

Parámetros tecnológicos que afectan la microestructura y actividad lipolítica de quesos. Proyección hacia quesos protegidos bajo denominación de origen: Queso Paipa.

Usgame Fagua K.G.¹
García Torres A.M.²
Martínez Zambrano J.J.³

Resumen

El queso Paipa es un queso semimaduro Colombiano único con denominación de origen, típico de la región Andina Colombiana cuya elaboración es a partir de leche cruda de vaca y fresca lo que le confiere un sabor ácido moderado, un color amarillo pálido y una textura y aroma rancio y fuerte [1]. La actividad lipolítica en derivados lácteos induce la formación de ácidos grasos libres (AGL) con beneficios para la salud y AGL precursores de componentes volátiles que contribuyen en las propiedades organolépticas de los quesos. Estudios relacionados con la implementación de tecnologías de producción: Uso de membranas cerámicas de microfiltración [2], variaciones en la composición y cantidad de precipitantes proteicos [3], incorporación de bacterias probióticas [4], implementación de procesos de homogenización, pasteurización y termización [5]; son algunos de los factores analizados principalmente, considerando las implicaciones generadas sobre la actividad lipolítica, producción de Ácidos grasos libres y el incremento de compuestos con propiedades funcionales como el Ácido Linoleico Conjugado (ALC), evaluando la relación presente de estos parámetros con el desarrollo de sabor, textura y demás propiedades características de los quesos. En general, estos estudios revisten gran importancia, puesto que los productos con denominación de origen buscan asegurar la calidad del mismo bajo las condiciones de manufactura tradicionales, garantizando a los consumidores la adquisición de un producto con características específicas que no presenta otro producto similar. El presente estado del arte da cuenta de los principales estudios realizados a quesos comerciales, tradicionales y con denominación de origen, como el queso Idiazabal, Pecorino, Cheddar y Emmental, y la importancia del estudio de estos procesos para posibles aplicaciones en quesos propios de la región de Boyacá, Colombia, como lo es el Queso Paipa.

¹ Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos- GIQTA. Escuela de Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Avenida central norte 39-115, Tunja 150003, Boyacá, Colombia. Tel +57(8)7405626 extensión 2444.

² Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos- GIQTA. Escuela de Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Avenida central norte 39-115, Tunja 150003, Boyacá, Colombia. Tel +57(8)7405626 extensión 2444.

³ Grupo de Investigación en Catálisis- (GC-UPTC). Escuela de Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Avenida central norte 39-115, Tunja 150003, Boyacá, Colombia. Tel +57(8)7405626 extensión 2444.

Grasa láctea en leche y quesos

La grasa presente en la leche esta agrupada en forma de gotas con un tamaño que oscila entre 0,2 y 15 μm , rodeadas de una membrana que las protege de la actividad lipolítica y que recibe el nombre de membrana de glóbulos grasos de leche (MFGM) (por sus siglas en inglés milk fat globule membrane). La grasa láctea se compone en un 98% de triacilgliceroles, es decir la molécula de glicerol está unida a tres ácidos grasos mediante enlaces éster. La acción de enzimas llamadas hidrolasas, genera ácidos grasos libres de longitudes de cadena $>4\text{C}$, glicerol, mono y diacilgliceroles; sin embargo, los ácidos grasos libres también pueden ser producidos a partir del metabolismo de aminoácidos y de carbohidratos por acción de la flora bacteriana, contribuyendo a las propiedades organolépticas del queso, y afectando principalmente su sabor. En este proceso se generan especies químicas a partir de reacciones catabólicas, las cuales son ocasionadas por la intervención de AGL [6].

C. López *et al.*, emplearon microscopía de escaneo laser confocal, mostrando la alteración producida en los glóbulos de grasa de las cuajadas de queso Emmental durante el prensado, verificando que la grasa se organiza en tres estados diferentes:

- Glóbulos de grasa coalescente (diámetro $\approx 0.5\text{-}10\ \mu\text{m}$).
- Agregados de glóbulos de grasa (diámetro $\approx 10\text{-}20\ \mu\text{m}$).
- Grasa no globular o libre (La que se encuentra protegida por una MFGM) (inclusiones $\approx 40\text{-}45\ \mu\text{m}$) [6]

El número de glóbulos de grasa en la leche oscila entre 10^{10} y 10^{11} glóbulos/mL y desarrollan un área de superficie en el rango de 5 a 11 $\text{m}^2 / 100\ \text{g}$ de leche. Los glóbulos con diámetro $<1\ \mu\text{m}$ representan aproximadamente el 80% del número total de glóbulos conteniendo poco del volumen total de grasa láctea; los glóbulos con un diámetro entre 1 y 8 μm contienen aproximadamente 90% del volumen total de grasa y se encuentran rodeados por una membrana que representa entre el 2 y el 6% de la masa de los glóbulos con un grosor promedio de 15nm y que los hace compatibles con el medio acuoso[2].

Coagulación de la leche

Para la elaboración del queso, se utiliza un precipitante proteico (comúnmente conocido como “Cuajo”). Se caracteriza por ser una sustancia líquida o en polvo, con la capacidad de coagular la leche mediante la acción de una mezcla de enzimas proteolíticas, (principalmente, quimosina y pepsina) provenientes de origen animal, vegetal o microbiano [7][8]. El proceso bioquímico de mayor importancia en la elaboración de los quesos, es la proteólisis. La proteólisis es la designación dada al proceso mediante el cual se degradan proteínas, dando como resultado péptidos de diversos tamaños y aminoácidos libres. Es conocido que la proteólisis influye notablemente en el desarrollo de textura y sabor en los quesos en forma indirecta, puesto que la producción de aminoácidos libres es el evento precursor para la

formación de compuestos relacionados con el aroma y sabor, en este caso, el conjunto de reacciones químicas que dan lugar a la formación de ácidos carboxílicos, alcoholes, cetonas y tioésteres determina el aroma y sabor del alimento [8].

El proceso de coagulación consta de dos etapas: una inicial, en la cual se realiza la proteólisis de la k-caseína por acción de la quimosina y, una segunda etapa de agregación de micelas para la formación de la cuajada. De acuerdo con el tipo de cuajo se presentan enzimas diferentes; así, los cuajos animales provenientes del cuarto estómago de los rumiantes (terneros, corderos, cabritos) contienen tanto proteasas como lipasas (encargadas de la digestión de la grasa de la leche) y esterases; mientras que, los cuajos vegetales se obtienen principalmente de la alcachofa (*Cynara scolymus*) y del cardo mariano (*Silybum marianum*) y los cuajos microbianos de origen fúngico provenientes en su mayoría de *Rhizomucor miehei*. El cuajo está constituido por diferentes proteasas como cipsosinas y cardosinas y no se ha descrito la presencia de lipasas o esterases [9].

Durante el proceso de elaboración del queso influyen fuertemente factores como la temperatura y el pH. Durante la etapa de coagulación se produce una disminución del pH, como consecuencia de la reducción de lactosa a ácido láctico por parte de las bacterias iniciadoras, factor que junto a una temperatura en un rango de 32-36°C y la incorporación de quimosina presente en el cuajo, favorecen la formación de una matriz de proteína producto de la agrupación de micelas de caseína libres presentes en la leche, las cuales se fusionan fuertemente de tal forma que se intercalan los glóbulos de grasa, la grasa libre, partículas de agua, fracciones de NaCl y minerales como el Calcio que se encuentran unidos a la caseína.[10]

Sabiendo que la tecnología de producción del queso influye sobre la textura y propiedades sensoriales, R. Lanciotti *et al.*, [11] han realizado estudios sobre los efectos del tipo de cuajo empleado así como las modificaciones organolépticas, sensoriales y nutricionales generadas sobre el producto final a partir de la adición de suplementos. El estudio de la tecnología de producción proporciona estrategias para la obtención de quesos típicos, sin modificación alguna del protocolo de producción y con características funcionales; un ejemplo de esto es lo ocurrido tras la incorporación de bacterias probióticas en la pasta de cuajo, de acuerdo con los estudios realizados por A. Santillo *et al.*, [12] en queso Pecorino. En dicho análisis, se utilizó como estrategia el implementar pastas de cuajo de cordero, para la fabricación de queso Pecorino, adicionadas con bacterias probióticas encapsuladas: *Lactobacillus acidophilus* y una mezcla de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium lactis*. Tras la adición de las bacterias, se logró un incremento en el contenido de ALC en el queso a los treinta días de maduración, mediante el uso de pastas de cuajo enriquecidas con *Lactobacillus acidophilus*.

Queso Paipa como marca de origen

En Colombia, según lo reportado en los registros de marcas, solo dieciséis (16) productos agroalimentarios cuentan con denominación de origen, entre los que se encuentran: siete (7) cafés, el biscocho de achira del Huila, el bocadillo Veleño, el arroz de la meseta de Ibagué, tres (3) variedades de flores, la cholupa del Huila y dos (2) quesos: Paipa y Caquetá [13]. Los productos típicos como el queso

Paipa presentan atributos de calidad diferencial, siendo apreciados por sus consumidores quienes encuentran características específicas que son otorgadas por las condiciones territoriales y costumbres de la población. Es bien sabido que la calidad de la leche proveniente de ganado raza Holstein, Normando, y Jersey, alimentados con pasto de la región, además del microclima del territorio y el protocolo de elaboración de los quesos (determinado por la cantidad de cuajo, sal y tiempo óptimo de amasado) son factores que influyen en la consistencia densa, aroma, color, textura y sabor propios de esta pieza [1][14].

Carga microbiológica en el queso Paipa

El queso Paipa es elaborado a partir de leche cruda de vaca, aspecto determinante en la adquisición de las características específicas del producto. La materia prima para la elaboración del queso no recibe ningún tipo de tratamiento de higienización más allá de la implementación de buenas prácticas de ordeño. Se han realizado estudios basados principalmente en la identificación de la carga microbiológica del queso, con el fin de evaluar la calidad de la leche y hacer un diagnóstico de las condiciones de ordeño. En el análisis realizado por E. Neira *et al.*, [14] se dedujo que la leche empleada no es una materia prima adecuada para el consumo humano, encontrando deficiencias en cuanto a la calidad microbiológica. Posteriormente, A. López *et al.*, [15] con el objetivo de aislar e identificar los hongos contaminantes desde el punto de vista de la flora fúngica, encontraron que especies de hongos filamentosos y levaduras podrían ser un riesgo de salud pública, al generar una posible producción de micotoxinas en el queso [17].

Según el ministerio de protección social, el índice máximo permisible en cuanto a calidad microbiológica de la leche cruda, en recuento de mesófilos anaerobios, es de 700.000 ufc/mL [16]. Existe una variedad de bacterias presentes en la leche que desempeñan funciones diferentes; entre estas se encuentran: *Clostridium*, *Bacillus* y *Pseudomonas* que pueden causar deterioro en la leche; *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Lactococcus* cuya función es fermentativa; Lactobacilos y Bifidobacterias que son benéficas para la salud; y Listeria, Salmonella, Escherichia Coli, Campylobacter, Estafilococcus aureus y hongos productores de micotoxinas que pueden causar enfermedades [17].

Alimentos con propiedades funcionales

En estudios realizados al queso Pecorino, A. Santillo *et al.*, encontraron que usando pasta de cuajo de cordero conteniendo *Lactobacillus acidophilus*, se genera un incremento en los niveles de (ALC) [4], el cual es un conjunto de isómeros del ácido linoleico, conocido por sus numerosos beneficios a la salud, entre los que se incluyen acciones para la reducción de: carcinogénesis, aterosclerosis, inicios de diabetes y la masa de grasa corporal [18]. Posteriormente, con el propósito de estudiar el efecto de la encapsulación de cultivos de *Lactobacillus acidophilus*, y una mezcla de *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium lactis* en la pasta de cuajo, A. Santillo *et al.*, encontraron que la encapsulación de bacterias probióticas adicionadas al cuajo podría proteger exitosamente las células durante el proceso de

elaboración del queso [12]; de otro lado, para investigar la influencia del uso de bacterias de ácido propiónico (PAB) y las condiciones de fabricación del queso Emmental Francés sobre la producción de ALC, J. Chamba *et al.*, analizaron el uso de diferentes cultivos de fermentación o períodos de maduración y cómo éstos podrían modular el nivel de ALC en el alimento final [19]. Así mismo, para evaluar el patrón lipolítico producido en el queso Pecorino, A. Santillo *et al.*, encontraron que existe una influencia en la cantidad de Ácidos Grasos Libres y Acido Linoleico conjugado, durante el proceso de maduración del queso, al emplear cultivos de probióticos en la pasta de cuajo [4]. A pesar de la cantidad de estudios realizados, aún existen brechas en el análisis de quesos bajos en grasas, se desconoce si las diferencias presentes en la estructura física del queso, son un factor que influye en una disminución de la velocidad de formación de componentes precursores del sabor [6]. Es necesario profundizar en la elaboración de productos lácteos tradicionales a medida que se explora la capacidad de los mismos, para incrementar y abordar otro tipo de propiedades que pueden conceder estos alimentos.

Tecnología de producción

Uno de los aspectos más influyentes en la fabricación de derivados lácteos, y principalmente de productos artesanales, es la incursión de tecnologías en el proceso de producción, puesto que podrían influir sobre las características específicas del producto. D.K Hickey *et al.*, han realizado estudios a quesos elaborados con leche cruda, pasteurizada y microfiltrada para evaluar la lipólisis en quesos tradicionales, específicamente en el queso Cheddar [5]; A su vez, han sido analizados aspectos relacionados con: el clima, el pastoreo, la pasta de cuajo empleada en la coagulación, los ácidos grasos libres presentes y cómo la organización de los glóbulos de grasa afectan la estructura, textura y otras propiedades organolépticas en el queso fabricado [6].

Fraccionamiento de glóbulos de grasa (centrifugación- microfiltración- homogenización)

Existen métodos de fraccionamiento de glóbulos de grasa enfocados principalmente al análisis de los cambios en la textura de productos lácteos, implementando tecnologías como centrifugación, microfiltración y homogenización. La centrifugación es un método de separación de los componentes de una mezcla por acción de fuerza centrífuga, de acuerdo a las diferencias de densidad; La microfiltración es una técnica de filtración tangencial que permite el fraccionamiento de la grasa de leche y que ofrece un criterio de separación mucho mejor que la densidad del glóbulo. Por otro lado, métodos mecánicos como la homogenización, aumentan el número de glóbulos de grasa al mismo tiempo que perturban la sensación bucal producida por la leche, otorgándole un sabor más dulce; sin embargo, se altera su integridad y se conduce a un proceso de lipólisis acelerada. A diferencia de la homogenización, tecnologías como la centrifugación y microfiltración no dañan la membrana de los glóbulos de grasa, el cual es un factor determinante en la capacidad para unir agua de leche preparada con glóbulos grasos de distintos tamaños. Los cambios en la textura de productos lácteos, surgen como respuesta a las variaciones en la cantidad de glóbulos grasos, y son inducidos por la intensidad de las interacciones entre los componentes del glóbulo de grasa y su entorno (componentes del agua, componentes solubles,

micelas de caseína y matriz de caseína)[20]. Estos resultados han sido considerados preliminares; especificando que se requiere trabajo adicional en campos como: Optimización del proceso de separación por microfiltración, en el cual es importante minimizar el esfuerzo cortante causado por bombas, válvulas, y tuberías del equipo; y existen brechas en el análisis de las diferencias en cuanto a la composición de triglicéridos en las fracciones de glóbulos de diferentes tamaños. En general, se concluyó que la microfiltración es una herramienta importante en la intervención en el tamaño de los glóbulos grasos sin perjudicar la MFGM, abriendo por consiguiente, una nueva posibilidad para el ajuste de textura y sabor de productos lácteos[2].

Ultrafiltración y estandarización de proteínas.

Se han realizado estudios encaminados hacia la estandarización de la leche y sus proteínas mediante técnicas de ultrafiltración. La ultrafiltración es una técnica que permite la concentración selectiva de proteínas de la leche o del lacto suero de la leche, haciendo que sea más consistente el procesamiento y se dé una mayor calidad del producto [20]. Tanto microfiltración como ultrafiltración son técnicas de separación física de membrana, y su diferencia reside en el tamaño de los poros, los cuales van desde 0.1 – 10 μm para microfiltración, y 0,001 - 0,1 μm para ultrafiltración.

En general, el proceso de ultrafiltración favorece la concentración de proteínas y grasas importantes en la fabricación del queso, incrementa la masa de la cuajada a media que se disminuyen costos en cuanto a utilización de cuajo y favorece la segregación de la grasa de las proteínas incrementando el contenido proteico. En el caso de productos elaborados con leche ultrafiltrada, se debe desarrollar un método que permita el aumento de humedad, puesto que la ultrafiltración de la leche genera una disminución en los niveles de humedad de los productos fabricados al incrementar la concentración de proteínas. Entre los métodos normales para lograr la estabilización en cuanto a éste parámetro, se sitúan las variaciones de temperatura, ya sea de la temperatura establecida para el proceso de fabricación, la máxima de escaldado o de la velocidad de cocción. Cuando es aún mayor la concentración de proteínas y por tanto muy bajo el nivel de proteólisis, un aumento en la dosis de cuajo basta para superar la problemática. La ultrafiltración previa de leche para la producción de queso a niveles de proteína de 45 g / L permite elevar el rendimiento de queso y ofrece una resistencia del gel aún más uniforme en el corte, características que son notoriamente positivas para el mejorando del producto final [10].

Lipólisis en quesos

La lipólisis es un proceso metabólico mediante el cual los lípidos son transformados para producir ácidos grasos mediante la hidrólisis de triacilglicéridos, por la acción de enzimas lipolíticas. La lipólisis en quesos es realizada por la vía hidrolítica principalmente. Sus precursores se encuentran como enzimas lipolíticas presentes en: el precipitante proteico, enzimas microbianas y la lipasa nativa de la leche (como el caso de la lipoproteína lipasa, cuya acción alcanza a ser cuantificable). Los ácidos grasos libres y principalmente los ácidos grasos volátiles de cadena corta producidos, influyen de forma significativa en

el sabor adquirido por el queso, al ser precursores de otros compuestos como ésteres y tioésteres [8]. La lipólisis en quesos es un factor influyente en la formación de compuestos volátiles, ácidos grasos libres y en general compuestos que tienen la capacidad de provocar alteraciones en el sabor, generando rancidez y sabores jabonosos, cuando su producción es excesiva. Así mismo, también es posible generar compuestos con propiedades funcionales como el ALC y principalmente sus isómeros cis9-trans11 y trans10-cis12 a partir de variaciones en la lipólisis en el queso[21].

Actividad lipolítica:

Usualmente la cuantificación de la actividad lipolítica en quesos se realiza en términos de unidades lipolíticas (UL), siendo definida una UL como la cantidad de enzima que produce un conjunto de AGL valorable con 1 μ Eq de NaOH hasta alcanzar un pH de 8.5, sobre un sustrato de crema de leche después de 24 horas a 37 °C [4].

La actividad lipolítica ejercida por el tipo de cuajo induce la formación de ácidos grasos libres precursores de componentes volátiles que contribuyen en el sabor del queso; sin embargo, este es un proceso dependiente de las lipasas presentes en el tipo de cuajo adicionado, debido a que al poseer características específicas, tienen la habilidad de incrementar la actividad enzimática [4].

Se han realizado estudios pertinentes a factores que inducen actividad lipolítica, comparando la lipólisis en quesos elaborados con leche cruda, termizada y pasteurizada; a partir de los resultados obtenidos, se concluyó que la actividad de la lipoproteína lipasa se inactiva parcialmente en quesos elaborados con leche termizada [5].

Para evaluar los patrones lipolítico y proteolítico generados por la fuente de la leche y el protocolo de producción, M. Albenzio *et al.*, encontraron que el uso de leche cruda, cultivos de suero naturales y la pasta de cuajo empleada, influyen notablemente en el perfil lipolítico y proteolítico, de tal forma que la calidad de la leche y las técnicas de fabricación, juegan un papel importante sobre las características de la maduración del queso [22].

M. Renobales *et al.*, estudiaron los efectos sobre la lipólisis y el sabor del queso Idiazabal, al ser fabricado con pasta de cuajo de cordero o pasta de cuajo bovino y, una cantidad alta o baja de coagulante, ejerciendo una actividad total de coagulación de 2500 o 1000 RU respectivamente. Como resultado encontraron que el ácido butírico es el ácido graso más pronunciado tras el proceso de maduración, además de existir una diferencia significativa en los niveles de ácidos grasos libres presentes en los quesos, al utilizar las variables de estudio. En los quesos elaborados con pasta de cuajo de cordero, la concentración de ácidos grasos libres de cadena corta (C12), fue mayor que en los elaborados con cuajo bovino. Por otra parte, debido a que la pasta de cuajo de cordero ejerce una mayor actividad lipolítica, y por consiguiente produce una mayor cantidad de ácidos grasos libres, los quesos elaborados con cuajo de cordero recibieron mayores puntajes en el análisis sensorial, el cual evaluaba propiedades como

intensidad de olor y sabor, olor penetrante, sabores amargos y picantes, olor y fragancia de cuajo natural, corroborando finalmente la relación existente entre la lipólisis y las propiedades organolépticas en los quesos [3] [24].

M. Addis *et al.*, usaron extractos de cuajo con el fin de evaluar su actividad lipolítica. Análogamente, para estudiar la especificidad del sistema lipolítico de las pastas de cuajo, tomaron muestras con las mismas unidades lipolíticas para determinar los AGL liberados durante la hidrólisis. En base a sus investigaciones encontraron que el tipo de cuajo utilizado en la elaboración de los quesos no causó diferencias significativas en la composición bruta del queso o en las fracciones de nitrógeno (las cuales se relacionan con la proteólisis efectuada); contrariamente, se encontraron diferencias significativas en las cantidades y el tipo de ácidos grasos libres presentes, los cuales guardan una estrecha relación con el proceso lipolítico durante la maduración. No obstante, en sus conclusiones señalaron que se desconoce si las diferencias en el perfil de AGL se deban a los cambios en la actividad lipolítica total del cuajo o dependan de la especificidad de las lipasas; puesto que no se encuentra información reportada que permita adjudicar con certeza esta relación[23].

Métodos de análisis de actividad lipolítica:

Entre los principales procesos empleados para la evaluación de la actividad lipolítica en productos lácteos, la metodología expuesta por M. Addis *et al.*, [23] para la determinación de la actividad lipolítica en la pasta de cuajo es de las más reportadas, en esta se realiza una preparación de un sustrato de crema de leche al que se le adiciona una alícuota de extracto de cuajo previamente preparado, incubando la muestra a 37°C durante 24 horas. La actividad lipolítica se calcula mediante una titulación de los ácidos Grasos Libres hasta un pH de 8.5. Para determinar la especificidad de las lipasas se realiza una extracción de ácidos Grasos Libres de acuerdo con el método propuesto por H. T. Badings *et al.*, [24] y finalmente, determina su perfil mediante cromatografía de gases, analizando la preferencia de las enzimas lipolíticas presentes en cada cuajo de acuerdo a la cantidad de ácidos grasos de cadena corta (C4:0 - C10:0), de cadena media (C12:0 - C16:0) y de cadena larga (C18:0 - C18:3) producidos[23].

Según lo reportado en la literatura en cuanto a métodos de extracción y aislamiento de AGL, el protocolo empleado por H. T. Badings *et al.*, [24] es referenciado en diversos artículos [4], [6], [11], [12], [22] y [23].

Extracción de Ácidos Grasos

El proceso de extracción de ácidos grasos propuesto por H. T. Badings *et al.*, [24] es una extracción con éter/heptano, de los AGL presentes tanto en leche como en queso; incluyendo una posterior clarificación por centrifugación. En el procedimiento realizado por M. Yurawecz *et al.*, [25] se realiza una extracción

de lípidos con éter dietílico y éter de petróleo, mediante una centrifugación de un sustrato de queso, y una posterior determinación gravimétrica de los lípidos totales. En este mismo proceso se realiza un análisis del contenido de CLA, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (por sus siglas en inglés high performance liquid chromatography) y cromatografía de gases (CG) de la muestra de ácidos grasos libres.

Aislamiento de AGL

H. T. Badings *et al.*, [24] plantean dos métodos de aislamiento. El primer método es un aislamiento de los ácidos grasos libres presentes en el extracto de éter/heptano obtenido anteriormente, empleando una columna de alúmina; ésta absorbe los AGL, y son posteriormente aislados con éter dietílico y ácido fórmico. Recogiendo finalmente el sobrenadante, se puede realizar un análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases.

El segundo método es el método de intercambio de aniones, en el cual se emplean columnas de aminopropilo acondicionadas con heptano. El extracto lipídico obtenido anteriormente es aplicado a la columna, los lípidos neutros son eluidos con una solución de cloroformo/2 propanol, y los AGL son eliminados con dietiléter y ácido fórmico. Al igual que en el método anterior, se toma una muestra para la determinación de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases.

Ambos métodos descritos son considerados por los autores, como simples y confiables; sin embargo, el método de la columna de aminopropilo es calificado como el método más apto para el aislamiento de los AGL de los extractos lipídicos, puesto que se obtiene una recuperación del 98-100%, las cantidades de solventes y muestra requeridas son pequeñas, y se pueden cuantificar con buena repetibilidad los principales AGL.

Análisis de microestructura y localización preferencial de bacterias

Microscopia de escaneo de laser confocal

Son muy pocos los estudios enfocados al análisis de microestructura y localización preferencial de bacterias en el queso a fin de precisar detalladamente el mecanismo mediante el cual la grasa se dispone para la ejecución de la lipólisis, especialmente por las implicaciones económicas que significa un estudio de este tipo; no obstante, C. López *et al.*, [6] realizaron un análisis de microestructura en tajadas de queso Emmental, utilizando microscopia de escaneo de laser confocal, mediante la tinción de la red de proteínas y el ADN de las bacterias con Naranja de Acridina y, el uso del colorante Rojo de Nilo soluble en lípidos para la tinción de la grasa [28]

C. López *et al.*, pudieron concluir que tanto la localización de las bacterias como la organización supramolecular de la grasa libre, favorecen el acceso de la grasa a las enzimas lipolíticas. Fueron identificados dos tipos de bacterias: bacilos y cocos, los cuales se organizan en forma de colonias y se agrupan preferiblemente en la interfaz grasa/proteína donde se encuentran, junto con la grasa, atrapadas en la red de caseína. El análisis de las fotografías obtenidas por microscopia permitió analizar que en este tipo de queso la organización de la grasa no varía durante el proceso de maduración, ya que posterior al prensado se genera una especie de emulsión de aceite en agua, compuesta por una

dispersión de inclusiones de grasa, de tal forma que la grasa y la red de proteínas permanecen interconectadas

La lipólisis de este queso se da por la actividad lipolítica de las bacterias de ácido propiónico que requiere la liberación de las enzimas. Al encontrarse agrupadas en la interfaz, la difusión de las enzimas y en consecuencia la lipólisis, no es homogénea en la matriz del queso. Dado que la mayoría de especies químicas responsables del sabor son solubles o parcialmente solubles en grasa, ésta hace las veces de depósito, lo que permite su liberación tras la ingestión del alimento y contribuye en la percepción del producto. En general las enzimas lipolíticas son específicas para las posiciones sn-1 y sn-3, (los enlaces éster externos de los triacilgliceroles); Los ácidos grasos de cadena corta y media (C6:0 - C10:0), y principalmente el ácido butanoico (C4: 0), se ubican preferencialmente en la posición sn-3 y son liberados destacadamente por las enzimas lipolíticas. Otros ácidos como el ácido palmítico (C16: 0), el ácido esteárico (C18: 0) y el ácido oleico (C18: 1) ubicados en la posición sn-1 son altamente susceptibles de liberarse en la lipólisis [6].

Microscopia electrónica de barrido

Se ha realizado análisis de microestructura empleando Microscopia electrónica de Barrido (MEB) como técnica para la evaluación de los cambios producidos durante el proceso de manufactura del queso Mozzarella. C. J. Oberg *et al.*, [26] han registrado micrografías de tajadas de queso para comparar las alteraciones generadas en la estructura durante las etapas de fabricación. En las imágenes se revelan las implicaciones sobre la matriz proteica, el efecto de dispersión de los glóbulos grasos y la localización preferencial de las bacterias durante el procesamiento. Al igual que se concluyó a partir de la micrografías de microscopia de laser confocal obtenidas por C. López *et al.*, [6] la ubicación preferencial de las bacterias es en la interface suero/grasa.

Este tipo de análisis es de gran importancia puesto que estas micrografías se pueden utilizar para llevar un monitoreo de los cambios generados en la estructura de la cuajada cuando se modifican los procedimientos de fabricación de los quesos. Así como lo señalan C. J. Oberg *et al.*, es una herramienta útil en lo relacionado con la optimización de las propiedades físicas del queso mozzarella bajo en grasa y sin grasa[17]. Por otro lado, podría ser una herramienta utilizada para el seguimiento de las variaciones estructurales producidas durante la maduración de los quesos, o tras la implementación de otras técnicas diferentes a las comunes al momento de la fabricación.

Conclusión

Esta revisión ha compilado el estado del arte actual sobre la influencia de algunos de los parámetros de tecnología de producción del queso y sus posibles implicaciones sobre la actividad lipolítica en productos lácteos. Existe una cantidad considerable de publicaciones enfocadas al estudio de la actividad lipolítica en quesos tradicionales como el queso Idiazabal, Pecorino, Emmental y Cheddar, sin embargo es poco el estudio relacionado con quesos de la región como el queso Paipa, el cual debido a sus características organolépticas específicas, consecuencia del tipo de leche y el protocolo de producción, es un queso óptimo para un análisis de actividad lipolítica, con el fin ya sea de mejorar algunas de sus propiedades,

analizar algunos factores que influyen la actividad lipolítica y las consecuencias de estas variaciones sobre las propiedades organolépticas del producto.

REFERENCIAS

- [1] A. Camacho, G. Muñoz, A. Cristina, and R. Real, "PRODUCTO TÍPICO-TERRITORIO : UNA," 2014.
- [2] H. Goudéranche *et al.*, "Fractionation of globular milk fat by membrane microfiltration To cite this version : HAL Id : hal-00895390 Original article Fractionation of globular milk fat by membrane microfiltration," 2000.
- [3] M. Virto *et al.*, "Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour," *Int. Dairy J.*, vol. 13, no. 5, pp. 391–399, 2003.
- [4] A. Santillo, M. Albenzio, M. Quinto, M. Caroprese, R. Marino, and A. Sevi, "Probiotic in lamb rennet paste enhances rennet lipolytic activity, and conjugated linoleic acid and linoleic acid content in Pecorino cheese," *J. Dairy Sci.*, vol. 92, no. 4, pp. 1330–1337, 2009.
- [5] D. K. Hickey, K. N. Kilcawley, T. P. Beresford, and M. G. Wilkinson, "Lipolysis in Cheddar Cheese Made from Raw, Thermized, and Pasteurized Milks," *J. Dairy Sci.*, vol. 90, no. 1, pp. 47–56, 2007.
- [6] C. Lopez, M. B. Maillard, V. Briard-Bion, B. Camier, and J. A. Hannon, "Lipolysis during ripening of emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 16, pp. 5855–5867, 2006.
- [7] C. Ramírez, "El cuajo," *Fac. Nac. Agron.*, pp. 406–414, 2009.
- [8] S. . Chaparro Acuña, A. . Lara Sandoval, A. Sandoval Amador, S. . Sosa Suarique, J. . Martínez Zambrano, and J. . Gil González, "Functional Characterization of Mango Seeds Kernel (*Mangifera indica* L.)," *Cienc. en Desarro.*, vol. 6, no. 1, pp. 67–75, 2015.
- [9] V. Gasteiz, "Tipos de cuajos y sus características," *IV Jornadas quesos Canar.*, pp. 1–36, 2007.
- [10] C. D. Hickey, M. A. E. Auty, M. G. Wilkinson, and J. J. Sheehan, "The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 2, pp. 135–148, 2015.
- [11] G. Suzzi *et al.*, "Influence of pig rennet on fatty acid composition, volatile molecule profile, texture and sensory properties of Pecorino di Farindola cheese," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 95, no. 11, pp. 2252–2263, 2015.
- [12] A. Santillo, M. Albenzio, A. Bevilacqua, M. R. Corbo, and A. Sevi, "Encapsulation of probiotic bacteria in lamb rennet paste: effects on the quality of Pecorino cheese.," *J. Dairy Sci.*, vol. 95, no. 7, pp. 3489–500, 2012.
- [13] Y. A. Camacho, "Productos agroalimentarios con identidad del selección de signos distintivos con vínculo," no. August 2012, 2015.
- [14] J. A. Rojas and A. Hormaza, "Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca," *Rev. Cienc. en Desarro.*, vol. 5, no. 2, pp. 197–205, 2014.
- [15] N. B. Esperanza and J. A. de Silvestri Saade, "Análisis del proceso de ordeño y de la calidad higiénica de la leche utilizada en la fabricación del queso Paipa en el municipio de Paipa (Boyacá),

- Colombia 1 Milking process and sanitary quality analysis of milk used in Paipa cheese production in Paipa," *Rev. Investig. Univ. la Salle*, vol. 6, no. 2, pp. 163–170, 2006.
- [16] P. Del and M. D. E. Paipa, "Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914030>," 2012.
- [17] G. M. Cortés Díaz, G. A. Prieto Suárez, and W. E. Rozo Nuñez, "Caracterización bromatológica y fisicoquímica de la uchuva (*Physalis peruviana* L .) y su posible aplicación como alimento nutracéutico," *Cienc. en Desarro.*, vol. 6, no. 1, pp. 87–97, 2015.
- [18] M. A. Belury, "Physiological Effects and Mechanisms of Action," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 22, no. 1, pp. 505–531, 2002.
- [19] S. Gnädig *et al.*, "Influence of manufacturing conditions on the conjugated linoleic acid content and the isomer composition in ripened French Emmental chesse," *J. Dairy Res.*, vol. 71, no. 3, pp. 367–371, 2004.
- [20] A. F. Cruz Pacheco and J. A. Gómez Cuaspud, "Synthesis and Characterization of the La0.8Sr0.2MnO3 System," *Cienc. en Desarro.*, vol. 6, no. 2, pp. 133–139, 2015.
- [21] "Capítulos-1-4-Introducción-a-la-tecnología-quesera-Mahaut.pdf." .
- [22] R. R. Yang B, Chen H, Stanton C, "Review of the roles of conjugated linoleic acid in. *J Funct Foods*," *Elsevier*, vol. 15, no. 314–25, pp. 314–325, 2015.
- [23] M. Albenzio, A. Santillo, D. E. Russo, M. Caroprese, R. Marino, and A. Sevi, "Influence of milk quality and production protocol on proteolysis and lipolysis in Monti Dauni Meridionali Caciocavallo cheese," *J. Dairy Res.*, vol. 77, no. 4, pp. 385–391, 2010.
- [24] W. Medina, D. García, and F. Sánchez, "Aves y mamíferos de bosque altoandino-páramo en el páramo de Rabanal (Boyacá-Colombia)," *Cienc. en Desarro.*, vol. 6, no. 2, pp. 185–198, 2015.
- [25] M. Addis, A. Pirisi, R. Di Salvo, F. Podda, and G. Piredda, "The influence of the enzymatic composition of lamb rennet paste on some properties of experimentally produced PDO Fiore Sardo cheese," *Int. Dairy J.*, vol. 15, no. 12, pp. 1271–1278, 2005.
- [26] C. De Jong and H. T. Badings, "Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis," *J. High Resolut. Chromatogr.*, vol. 13, no. 2, pp. 94–98, 1990.
- [27] N. Sehat *et al.*, "Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences," *Lipids*, vol. 33, no. 10, pp. 963–971, 1998.
- [28] M. Armando and R. Villamil, "Some Remarks About the Cyclic Homology of Skew PBW Extensions Algunas observaciones sobre la homología cíclica de extensiones PBW torcidas," *Cienc.en Desarro.*, vol. 7, no. 2, pp. 99–107, 2016.
- [29] C. J. Oberg, W. R. McManus, and D. J. McMahan, "Microstructure of Mozzarella cheese during manufacture," *Food Struct.*, vol. 12, no. 2, pp. 251–258, 1993.