos mexicanos*. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México D.F. Edición. 2000 . : 222 .
- 48.-Moskowitz, G. and S.S. Noelck. 1995. *Enzyme-Modified Cheese Technology*. Journal of Dairy Science. Dairyland Food Laboratories, Inc. **70** : 1761-1769 .
- 49.- Neelakantan, S., A.K. Mohanty and J.K. Kaushik. 1999. *Production and use of microbial enzymes for dairy processing*. Current Science. Dairy Microbiology Division, National Dairy Research Institute, Karnal, India . **77** : 143-148.

- 50.- Norma Oficial Mexicana NOM-F-93-1985. *Especificaciones Sanitarias para Queso tipo Cheddar*. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas. Diario Oficial de la Federación 10 de Noviembre de 1986 : 2-5 .
- 51.- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA 1-1994. *Quesos: frescos, madurados y procesados: Especificaciones sanitarias*. Secretaria de Salud. Subsecretaria de Regulación y Fomento Sanitario. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. Diario Oficial de la Federación 15 de Diciembre de 1995. : 14-21.
- 52.- Pérez, M. M., D.J. Islas y G.S. del Río. 1999. *Manual de Elaboración de Productos Lácteos*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Taller de elaboración de productos lácteos. Manual de uso práctico. 2ª. Reimpresión. : 8,17,28,37,49,50,83,102 .
- 53.- Rico, E. 2002. *La Industria Alimenticia de América Latina*. Industria Alimenticia. Editorial Cosmos. Diciembre. **12** :20 – 26 .
- 54.- Santos, M. A. 1994. *Leche y sus Derivados*. Editorial TRILLAS. México D.F. 3ª. Edición. : 177-215.
- 55.- Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2004. *Producción 1994-2004 de Crema Queso y Mantequilla*. Centro de Estudios Económicos. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática **1** : 44,45.
- 56.- Serrano, C., A. Picon y M. Gaya. 1995. *The effect of Liposome-Encapsulated Cyprosins on Manchego Cheese Ripening*. Journal of Dairy Science. Departamento de Tecnología de Alimentos. Centro de Investigación y Tecnología. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid, España. **79** : 1699-1705.
- 57.- Scott, R. 2000. *Fabricación de queso*. Editorial ACRIBIA. Madrid España 1ª. Edición. : 89-95, 115, 185, 309, 331.
- 58.- Sood, V.K. and F.V. Kosikowski. 1979. *Accelerated Cheddar Cheese Ripening by Added Microbial Enzymes*. Journal of Dairy Science . Departement of Food Science Cornell University, Ithaca New York. **62** : 1865-1872 .

- 59.- Tórrez, O.J. 2001. *Perfil de la Industria Láctea Estadounidense*. Tecnología de Alimentos, Industria y Mercado. Alfa Editores. México D.F. **4** : 49-53 .
- 60.-Trepanier, G., M.ElAbboudi,B.H. Lee and R.E. Simard. 1992. *Accelerated Maturation of Cheddar Cheese: Microbiology of Cheeses Supplemented with "Lactobacillus casei subsp. casei L2A"*. Journal of Dairy Science. Centre de recherche STELA, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval Ste-Foy, Quebec, Canada . **57 (4)** : 898-902 .
- 61.- Tucker, G.A. and L.F.J. Woods. 1995. *Enzymes in Food Processing*. Edit. AVI PUBLISHING COMPANY. Westport Connecticut. 3a. Edition : 107-122 .
- 62.- United States Department of Agriculture USDA. 2001. *Specifications for Cheddar Cheese*. Agricultural Marketing Service. Dairy Programs. **1** : 1-3, **2** : 1-13 .
- 63.- United States Department of Agriculture USDA. 2004.*Dairy world markets and trade*. Agricultural Marketing Service. Dairy Programs . **1** : 17,18, 19,27, 32,34,35 .
- 64.- United States Dairy Export Council USDEC. 1999. *Cheese Production by Type*. Arlington VA. **2** : 41-44.
- 65.- United States Dairy Export Council USDEC. 2001. *Testing Book for Cheese in USA*. Arlington VA. **2** : 1-13, 25,121-125.
- 66.- United States Dairy Export Council USDEC. 2002. *Proteins and Products from Whey: New Trends and Applications in Food Industry*. Arlington VA. **1** : 1-23 .
- 67.- United States Dairy Export Council USDEC. 2003. *Dry milk whey, proteins and it's products, applications in food industry*. Arlington VA. **1** : 1 – 15 .
- 68.- United States Dairy Export Council USDEC . 2004. *Market and new trends*. Arlington VA. **1** : 39-52 .

69.- United States Food and Drug Administration FDA. 2002. *Summary of All Gras Notices*. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Food Additive Safety. **GRN** : 92-110, 66-93, 36-65, 13-35, 1-12 .

70.- Vafopoulou, A., E. Alichanidis and G. Zerfiridis. 2000. *Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases* Journal of Dairy Research. Laboratory of Dairy Technology, University of Thessaloniki, Greece. **56** : 285-296 .

71.- Varman, A.H. and J.P. Sutherland. 1995. *Leche y productos lácteos, tecnología, química y microbiología* .Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. : 7, 8, 291,292, 338, 350 .

72.- Visser, S.1997. *Enzymatic breakdown of milk proteins during cheese ripening*. International Dairy Federation Bulletin. Department of Product Technology, Netherlands Institute for Dairy Research (NIZO) Ede, The Netherlands. **332** : 20-24 .

73.-Walstra, P., T.J. Geurts, A. Noomen, A. Jellema y M.A.J.S. van Boekel. 2001. *Ciencia de la Leche y Tecnología de los Productos Lácteos*. Editorial ACRIBIA. Madrid España.:545, 548-560, 585, 600-602, 607-609, 610, 618,619,636-639, 692 .

74.-World Cheese Exchange WCE. 2002. *Brief description Cheddar U.K./ American*. Cheese Exchange Home. Lovington New Mexico.CDE.**1** : 31,32.