

CAPÍTULO II

ADITIVOS EMPLEADOS EN QUESERÍA
ADDITIVES USED IN CHEESE FACTORY

RESUMEN	28
ABSTRACT	29
INTRODUCCIÓN	30
ADITIVOS QUE CONTROLAN EL COLOR EN LOS QUESOS	30
Onoto	31
Peróxido de benzoílo	34
ADITIVOS QUE COADYUDAN A LA MADURACION DE LOS QUESOS	36
Lipasas	36
Proteasas	38
ADITIVO QUE COADYUDAN A LA COAGULACIÓN EN LOS QUESOS (CaCl ₂)	40
ADITIVOS QUE INDUCEN A LA COAGULACIÓN EN LOS QUESOS (Cuajo)	42
Cuajo de origen animal. Quimosina	43
Cuajo de origen vegetal	44
Cuajo de origen microbiano	45
ADITIVOS QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMO EN LOS QUESOS	46
Nisina	46
Natamicina	50
CONCLUSIONES	53
CUESTIONARIO	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMEN

Los aditivos alimentarios empleados en quesería provienen de fuentes naturales y procesos biológicos aprobados para su uso y considerados seguro para su incorporación en los quesos según en las cantidades establecidas por las instituciones internacionales como la FDA (*Food and Drug Administration*) y FAO (*Food and Agriculture Organization*). La presente revisión tiene como objetivo en describir los principales aditivos naturales empleados en la industria de quesería. Entre las principales contribuciones que se realizan en este capítulo es que se discuten el modo de acción y aplicación, dosis, estructura química, modo de preparación y ejemplo de cálculo de los aditivos usados en quesería. Los aditivos en la industria de quesería, que mejoran la apariencia y percepción visual de los quesos son la Norbixina en queso Gouda y Cheddar, y el Peróxido de Benzoílo en queso Mozzarella. Los aditivos que contribuyen a la coagulación de la leche cuando ha sido pasteurizada es el CaCl_2 , ya que permite restituir el tamaño de la micela de caseína. La enzima responsable de coagular la leche es la quimosina. Mientras que las enzimas lipasas, esterases pregástrica y proteasas se emplean para incrementar el sabor y acelerar la maduración de los quesos. El aditivo empleado para evitar el crecimiento de patógenos Gram positivo es la Nisina. Por su parte, la Natamicina inhibe el deterioro de los quesos por la presencia de hongos/levaduras. El uso de aditivos alimentarios en quesería es de suma importancia porque de esta forma contribuye a mantener el estándar de identidad o características que identifican a cada uno de los quesos durante su tiempo de comercialización y vida útil y evitando de esta forma los brotes y problemas de intoxicación alimentaria ocasionada por el consumo de alimentos deteriorados.

Palabras clave. Aditivos, cloruro de calcio, Nisina, Norbixina, quesos, Quimosina.

ABSTRACT

Most food additives used in the cheese industry are initially obtained from natural sources and biological processes considered safe for being incorporated into cheeses according to the amounts established by international institutions such as the FDA (*Food and Drug Administration*) and FAO (*Food and Agriculture Organization*). The purpose of this review is to describe the main food additives used in the cheese industry. Some of the main contributions made in this chapter are the mode of action and application, dose, chemical structure, method of preparation, and an example of calculation of the additives used in cheese are discussed. Norbixin is an additive that improve the appearance and visual perception of the cheeses such as Gouda and Cheddar. In addition, Benzoyl Peroxide is used to improve the white color of Mozzarella cheese. Calcium Chloride (CaCl_2) is the additive that contributes to milk coagulation when it has been pasteurized due to the fact that its action restores the size of the casein micelle. The enzyme responsible for coagulating milk is Chymosin. On the other hand, the enzymes used to increase the flavor and accelerate the maturation of cheese are lipases, pregastric esterases, and proteases. Nisin is an additive used to prevent Gram (+) pathogens, whereas Natamycin inhibits cheese's spoiling due to the growth of molds and yeast. The use of food additives in the cheese industry is fundamental since that contributes to maintain the standard of identity or characteristics that identify each types of cheese during their marketing time and shelf life; avoiding food poisoning outbreaks caused by the consumption of spoiled foods.

Key words. Additives, Calcium Chloride, Nisin, Norbixin, cheeses, Chymosin.

INTRODUCCIÓN

Los aditivos alimentarios son componentes químicos o biológicos que son incorporados intencionalmente a la materia prima, para incrementar la durabilidad del producto e incrementar o modificar sus propiedades, incluyendo apariencia, sabor o estructura, sin ocasionar detrimento en su valor nutricional. Las sustancias pueden ser de origen natural o sintéticos y se adicionan en pequeñas cantidades durante su manufactura con la finalidad de mantener el estándar de identidad de los alimentos y aumentar su vida de anaquel (Silva y Cebola, 2016).

En quesería se emplean la norbixina para proporcionar color a los quesos, el cloruro de calcio que coadyudan a la coagulación de la leche (Lucey y Fox, 1993), la renina como agentes coagulantes (Ruiz-Rojas, 2005), las lipasas y proteasas para acelerar la maduración en los quesos (Kilara y Chandan, 2011), y el peróxido de benzoílo (Chandan y Kapoor, 2011) como agente oxidante para mantener el color blanco de la leche y por ende de los quesos, así como la nisina y natamicina que se emplean en el control de microorganismos en los quesos (Delves-Broughton, 2012).

La importancia de emplear estos aditivos en la industria de los quesos, es que aseguran el estándar de identidad y la inocuidad alimentaria, dado que los quesos en general son susceptibles al deterioro durante el tiempo de almacenamiento y comercialización, y por otra parte los consumidores puedan aprovechar los productos alimenticios para su nutrición.

Basados en lo anteriormente señalado, esta revisión tiene como objetivos planteados en describir los principales aditivos alimentarios empleados en la industria de quesería, cual es el fundamento de su uso, estructura química, estabilidad en el almacenamiento, dosis y modo de acción y aplicación, así como un ejemplo de cálculo de las cantidades a incorporar.

Al final del capítulo, se propone un cuestionario de preguntas para fijar los conocimientos relacionados con el tema de aditivos en la industria de los quesos. Así, el lector, junto con la práctica que pueda realizar en laboratorio y en la planta, tendrá la capacidad para realizar los ajustes en los parámetros requeridos para la preparación de aditivos en la elaboración de quesos frescos o madurados blandos, semiduros y duros a partir de leche pasteurizada.

ADITIVOS QUE CONTROLAN EL COLOR EN LOS QUESOS

El color en los alimentos es una de las características más importantes que influyen en la percepción del sabor y la preferencia del consumidor, por lo tanto en su selección para la compra (Sukkwai *et al.*, 2018). Entre los colorantes sintéticos y naturales, los colorantes naturales tienen mayor preferencia en el público consumidor por ser más atractivos, son más saludables, seguros desde el punto de vista de inocuidad, y además puede proporcionar propiedades funcionales adicionales como antioxidantes, antimicrobiales y emulsificantes (Sharma *et al.*, 2019).

El onoto (*Bixa orellana* L.) es el aditivo de color que se usa en la industria de quesería y comercialmente puede venir en cuatro formas: soluble en aceite (bixina), soluble en agua (Norbixina), en emulsión y en solvente (Smith, 2014), el mismo autor señala que hay otros componentes químicos que hacen lo contrario, es decir remueven el color por oxidación, como es

el caso del peróxido de benzoílo, para conservar el color blanco en los quesos, ya que en algunas ocasiones la concentración de β -caroteno en la leche de vaca es alta, dado que el β -caroteno le confiere el color amarillo en quesos madurados.

Onoto

El onoto en la Unión Europea posee el número de identificación E160b y en los Estados Unidos (*annatto*) está en la lista de los aditivos de color “Exentos de certificación” lo cual es considerado de manera informal como colorante natural. El color de rojo intenso, se lo confiere la bixina y entre amarillo y anaranjado la norbixina, las cuales vienen en forma de apocarotenoides. El extracto crudo soluble en grasa se denomina bixina (Ester monometílico de ácido dicarboxílico norbixina) puede ser hidrolizado para que sea soluble en agua en el componente químico denominado norbixina (Sharma *et al.*, 2019).

Bixina. Composición química. El éster monometílico de ácido dicarboxílico norbixina, es una cadena carbonada de 20 carbonos con 9 dobles enlaces dos grupos funcionales carboxílico a los extremos de la estructura, 4 radicales metilos a lo largo de la estructura y uno localizado al extremo de la cadena esterificando a uno de los grupos carboxílicos, también se le puede nombrar como diapocarotenoide 9'-*cis*-bixina (Scooter *et al.*, 1998) (Figura 1).

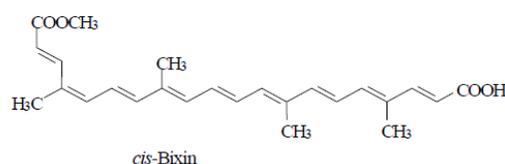


Figura 1. Estructura química de la bixina. Fuente: Wallin (2006), citado por Sharman *et al.*, (2019).

Bixina. Aplicación y dosis. La bixina viene disuelta en aceite de alta pureza (aceite de soya y girasol) con bajo contenido de ácidos grasos libres peróxidos. La forma disuelta en aceite contiene entre 0,05 a 1% de bixina, mientras que aquella que se encuentra en suspensión generalmente contiene entre 0,1 a 8 % de bixina (Smith, 2006).

Frecuentemente se usan este tipo de colorante en alimentos con alto contenido de grasas, tales como cremas lácteas, quesos procesados saborizado o no, quesos amarillo, quesos cubiertos con una capa edible de aceite (Sharma *et al.*, 2019).

El código Federal de Regulación de los Estados Unidos 21 CFR 73.30 (CFR, 1963) es el ente encargado de regular el uso del onoto en los alimentos en los Estados Unidos, e identifica los aditivos de color como de excepción para su certificación. El CFR (siglas en inglés *Code Federal of Regulation*) considera los extractos de onoto seguro y en general se puede emplear para colorear los alimentos en cantidades consistentes de Buenas Practicas de Fabricación (BPF), aunque la fuente del colorante debe ser declarada (Smith, 2014), lo anterior significa que se puede incorporar al alimento las cantidades que sean requeridas para mantener su estándar de identidad.

Norbixina. Composición química. La estructura química de la norbixina presenta una cadena carbonada de 20 átomos de carbono y donde el principal grupo funcional es el ácido carboxílico y puede venir acompañado por sus sales de sodio o de potasio. El compuesto es denominado: ácido dicarboxílico 9'cis-norbixina (Scotter *et al.*, 1998), y puede apreciarse en la Figura 2.

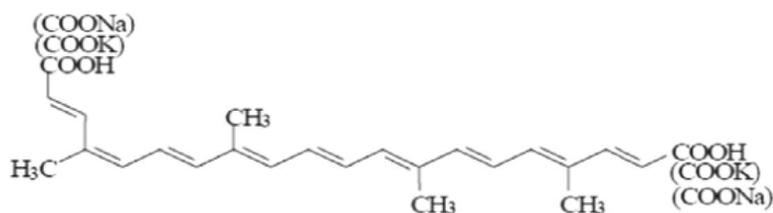


Figura 2. Estructura química de la Norbixina. Fuente: Wallin (2006), citado por Sharman *et al.*, (2019).

Bajo condiciones de temperatura y pH la norbixina puede saponificarse en sales de sodio o de potasio de norbixina. La saponificación durante la extracción acuosa de la norbixina remueve el grupo metil de la fracción soluble en lípido de la bixina convirtiéndola en sales de norbixina en forma de sodio o potasio (Santos *et al.*, 2014).

Norbixina. Aplicación y dosis. El extracto líquido acuoso generalmente contiene de 0,1 a 4 % de norbixina, mientras que su forma en polvo presenta entre 1 a 15 % (Smith, 2006). La norbixina viene en forma líquida y se agrega antes de la coagulación de la leche en el proceso de elaboración de queso Cheddar o el queso Gouda amarillo, con la finalidad de conferirle el color que va desde amarillo ligero a anaranjado intenso (ver escala de color en Figura 3), y mantener consistente su color característicos durante el tiempo de comercialización.



Figura 3. Estándar de color del Instituto Nacional de Quesos. Fuente: Smith (2014)

Para darle el color amarillo anaranjado en el queso Cheddar la dosis de incorporación es de 3,3 mL/100 kg leche (escala de color 3), en donde se disuelve el colorante en agua y se adiciona a la leche agitando de manera constante hasta lograr homogenizar todo el color de la leche. Se debe considerar un pequeño volumen adicional, ya que el 20% del color se pierde con el suero (Smith, 2014).

Ejemplo de aplicación. Determine la cantidad de norbixina expresada como ppm en producto final (queso), considerando que la norbixina comercial tiene una concentración del 4

% y la proporción a incorporar en la leche es de 3,3 mL/100 kg leche. Considere una retención del 80 de norbixina en los quesos.

i. Data

- Norbixina: 4%; 40000 mg/L
- Proporción de norbixina a incorporar en la leche: 3,3 mL/100 kg leche
- Rendimientos: 11,11 kg queso/100kg leche
- Peso base 100 kg de leche

ii. Cálculos

1. Calcular cantidad de norbixina en mg.

$$\frac{40000 \text{ mg Norbixina}}{1000 \text{ mL}} \times 3,3 \text{ mL} = 132 \text{ mg Norbixina} \dots\dots\dots (1)$$

2. Calcule los ppm de norbixina en queso.

$$\frac{132 \text{ mg}}{11,11 \text{ kg queso}} = 11,88 \text{ ppm norbixina} \dots\dots\dots (2)$$

3. Considerar el 20 % de pérdida.

$$\frac{11,88 \text{ ppm}}{100\%} \times 80\% = 9,5 \text{ ppm norbixina} \dots\dots\dots (3)$$

iii. Modo de preparación

Medir 3,3 mL de norbixina y diluir en 100 mL de agua destilada, luego se incorpora directa a la leche antes de la coagulación. Verifique el color con la escala de color propuesta publicada por Smith (2014) y realice el ajuste necesario. Si desea considerar la pérdida de norbixina en el suero (20 %):

1. Calcular cantidad de norbixina en mg considerando 100 % de retención

$$\frac{11,88 \text{ ppm}}{80\%} \times 100\% = 14,85 \text{ ppm norbixina} \dots\dots\dots (4)$$

2. Calcular cantidad de norbixina en mg en 11,11 kg de queso a procesar

$$\frac{14,85 \text{ mg}}{1 \text{ kg}} \times 11,11 \text{ kg queso} = 164,98 \text{ mg Norbixina} \dots\dots\dots (5)$$

3. Calcular cantidad de norbixina en mg de acuerdo a la concentración comercial de nisina a ser incorporada en la leche.

$$\frac{1000 \text{ mL}}{40000 \text{ mg}} \times 164,98 \text{ mg} = 4,12 \text{ mL de Norbixina} \dots\dots\dots (6)$$

iv. Conclusión

La cantidad de norbixina en producto final es de 11,88 ppm adicionando 3,3 mL/100 kg leche de norbixina al 4 % y de 9,5 ppm de norbixina considerando una retención del 80 %. Si se desea considerar la pérdida del 20 % de norbixina en el suero se debe medir un volumen de 4,12 mL de norbixina al 4 %.

Peróxido de benzoílo

El peróxido de benzoílo es usado como agente blanqueador (remoción del color) y de esta forma resaltar el color blanco de la leche, que viene sobre todo del ordeño de vacas en la fabricación de quesos (Chandan y Kapoor, 2011). En muchas ocasiones, dependiendo de la dieta del ganado, la raza y estación del año, la leche viene con un color amarillo debido a la presencia de los carotenoides en forma de β -caroteno que entran a la leche a través del consumo de forraje por parte del ganado vacuno. Esto se debe a la incompleta conversión de este componente en vitamina A que es incolora, a nivel de las glándulas mamarias, resultando en un color amarillo en la leche. Esto no ocurre en la leche de cabra, oveja ni en búfala, ya que todo el β -caroteno se convierte en vitamina A (Smith, 2014).

Composición química. La estructura química de peróxido de benzoílo ($C_4H_{10}O_4$) consiste en 2 grupos benzoílo enlazados a un grupo peróxido (Figura 4). El producto comercial contiene entre 15 a 35 % de peróxido de benzoílo y puede venir cocrystalizado o con un agente acarreador que facilite su disolución, y que puede ser sulfato de calcio, carbonato de magnesio, almidón, fosfato de calcio y suero deshidratado (Smith, 2014).

Modo de acción. El peróxido de benzoílo actúa como un agente oxidante, dentro de los dobles enlaces de la molécula de β -caroteno (Figura 5), por lo que la capacidad de absorber y reflejar la luz en el espectro de longitud de ondas del visible se ve modificada, resultando en una molécula incolora (Smith, 2014).

Aplicación y dosis de incorporación. La tasa de incorporación de peróxido de benzoílo para decolorar la leche a ser empleada en la fabricación de quesos suizos, Emmental, Cheddar, Parmesano, Provolone, Azul y Romano es de no más de 0,002 % (2 g Peróxido de benzoílo/100

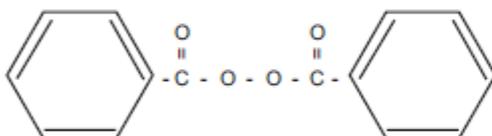


Figura 4. Estructura química del peróxido de benzoílo. Fuente: Smith (2014).

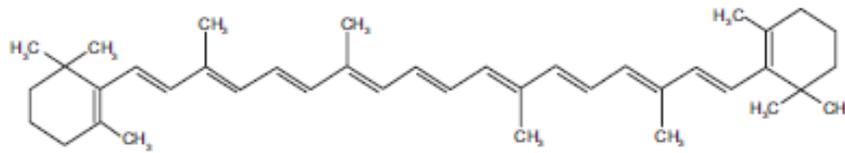


Figura 5. Estructura química del b-caroteno y sus dobles enlaces. Fuente: Smith (2014).

kg de leche) (CFR, 1986). Para que sea efectiva su actividad decolorante, la temperatura de la leche debe estar a 60 °C por un tiempo de exposición de 15 minutos a pH entre 6 a 7 (Smith, 2014).

Ejemplo de aplicación. Se desea fabricar 100 galones (378,5 litros) de leche para la obtención de queso Mozzarella. El porcentaje de incorporación a la leche es de 2 g de peróxido de benzoílo (PB)/100 kg de leche). Densidad de la leche 1,032 kg/L leche. Calcular la cantidad de Peróxido de benzoílo a ser incorporado en la leche.

i. Data

- Cantidad de leche: 378,5 litros
- Densidad de la leche: 1,032 kg/L
- Cantidad de peróxido de benzoílo: 2 g/100 kg de leche.
- Peróxido de benzoílo: X

ii. Calculo

1. Calcule cantidad de leche en kg:

$$1,032 \text{ kg leche/L} \times 378,5 \text{ L de leche} = \mathbf{390,61 \text{ kg leche}}$$

2. Calcule la cantidad de peróxido de benzoílo a ser incorporado:

$$\frac{2 \text{ g PB}}{100 \text{ kg leche}} = \frac{X}{390,61 \text{ kgL leche}} = 7,81 \text{ g de PB} \dots\dots\dots (7)$$

iii. Modo de preparación

Pesar 7,81 gramos de PB e incorpore 100 mL de agua destilada. Mezcle y esperar que disuelva el PB. Incorpore el PB a los 10 minutos de iniciar el enfriamiento de la leche una vez que retorne de la pasteurización batch a 63 °C.

iv. Conclusión

La incorporación de 7,81 g de PB a la leche permitirá mantener el color blanco en el queso Mozzarella.

ADITIVOS QUE COADYUDAN A LA MADURACION DE LOS QUESOS

La maduración de los quesos es un proceso lento y costoso y no es completamente controlado. El tiempo de maduración comúnmente varía entre 4 semanas y 28 meses dependiendo de la variedad de los quesos. Sin embargo, en quesería se cuenta con un método para reducir el tiempo de maduración y desarrollar el flavor de los quesos madurados. Entre los métodos empleados para acelerar la maduración están: i) uso de elevadas temperaturas, ii) adición de enzimas exógenas (tales como esterases pregástrica, y aminopeptidasas), iii) sobrenadante, iv) células bacterianas modificadas física/químicamente, iv) starters modificados genéticamente y v) uso de cultivos adjuntos (Roginski *et al.*, 2003).

Para reforzar la actividad de las bacterias ácido lácticas secundarias en el proceso de maduración de los quesos a nivel de cava, uno de los métodos más confiables y reproducibles para acelerar la glucólisis, lipólisis y proteólisis está es la adición de enzimas tales como la beta-galactosidasas, lipasas, proteinasas y peptidasas (Hayashi, 1996).

Lipasas

Las fuentes de lipasa tradicional empleadas para realzar el sabor de los quesos provienen del tejido pancreático de bovinos y porcinos, las esterases pregástrica, provienen del tejido pre gástrico de jóvenes rumiantes (mamíferos lactante de ternero, cabrito y ovejas) y lipasas procedentes de cultivos microbianos iniciadores o no iniciadores. Las esterases pregástrica, tienen un alto valor específico hacia los ácidos grasos de cadena corta esterificados en la posición 3 y que son los responsables del sabor picante y característico en quesos italianos, (Anón, 2008).

Las esterases actúan sobre sustratos solubles, mientras que las lipasas requieren sustratos insolubles. Las esterases pregástrica son conocidas como lipasas pre-lingual, ya que son extraídas de las glándulas que se encuentran en la base de la lengua de cabritos, corderos y becerros (Kilara y Chandan, 2011), estas enzimas liberan los ácidos grasos de cadena corta y media se utilizan como un medio natural para enriquecer el sabor y aroma de los quesos, reduciendo el tiempo y costo de maduración.

Características generales. Las lipasas y esterases son añadidas a la leche para acelerar la maduración de los quesos italianos de pasta dura como el Parmesano, Provolone, Pecorino y Romano así como en quesos de vena azul de pasta blanda en donde la lipólisis juega un papel importante en el desarrollo del aroma y sabor atribuido de manera directa a los ácidos grasos de cadena corta (C4:0-C8:0), y media (C10:0-C14:0) producto de la hidrólisis de los triglicéridos de la grasa por actividad de las lipasas y esterases, o bien indirectamente como precursores de otras sustancias responsables del aroma como la metil-cetonas, alcoholes, lactonas y esterres (McSweeney y Sousa, 2000; Aravidan *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos de los triglicéridos pueden ser esterificados en todas las posiciones (sn-1, sn-2, sn-3), la posición de los ácidos grasos no es aleatoria y su posición determina de qué triglicérido se trata. Los ácidos grasos de cadena corta como el butírico (C4:0) y el ácido caproico (C6:0) predominan en la posición sn-1 y sn-3, respectivamente, y en la posición sn-2 predomina los ácidos grasos de cadena corta como el ácido palmítico (C16:0) (Balcao y Malcata, 1998).

Tipos de lipasa. Cada lipasa pregástrica origina su propio perfil de sabor, por lo que es posible categorizar a cada una de ellas en función a su origen (Clerici-Sacco Group, 2000):

Lipasas y esterases de becerrito. Proporcionan un delicado pero muy perceptible sabor a mantequilla, ligeramente picante. En la mayoría de las veces son combinadas con lipasas provenientes de otras fuentes en la fabricación de quesos italianos en general.

Lipasas y esterases de corderito. Son empleadas en la fabricación de queso italiano Pecorino Romano con un sabor picante muy pronunciado y notable en el paladar con un efecto duradero y medianamente saborizado. Proporciona un fuerte sabor a queso Pecorino.

Lipasas y esterases de cabrito. Son usadas en la fabricación de quesos italiano Provolone resultando en un sabor picante fuerte y definido, perdurable y muy notable aroma a leche de cabra.

Esterases de microorganismos. Los ácidos grasos liberados por las lipasas pregástrica de animales son muy diferentes a las microbianas, ya que esta última libera ácidos grasos de cadena larga (Kanizawa *et al.*, 1982). Según Kilara y Chandan (2011), las esterases de *Mucor miehei* son usadas para desarrollar el *flavor* en queso Romano y Fontina. Los autores señalaron que la inclusión de esterasa de hongos (en igual actividad base) resultan en un buen flavor en queso Fontina, pero se requiere 5 veces más esterases de hongo para desarrollar el mismo *flavor* que las esterases provenientes de corderito.

Mase *et al.* (2013), realizaron ensayos en las lipasas obtenidas de la levadura *Cryptococcus flavescens* en la elaboración de queso Mozzarella. Los resultados indicaron que los ácidos grasos liberados fueron de cadena corta, produciendo quesos con un favorable flavor, lo cual demuestra que esta lipasa tiene potencial para reemplazar las esterases pregástrica en la industria láctea.

Aplicación y dosis de incorporación. La adición de la enzima lipasa se realiza junto con la incorporación de los cultivos lácticos. Las cantidades a ser incorporadas va a depender de del tipo de lipasa y la intensidad del sabor (Cuadro 1). En este sentido Clerici-Sacco Group (2020), propone la siguiente dosificación:

Cuadro 1. Proporción de lipasa (g lipasa/100 litros de leche) a ser incorporada a la leche según la intensidad del sabor.

Tipos	Intensidad		
	Suave	Media	Fuerte
Becerro	5	10	15
Corderito	5/7	15	20
Cabrito	5	10	20

Las cantidades a emplear deben ser previamente disuelta en agua destilada o leche en la siguiente proporción: por cada gramo de lipasa se diluye en 20 mL.

La limitante de incorporación va a depender del tipo de queso y la intensidad de sabor que desee el fabricante en el queso. Un exceso de lipasa conduce a un excesivo olor y sabor a butírico y rancidez.

Ejemplo de aplicación. Se desea fabricar 100 galones (378,5 litros) de leche para la obtención de queso Pecorino. La intensidad del sabor picante está en función a fuerte (20 g Lipasa/100 Litros). Calcular la cantidad de lipasa de corderito a ser incorporado en la leche.

i. Data

- Cantidad de leche: 378,5 litros
- Cantidad de lipasa: 20 g/100 L de leche
- Lipasa a incorporar: X

ii. Calculo

3. Calcule cantidad de lipasa

$$\frac{20 \text{ lipasa}}{100 \text{ L leche}} = \frac{X}{378,5 \text{ L leche}} = 75,7 \text{ g de lipasa} \dots\dots\dots (8)$$

iii. Modo de preparación

Pesar 75,7 gramos de lipasa e incorpore 500 mL de solución de sal al 1%. Mezcle y esperar que disuelva la lipasa. Incorpore la lipasa en el momento de incorporar las BAL en la fase de premaduración de la leche.

iv. Conclusión

La incorporación de 75,7 g de lipasa a la leche (378,5 L) permitirá en un tiempo entre 2 a 4 meses desarrollar el sabor picante característico del queso Pecorino con la lipasa de corderito.

Proteasas

El uso de enzimas exógenas se centra en el interés de acelerar la maduración en diferentes tipos de queso. Así se tiene que las preparaciones de proteasas comerciales son usadas para acelerar la maduración en el queso Cheddar y en el Holandés (Wilkinson y Kilcawley, 2005).

Características generales. La posibilidad de acelerar la maduración a través del use de proteinasas exógenas (no renina), es un área de estudio que aún está en desarrollo. La adición de algunas enzimas proteolíticas, puede acelerar el proceso de maduración. Sin embargo, la adición de proteinasas resulta en un sabor amargo debido a la liberación de péptidos por la acción de enzimas proteolíticas (Law y Wigmore, 1982).

La importante característica de las proteinasas no es el óptimo de pH, sino la especificidad hacia los residuos de aminoácidos en la caseína, particularmente para minimizar la liberación de aminoácidos que produce el amargor como los aminoácidos aromáticos e hidrófobos. Así se tiene que la adición de aspártico proteinasas y metaloproteínas, resulta en un fuerte amargor (Law, 1984).

Tipos de proteasas. La proteólisis es un proceso bioquímico principal de algunas variedades como el Cheddar, Gouda, y quesos tipo Italianos. La mayoría de las peptidasas usadas son aminopeptidasas y carboxipeptidasas (Kilcawley *et al.*, 2002).

Aminopeptidasas. Son exopeptidasas que catalizan la hidrólisis de residuos de aminoácidos a partir del N-terminal de péptidos o sustratos proteicos hasta degradar por completo los productos de la proteólisis en aminoácidos. La leucina aminopeptidasa (EC. 3.4.11.1) fue preferiblemente usado para liberar la leucina (Kilcawley *et al.*, 2002). Las aminopeptidasas han sido usadas para acelerar los procesos de maduración de queso Cacciota italiano y Cheddar (Raksakulthai *et al.*, 2002).

Hayashi *et al.* (1990), confirmaron el empleo de aminopeptidasa purificada a partir de *Brevibacterium linens*, y el efecto sinérgico de proteasas y peptidasas en la aceleración de la maduración del queso Cheddar. El análisis sensorial de la intensidad del flavor sugiere que el periodo de maduración se redujo de 6 a 2 meses con la adición de Neubase (8,58 U/kg cuajada) y con aminopeptidasa (6,88 U/kg cuajada).

Carboxipeptidasa. Son enzimas que liberan aminoácidos a partir del C-terminal de los péptidos (Kilcawley *et al.*, 2002). Es obtenido a partir del *Aspergillus ninger*, lo cual es producido por fermentación en sustrato sólido. El uso de carboxipeptidasa puede ofrecer una interesante alternativa para favorecer la formación de aminoácidos lisina, glutamina, leucina (hidrófobo) y valina (hidrófobo) en alta proporción, y por lo tanto el desarrollo acelerado del flavor en queso Regianito (Ceruti *et al.*, 2016).

Aplicación y dosis. Hay cuatro maneras de adicionar las enzimas exógenas en la fabricación de los quesos: con la leche antes de la fabricación de los quesos, con los cultivos iniciadores o con el agente coagulante, en el salado o directo a los quesos (Wilkinson y Kilcawley, 2005).

La adición de las enzimas a la leche parece ser la mejor etapa para la incorporación debido a que asegura una distribución homogénea de la enzima en la leche y su subsecuente transferencia a la cuajada, sin embargo la mayoría de las enzimas adicionadas a la leche se pierden en el suero (60-90 %) y las enzimas proteolíticas degradan la caseína a péptidos que se pierden en el suero, lo cual resulta en la reducción del rendimiento en queso (Upadhyay y McSweeney, 2003).

Preparaciones de proteasas comerciales que contienen actividad carboxipeptidasa útiles para acelerar la maduración del queso son conocidas. Ceruti *et al.*, (2016), empleó proporciones de 5, 10 y 20 g carboxipeptidasa/100 L leche, de la marca Accelerzyme CPG de la compañía DSM, incorporados en la leche con los cultivos iniciadores, para la elaboración de queso Regianito.

Las proteasas, también pueden ser incorporadas a la cuajada molida durante la fabricación a concentraciones de 0,001, 0,005, 0,001, 0,025, 0,05 y 0,1 %. La incorporación de 0,1% redujo el periodo de maduración de 6 meses a 2 meses. Sin embargo, los quesos al llegar al primer mes de maduración, fueron inaceptables por el oficial calificador ya que resultaron ser muy amargos (Fetrick *et al.*, 1986).

El hecho de que las enzimas exógenas son efectivas en acelerar la maduración no ha conducido a su amplio uso, posiblemente debido a su alto costo, dificultades en distribuirlos uniformemente en la cuajada y el posible daño en la sobremaduración de los quesos (Mehar-Aroz *et al.*, 2015).

Ejemplo de aplicación. Se desea fabricar 100 galones (378,5 litros) de leche para la obtención de queso Cheddar. Se desea acelerar la proteólisis en la fase de maduración del Cheddar incorporando la concentración de 20 g de Carboxipeptidasa por cada 100 litros de leche. Calcular la cantidad de la enzima a ser incorporado en la leche.

i. Data

- Cantidad de leche: 378,5 litros
- Cantidad de carboxipeptidasa: 20 g/100 L de leche.
- Lipasa a incorporar: X

ii. Calculo

4. Calcule cantidad de lipasa.

$$\frac{20 \text{ proteasa}}{100 \text{ L leche}} = \frac{X}{378,5 \text{ L leche}} = 75,7 \text{ g de proteasa} \dots\dots\dots (9)$$

iii. Modo de preparación

Pesar 75,7 gramos de proteasa e incorpore a 500 mL de una solución de sal al 1%. Mezcle y esperar que disuelva la enzima. Añada la carboxipeptidasa con los cultivos iniciadores en la fase de premaduración de la leche.

iv. Conclusión

La incorporación de 75,7 g de carboxipeptidasa a la leche (37,5 L) permitirá reducir la maduración del Cheddar con respecto al tiempo de maduración regular (< 6 meses).

ADITIVO QUE COADYUDAN A LA COAGULACIÓN EN LOS QUESOS (CaCl₂)

El cloruro de calcio se utiliza en la elaboración de quesos como coadyudante tecnológico, para favorecer la coagulación de la leche en el proceso de elaboración de quesos a partir de leche pasteurizada (FENIL, 2017). Al pasteurizar la leche, parte del calcio soluble reacciona con los carbonatos, fosfatos y citratos, reduciendo su concentración. La falta de calcio impide la formación de un gel mecánicamente resistente en la fase de coagulación.

Composición química. El cloruro de calcio (CaCl₂), es una sal de calcio anhidra o dihidratada (CaCl₂·2H₂O) (CFR 1996), que puede venir en forma sólida ya sea en pellet o en polvo de color blanquecino o en una solución concentrada de la sal al 32% (8 M).

Modo de acción. Las sales minerales presentes en la leche como el calcio, fosfato, magnesio, no se encuentran exclusivamente bajo la forma de sales solubles, otra parte importante se encuentra en forma insoluble en fase coloidal formando enlaces en lo que se denomina fosfato cálcico coloidal (FCC). El FCC actúa probablemente como agente cementante, manteniendo las sub-micelas de caseína juntas para formar la micela de caseína (Judkins, 1984; Alais, 1994).

Holt (1992), describe la micela de caseína como un entramado flexible de caseína aproximadamente esférico fuertemente hidratado y mineralizado formando una estructura tipo gel (Figura 6). Las cadenas polipeptídicas en el núcleo están parcialmente entrecruzadas formando una estructura gelatinosa con nanogránulos de fosfato cálcico coloidal, donde el extremo C-terminal de la K-caseína se extendería hacia el exterior de la superficie micelar contribuyendo a la formación de la capa pilosa que le confiere estabilidad estérica y los nanogránulos constituirían el centro de crecimiento de la micela (Qi, 2007).

Al pasteurizar, el calcio soluble (cationes) reacciona con los fosfatos, citratos y carbonatos presentes en la leche (aniones) y precipita en forma de citratos y carbonatos de calcio y magnesio, por lo que el equilibrio se desplaza hacia la formación del calcio soluble. Para mantener el equilibrio calcio coloidal: calcio soluble en 70:30, es necesario que parte del calcio coloidal (FCC), que actual como cemento pase a soluble, reduciendo de esta manera su concentración y de esta forma el número de nanogránulos en la micela, reduciendo así el tamaño de la micela (Lucey y Fox, 1993; Holt, 1998; Broyard y Gaucheron, 2015).

El poder coagulante está en función de la concentración del calcio insoluble o coloidal y por ende del tamaño de la micela de caseína. A mayor concentración de calcio coloidal, mayor es el tamaño de la micela y, mayor es el poder de coagulación de la leche, es por esta razón que el quesero debe incorporar el calcio en forma de cloruro (CaCl_2) a la leche pasteurizada.

Aplicación y dosis de incorporación. La norma venezolana COVENIN 3821 (2003), establece hasta un máximo de 20 g CaCl_2 /100 litros de leche pasteurizada (equivalente a 1,8 mM Ca). Lucey y Fox (1993), recomiendan hasta un valor máximo de 40 g Ca/100 litros que equivalen 10 mM Ca o en su forma de cloruro de calcio (CaCl_2) un peso de 27,5 g CaCl_2 /100 L leche. El calcio comercial no es puro, viene en forma de cloruro de calcio grado alimenticio. Si el cloruro de calcio viene en forma de sólidos, se pesan las cantidades requeridas y se diluyen en 10 veces su peso en agua destilada. Se agita continuamente hasta que el sólido se disuelva en una solución cristalizada. Se espera una reacción exotérmica con una pequeña liberación de

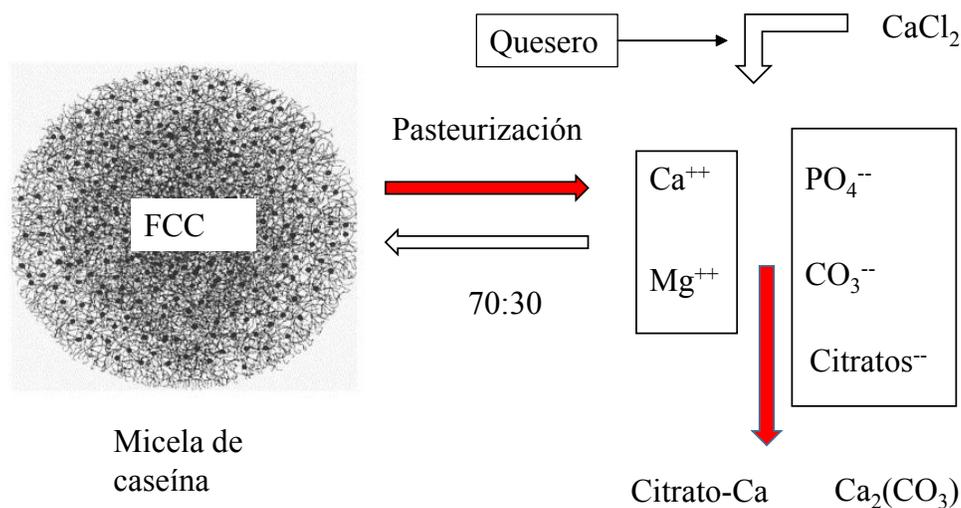


Figura 6. Modelo de caseína de Holt (1992) y equilibrio dinámico del calcio coloidal en forma de FCC y calcio soluble. Fuente: Smith (2014).

calor. Si el producto comercial bien en forma líquida, se calcula las cantidades en gramos en función a la cantidad de leche a coagular, y luego con el peso requerido en gramos de calcio y la concentración de la solución comercial de cloruro de calcio, se determina el volumen a tomar de la solución comercial. No se recomiendan valores superiores a 10 mM Ca, ya que le puede conferir un sabor astringente al producto final.

Ejemplo de aplicación. Se desea fabricar 100 galones (378,5 litros) de leche para la obtención de queso Gouda. La cantidad de cloruro de calcio es de 15 g CaCl₂/100 Litros). Calcular la cantidad de calcio en forma de cloruro de calcio a ser incorporado en la leche.

i. Data

- Cantidad de leche: 378,5 litros
- Proporción de CaCl₂: 15 g/100 L de leche.
- CaCl₂ a incorporar: X

ii. Calculo

1. Calcule cantidad de lipasa.

$$\frac{15 \text{ g CaCl}_2}{100 \text{ L leche}} = \frac{X}{378,5 \text{ L leche}} = 56,77 \text{ g de CaCl}_2 \dots\dots\dots (10)$$

iii. Modo de preparación

Pesar 56,77 gramos de CaCl₂ y se diluye en 500 mL de agua destilada. Mezcle y esperar que disuelva el cloruro, o la solución se torne de un color cristalino. Es posible esperar una reacción exotérmica. Incorpore el cloruro de calcio justo antes de incorporar el cuajo.

iv. Conclusión

La incorporación de 56,77 g de cloruro de calcio a la leche (378,5 L) permite restituir el tamaño de la micela de caseína y mantener en una proporción de 15 g CaCl₂/100 L leche, lo cual incrementa el poder coagulante en la leche y la formación de un gel de mecánicamente resistente.

ADITIVOS QUE INDUCEN A LA COAGULACIÓN EN LOS QUESOS (Cuajo)

En el proceso de elaboración de quesos, existen tres etapas fundamentales como son la coagulación, sinéresis y maduración. La coagulación de la leche se realiza por la acción específica de un agente coagulante (enzima) sobre la caseína de la leche y se denomina cuajo, cuyo nombre comercial es la renina (*rennet*). El cuajo se obtiene de manera tradicional, a partir de cuarto estomago de terneros lactantes entre 10 y 30 días de nacidos. La renina o cuajo, puede obtenerse de otras fuentes de origen animal (cordero, cabra, búfalo y cerdo), vegetal y microbianos.

Cuajo de origen animal. Quimosina

El cuajo que proviene del cuarto estómago de terneros, presenta dos enzimas proteolíticas, la quimosina que está en mayor proporción (88-94% de la actividad coagulante sobre la leche) y la pepsina bovina (9 a 12% de la actividad coagulante) (Ruiz-Rojas, 2005). Las preparaciones comerciales de renina comúnmente están constituida por 50% de quimosina de ternero y 50 % de pepsina bovina (Chandan y Kapoor, 2011).

La principal función de la quimosina es hidrolizar el enlace específico Phe₁₀₅-Meth₁₀₆ de la K-caseína de la leche. La hidrólisis conduce a la desestabilización de la micela ocasionando a la separación de las caseínas sensibles al calcio, lo cual se agrupan formando una estructura en forma de gel (coágulo), que luego dará la formación de una cuajada y posteriormente el queso (Fox *et al.*, 2000).

La quimosina proveniente del ternero se caracteriza porque garantiza altos rendimientos en quesería, es decir alta capacidad coagulante (capaz de hidrolizar el enlace específico 105-106 de la K-caseína), baja capacidad proteolítica y baja termoestabilidad lo que conduce a la obtención de quesos con características sensoriales aceptables (Morillo-Piña *et al.*, 2014).

Fuerza del cuajo. Representa el número de volúmenes de leche cruda y fresca procedente de la mezcla, coagulada por un volumen de cuajo en 40 minutos a 35 °C (Alais, 1985). El mismo autor señala que, la fuerza de los cuajos líquidos comerciales varía entre 2000 a 5000 que equivalen entre 20 y 50 mL por cada 100 Litros de leche, respectivamente. Los cuajos en polvo comerciales vienen con una fuerza entre 100.000 y 150.000 (y representan entre 1 a 0,7 g por cada 100 litros de leche, respectivamente).

Por su parte, Ártica (2014) define la fuerza del cuajo como el número de partes de leche que son coaguladas por una parte del cuajo a 35 °C en 40 minutos y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$F_c = \frac{\text{N}^\circ \text{ Dilución} \times 2400}{\text{segundos}} \dots\dots\dots (11)$$

Por ejemplo, 1 gramo de cuajo en polvo fue diluido en 500 mL de agua destilada y de esta dilución se ha tomado 2 mL para coagular un volumen total de 100 mL de leche. Se tardó un tiempo de coagulación de 10 minutos (600 segundos).

Como obtener el número total de diluciones: la primera dilución fue 1 gramo en 500 mL, por lo que se diluyó la concentración del cuajo 500 veces su peso. Luego se tomaron 2 en 100 mL, (100/2), significa que la concentración del cuajo se volvió a diluir en 50 veces su concentración original. Total dilución: 500 x 50 = 25000.

Aplicando la fórmula de la ecuación, tenemos:

$$F_c = \frac{25000n \times 2400}{600} = 100000 \dots\dots\dots (12)$$

FC = 1:100000, significa que 1 kg de cuajo es capaz de coagular 100 mil litros de leche (1 g/ 100 L de leche).

Osorio *et al.* (2008), define la fuerza del cuajo como la cantidad de leche coagulada en mL por la concentración diluida en gramos del cuajo en 40 minutos a 37 °C, y se calcula con la siguiente ecuación:

$$F_c = \frac{V \times 2400}{c(\text{g/mL}) \times t(\text{seg})} \dots\dots\dots (13)$$

Donde V, es el volumen de leche (mL) a 35 °C, “c” es la concentración diluida del cuajo o sobrenadante (g/mL) y “t” es el tiempo de coagulación. Así que para el ejemplo anterior, V= 100 mL; c=0,004 g [(2 mL x 1 g)/ 500 mL] y t=600 seg. Con estos datos podemos aplicar la ecuación 13:

$$F_c = \frac{(100 \times 2400)}{(0,004 \times 600)} = 100000 \dots\dots\dots (14)$$

Fc=100000; que es 1:100000, es decir 1 kg de cuajo es capaz de coagular 100 mil litros de leche.

Cuajo de origen vegetal

El interés por los coagulantes vegetales está creciendo, debido a que el uso de los coagulantes de origen animal puede estar limitado por su alto precio, por razones religiosa (Judaísmo, Islam), la dieta (vegetariano) o consumidores que rechazan los alimentos genéticamente modificados (Alemanes, Franceses Holandeses) (Egito *et al.*, 2007).

La renina derivada de las plantas se ha empleado, de hecho tradicionalmente durante muchos años en la elaboración de quesos. Las enzimas son extraídas de las flores de 2 especies de cynara: *Cynara cardunculus* y *Cynara humilus*, comúnmente conocida como cardo y alcachofa, son usadas en la region del mediterráneo para la elaboración de quesos, especialmente en España y Portugal (Kinsted, 2014). Los cuajos provenientes de la especie cynara tienen alta especificidad hacia la caseína caprina y ovina, limitando su uso a aquellos quesos como el Serra de Estrela (Portugal) y Manchego (España) (Jacob *et al.*, 2011).

El uso de este tipo de enzimas no son efectivas para cuajar leche de vaca porque presenta un ratio de actividad coagulante/proteolítica muy bajo, lo que resulta en péptidos amargos en quesos madurados, defectos de textura y flavor causados por la alta actividad proteolítica de sus enzimas (Roseiro, 2003), o una actividad coagulante muy baja que da lugar a bajos rendimientos queseros. Además los extractos de planta contienen un coctel de enzimas, cuya actividad es difícil de controlar (Sousa *et al.*, 2001).

En el oeste de África, *Calontropis procera* es usada como fuente de cuajo, y numerosas otras plantas que han contribuido como prácticas tradicionales, tales como la savia del árbol de higo (*Ficus carica*).

Cuajo de origen microbiano

La obtención de renina a partir del cuarto estomago del ternero implica sacrificio del ternero lactante y por ende una disminución del pie de cría bovino. En este sentido, han surgido otros tipos de agentes coagulantes de leche utilizados como sustituto del cuajo animal, además de los de origen vegetal, están aquellos provenientes de microorganismos (Osorio, *et al.*, 2008).

Varios tipos de mohos han sido evaluados como microorganismos empleados para la producción de proteasas para la coagulación de la leche, como el *Aspergillus versicolor* (Abdel-Fatteh y Saleh, 1988), *Rhizopus orizae* (Sathya *et al.*, 2009), entre otros. Las especies de bacteria del género *Bacillus* también ha sido objeto de estudio (Wu *et al.*, 2013).

Los principales microorganismos que producen proteasas para la coagulación de la leche son de origen fúngico: *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* y *endothia parasítica*, siendo las proteasas del *Mucor miehei* la preferida como sustituto del cuajo ternero por su alta especificidad y su alta relación coagulante/proteolítica, lo cual hace que el queso presente las mismas propiedades organoléptica (Osorio *et al.*, 2008).

También la quimosina puede ser obtenida por la tecnología de organismos genéticamente modificados, llamada quimosina recombinante o sintética, en donde el material genético de la quimosina puede ser extraído del abomaso (Chandan y Kapoor, 2011), o de algún hongo (Mistry, 2012) como el *Mucor miehei*, y es transferido a algún microorganismo hospedero, tal como *Escherichia coli* K-12 (Chymax; Chr Hansen); o *Kluveromices lactis* (Gist-Brocade; Paises bajos), *Aspergillus ninger* (Chymogen; Chr Hansen, Dinamarca; y Chymostar; Danisco); *Aspergillus oryzae* (Novo Nordis A/S; Dinamarca) (Morillo-Piña *et al.*, 2014).

Entre las ventajas del uso de la quimosina recombinante están: 1.- son el producto de la tecnología de la fermentación, haciendo de estas económicamente confiables y aceptables para la mayoría de los consumidores vegetarianos, judíos, islámicos e hindúes, 2.- es reproducible la calidad de los quesos, tan comparable su acción como el de la renina de ternero, 3.- posee mayor resistencia al calor, 4.- balance confiable entre la actividad coagulante y la actividad proteolítica (Chandan y Kapoor, 2011).

Ejemplo de aplicación. Se desea fabricar 100 galones (378,5 litros) de leche para la obtención de queso Jack pepper. Se emplea cuajo líquido con una fuerza del cuajo de 1:10000. Calcular la cantidad de cuajo de corderito a ser incorporado en la leche.

i. Data

- Cantidad de leche: 378,5 litros
- Fuerza del cuajo: 1:10000.
- Cuajo a incorporar: X

ii. Calculo

5. Calcule cantidad de lipasa

iii. Modo de preparación

Medir un volumen de 37,85 mL de cuajo en 500 mL de solución de sal al 1%. Mezcle e incorpore el cuajo a la leche una vez que se haya incorporado los cultivos iniciadores, la lipasa y el cloruro de calcio

$$\frac{1 \text{ L de cuajo}}{100000 \text{ L leche}} = \frac{X}{378,5 \text{ L leche}} = 0,03785 \text{ L de cuajo} = 37,85 \text{ mL de cuajo líquido a medir(15)}$$

iv. Conclusión

La incorporación de 75,7 g de lipasa a la leche (378,5 L), permitirá en un tiempo entre 2 a 4 meses desarrollar el sabor picante característico del queso Pecorino con la lipasa de corderito.

ADITIVOS QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMO EN LOS QUESOS

Los preservativos o agentes antimicrobianos, son usados para extender la vida útil de los alimentos protegiéndolos en contra del crecimiento microorganismo patógenos o los que ocasionan deterioros (Silva y Cébola, 2016). Entre los preservativos que se usan comúnmente, el cloruro de sodio (sal común) es el más viejo de todos. La nisina (E234) y Natamicina (E235) son bacteriocinas usadas para inhibir el crecimiento de bacterias, así como de hongos y levaduras, respectivamente.

Nisina

La nisina es un agente natural antimicrobiano empleado en alimentos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivo producido. Es producido por fermentación de la lactosa por una bacteria ácido láctica llamada *Lactococcus lactis* subesp. *lactic* (Han, 2005).

Estructura química. La nisina consiste de 34 residuos de aminoácidos (Figura 7), de naturaleza catiónica, con presencia de aminoácidos inusuales como: dos deshidroalanina (DHA) y un deshidrobutirina (DHB), posee un grupo amino y un carboxilo al final de la cadena y cinco bandas tioésteres que forman anillos internos (una lantionina (de la que deriva el nombre del grupo) y 4 β-metil lantionina) (Delves-Broughton, 1990).

Propiedades antimicrobianas. La nisina es una bacteriocina que representa a un grupo de péptido antimicrobiano de 34 aminoácidos producido en forma natural por la bacteria *Lactococcus lactis* spp. y se emplea como aditivo aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para destruir las bacterias Gram positivos (*Staphylococcus aureus*) y, en la etapa pre emergente, a esporas Gram positivo (*Clostridium botulino*) siendo posible ampliar su espectro de actividad a los microorganismos Gram negativos (*Escherichia coli*, *Salmonella*; *Campylobacter jejuni*) al combinar su acción con agentes quelantes como el EDTA (Cha *et al.*, 2003; Jozala *et al.*, 2005).

Varios estudios han señalado que la nisina inhibe el crecimiento de otras bacterias patógenas Gram + tales como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, y *Listeria monocytogenes* (Sivropoulou *et al.*, 1996; Friedman *et al.*, 2002).

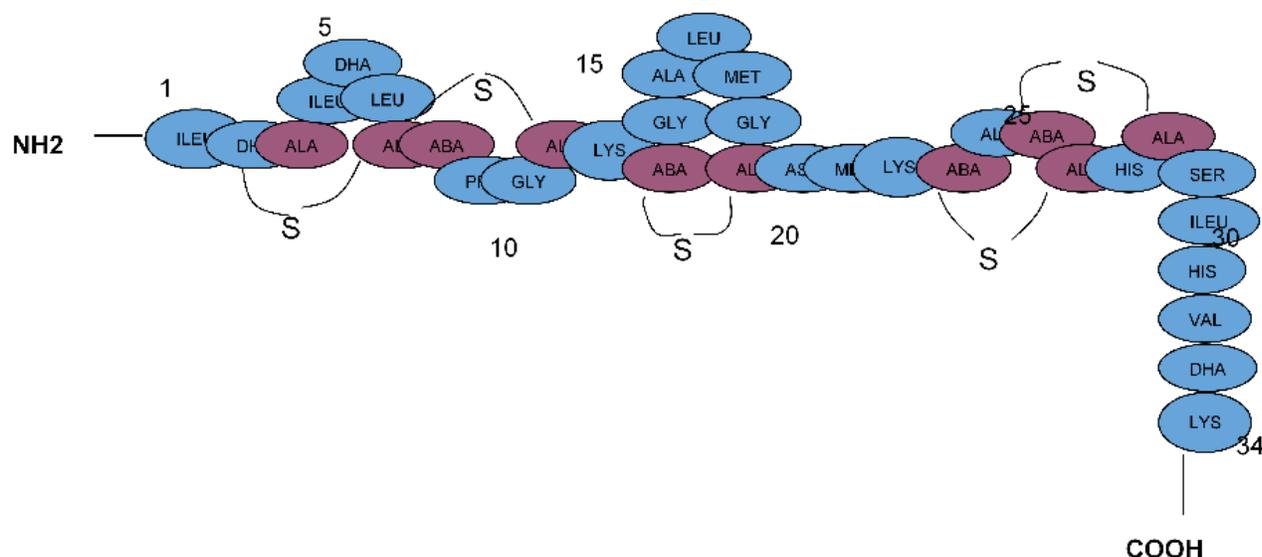


Figura 7. Estructura de la nisina (Cheigh y Pyun, 2005).

Por otra parte, es importante destacar que la nisina se inactiva con las enzimas digestivas del ser humano, posee termoestabilidad a pH ácido, es atóxica por lo que es reconocida como aditivo generalmente seguro (GRAS; siglas en inglés General recognized as safe) aprobado por la FDA (siglas en inglés; Food Drug Administration) por la Organización para la Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) (Delves-Broughton, 1990; Rodríguez, 1996).

Modo de acción. Actúan en la membrana citoplasmática y disipan la fuerza motriz del protón a través de la formación de poros en la bicapa lipídica, los monómeros de la nisina se unen, insertan y oligomerizan en la membrana citoplasmática para formar un poro (Devlieghere *et al.*, 2004).

La formación de poros o canales iónicos consiste en que los monómeros catiónicos de nisina se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostática con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan en la membrana con una reorientación no selectiva que depende del potencial de membrana (Figura 8).

Este potencial podría estar influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros se une a la fracción de carbohidratos de la pared celular del precursor, usándola como anclaje resultando en la formación de un poro en la membrana, hacia adentro de la región de fosfolípido se ubican los residuos hidrofílicos y hacia fuera los hidrófobos, con la consecuente salida de iones y la pérdida de la fuerza protón motriz a la que le sigue la muerte celular (Wiedemann, 2001; Schulz *et al.*, 2003).

Diversas evidencias indican que la acción de la nisina sobre las esporas implica la modificación de los grupos sulfhidrilos de sus membranas, esenciales para la germinación (Morris *et al.*, Citado por Rodríguez, 1996). Las cadenas laterales insaturadas de los deshidroaminoácidos parecen estar implicadas en estas reacciones ya que actúan como aceptores de electrones, y por lo tanto son capaces de reaccionar con los grupos sulfhidrilos libres de la célula diana (Liu y Hansen, 1990).

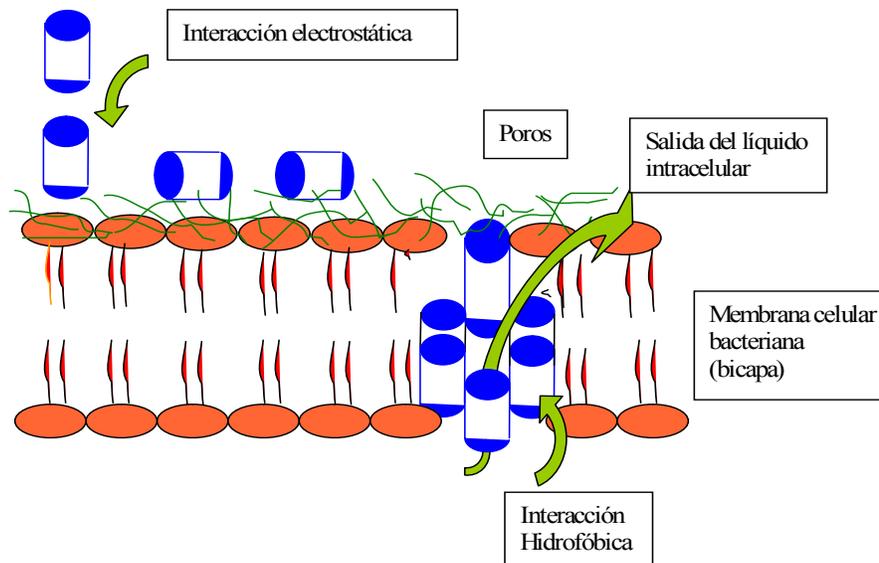


Figura 8. Posible mecanismo de interacción celular de la nisina basados en la formación de poros (Schulz *et al.*, 2003).

Por otra parte investigadores han encontrado que el espectro de la actividad de la nisina frente a los microorganismos, puede ser ampliado a las bacterias Gram negativa incluyendo gran variedad de patógenos. Estas bacterias se pueden sensibilizar cuando su pared celular se debilita, mediante tratamientos subletales como congelación, tratamientos térmicos, pH ácido del medio y tratamientos con agentes quelantes como el EDTA. La alteración de la pared celular permite el contacto de la nisina con la membrana citoplasmática con la consiguiente desestabilización de sus funciones (Gao *et al.*, 1991; Cutter y Siracusa, 1995).

Estabilidad. La molécula de nisina es de naturaleza ácida y exhibe gran estabilidad bajo estas condiciones. Puede permanecer por años en forma deshidratada, es estable en autoclave a 115,6°C a pH 2 y la pérdida de actividad a temperatura de pasteurización es despreciable (Delves–Broughton y Willian 1993).

La nisina es muy estable a pH 2 incluso después de un tratamiento térmico a 115,6 °C, sin embargo a la misma temperatura a pH 5 se pierde un 40% de su actividad, mientras que a pH 6,8 la inactivación alcanza a 90% (Hurst, 1981). A pesar de esto en medios como la leche la inactivación es menor debido a un efecto protector que le confieren los carbohidratos al formar complejos con ellas (Davidson y Hoover, 1993).

Solubilidad. La solubilidad de la nisina depende del pH del medio siendo esta del 12,5% a pH 2,5 mientras que esta se reduce a 4% cuando el pH aumenta a 5 y es insoluble a pH neutro o alcalino (Davidson *et al.*, 1993).

Dosis. La actividad de la nisina se expresa en unidades internacionales (UI) y se basa en la actividad aproximada de 1 mg de nisina pura es el equivalente a 40 UI; y 1g de nisina pura es equivalente a 40x10⁶ UI (Davidson y Hoover, 1993). La norma Venezolana COVENIN-1813, 2000), sugiere un máximo de 12,5 ppm (12,5 mg nisina pura/kg queso) en quesos en general.

Comercialmente la nisina viene con una concentración del 2,5 %, marca comercial Nisaplin, y su equivalencia es: 1×10^6 UI Nisaplin/g Nisaplin. También es posible expresar sobre la misma base 1×10^6 UI es equivalente a 25 mg Nisina pura. En función a lo anterior, 12,5 ppm de nisina pura equivalen a 0,5 g de Nisaplin/kg de queso = 5×10^5 UI/kg queso, o 500 UI/g queso.

Según la bibliografía consultada la incorporación de nisina en queso puede variar según las legislaciones pertinentes de cada país. Así vemos que los rangos oscilan entre 500 UI/g queso para quesos en general, Estados Unidos incorporan 400000 UI/g en algunos quesos procesados (Aplin y Barreto LTD, 1993), hasta cantidades no limitativas en otros países (Delves-Broughton, 1990).

Esto significa que el rango de incorporación de la nisina en los quesos es amplio y va a depender de las Buenas prácticas de fabricación. Actualmente está permitido el uso en varios productos en más de 50 países, incluyendo a Venezuela en donde desde 1996 cuando se aprobó para ser usada en quesos procesados en una concentración de 20000 UI/g (Estrada, 1997).

Modo de aplicación. La nisina en polvo se puede disolver en agua destilada, estéril ajustada al pH de la matriz del queso que se desee incorporar. Por lo general se ajusta entre 4,5 a 5,5 de pH con HCl 0,02 N. También se puede incorporar a la cuajada cocrystalizada con la sal en momento de realizar la etapa de salado directo o disolviéndola en suero acidificado a pH 5,4.

Ejemplo de aplicación. Se tienen 378,5 litros de leche y se desea incorporar a la cuajada, para obtener una concentración final de nisina en los quesos de 500 UI/g queso, que cantidad en gramos de Nisaplin debe pesar para lograr dicha proporción. El rendimiento es 9 Litros leche/kg queso. La nisina viene en su forma comercial con la proporción de: 1×10^6 UI/g Nisaplin

i. Data

- Equivalencia: 500 UI Nisina pura/ kg queso = 5×10^5 UI nisaplin/ kg queso
- Rendimiento 9 litros de leche/ kg queso
- Concentración de nisina comercial: 1×10^6 UI/g Nisaplin
- Cantidad de Nisaplin para 500 UI/g queso: X

ii. Cálculos

1. Calcule la cantidad de cuajo por rendimientos:

$$\frac{9 \text{ Litro leche}}{\text{kg queso}} = \frac{378,5 \text{ L leche}}{X} = 42,05 \text{ kg de queso} \dots\dots\dots(16)$$

2. Total de UI requeridas para los 42,05 kg de queso

$$\frac{5 \times 10^5 \text{ UI}}{\text{kg queso}} \times 42,05 \text{ kg queso} = 21,02 \times 10^6 \text{ UI} \dots\dots\dots(17)$$

3. Total de Nisaplin a incorporar en cuajada:

$$\frac{21,02 \times 10^6 \text{ UI}}{\frac{1 \times 10^6 \text{ UI}}{\text{g}} \text{ Nisaplin}} = 21 \text{ g Nisaplin al } 2,5\% \dots\dots\dots(18)$$

iii. Modo de preparación

Nisaplin se prepara disolviendo en suero acidificado a pH 5,4 o cocrystalizado con la sal y luego se incorpora a los 42 kg de cuajada.

iv. Conclusión

Pesando 21 gramos de Nisaplin al 2,5 % e incorporándolo a la cuajada (42 kg), asumiendo 100 % de retención en la cuajada, se obtiene una concentración de nisina en el queso de 500 UI, que son equivalentes a 25 ppm de nisina.

Natamicina

La natamicina es un agente antimicrobiano natural producido por la bacteria *Streptomyces nateiensis* y es ampliamente usado en alimentos para prevenir el crecimiento de hongos y levaduras en queso y yogurt (Resp *et al.*, 2002).

La organización Mundial de la Salud (OMS), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la FDA, han catalogado a la natamicina como un elemento seguro para el consumo humano (DSM, 2014).

Natamicina es disponible comercialmente bajo los nombres de Natamax (Danisco A/S Corp., Copenhagen, Denmark) y Delvocid (DMS Food Specialties USA, Charlotte, 50 % de natamicina mezclada con lactosa (Siricururata *et al.*, 2013).

Estructura química. La natamicina pertenece al grupo de los antimicóticos polienos macrolidos (anillo de lactonas macrocíclico) (Figura 9). Tiene un peso molecular de 665.7 Dalton y es una molécula anfotérica, siendo su punto isoeléctrico a pH 6,5 (Delves-Broughton, 2012).

Propiedades antimicrobianas. La natamicina tiene un amplio espectro de actividad en contra del crecimiento de hongos deteriorativos productores de micotoxinas así como de levaduras (Stark, 2003), pero no tiene ninguna influencia en el crecimiento de las bacterias (Siricururata *et al.*, 2013).

Modo de acción. La natamicina tiene la capacidad de interactuar con el ergosterol de la membrana celular de los hongos y levaduras y lo inmoviliza para sus funciones a nivel celular. El ergosterol está presente solo en los hongos y la levadura y no en bacterias, por eso su actividad antimicrobiana es en estos tipos de microorganismos. El ergosterol se encuentra a nivel de la capa bilipídica de la membrana celular, y es la responsable del transporte intracelular de nutrientes, así como de la actividad enzimática y formación de proteínas, por lo tanto de manera indirecta, bloquea la germinación de las esporas y posterior crecimiento vía enlace específico al ergosterol, reduciendo de esta forma su expresión, lo que conduce a la muerte celular (Zhang *et al.*, 2010).

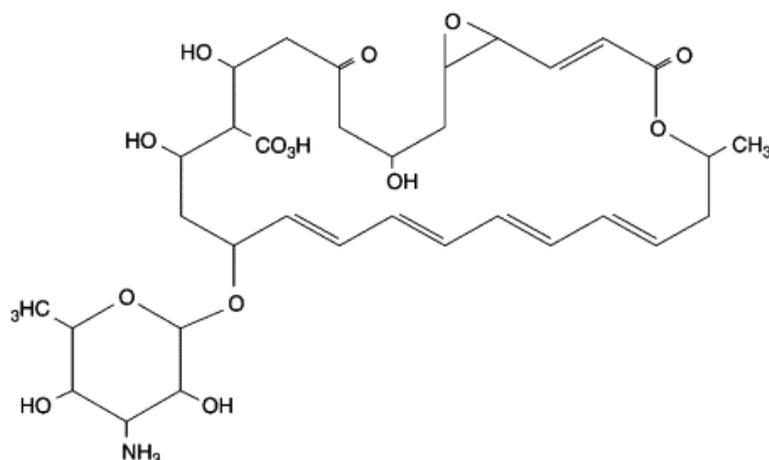


Figura 9. Estructura química de la natamicina Fuente: Delves-Broughton, 2012).

Además, la unión irreversible de la natamicina con el ergosterol, cambia la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de iones y pequeños péptidos, lo que genera lisis celular (Weber, Steeson y Delves-Broughton, 2008).

Estabilidad. La molécula de natamicina es estable en solución líquida a pH entre 4,5 a 9. Es estable a temperatura ambiente si es almacenada en polvo, pero si es almacenada en solución acuosa, es menos estable, particularmente si es expuesta a condiciones de baja acidez, luz, presencia de metales pesados y agentes oxidante (Raab, 1972).

Solubilidad. La natamicina se caracteriza por tener baja solubilidad en agua (40 µg/mL), sin embargo, su baja solubilidad es una ventaja en el tratamiento superficial de los alimentos, en donde es requerido más que la migración hacia el interior del mismo (Delves-Broughton, *et al.*, 2005).

Dosis. La principal aplicación de la natamicina es en tratamiento superficial de los quesos. En los países de la Unión Europea permiten un nivel máximo de 1 mg natamicina/dm² y con una penetración no más de 5 mm. En Estados Unidos fue aprobado en quesos hasta 20 ppm, también en alimentos como el yogurt, queso Cottage, crema ácida (Delves-Broughton *et al.*, 2005).

Puede emplearse en otros productos lácteos como queso rallado: 15-20 ppm (Berry, 1999), Yogurt: 5-10 ppm (Sahan *et al.*, 2004), quesos duros o semiduros tratados por superficie o inmersión: 1250-2000 ppm (Delves-Broughton, 2006).

La FDA (2014), le otorgó la categoría GRAS y puede emplearse en yogurt en una dosis no mayor de 5 ppm en producto final.

El CODEX alimentario establece un máximo de 40 mg/g en quesos análogos, procesados, madurados, frescos y quesos de proteína del suero de la leche (DMS, 2014).

La norma Venezolana COVENIN-1813, (2000), sugiere emplearlo de manera superficial sobre la cubierta de los quesos en un máximo de 2 mg/dm² en queso blanco pasteurizado ausente a la profundidad de 5 mm.

Modo de aplicación. Puede ser aplicada directamente por incorporación en el alimento, siempre y cuando este sea líquido, cuando el alimento es sólido se puede aplicar sobre la superficie del mismo por atomización, inmersión o cepillado (Ture *et al.*, 2011).

Ejemplo de aplicación. La tasa de aplicación de la natamicina (50 %) por atomización en superficie es de 2 mg/dm². Se prepara una solución de natamicina de 1000 ppm y el área de cada queso es de 834,47 cm² (diámetros del queso 12,5 cm; altura 15 cm). Determine el número de quesos a ser cubierto con la solución de natamicina para cumplir con la tasa de aplicación esperada.

i. Data

- Tasa de natamicina en superficie del queso: 2 mg/ dm² = 0,02 mg/cm²
- Proporción de natamicina en solución: 1 000 ppm
- Área del queso 834,47 cm²

ii. Calculo

4. Calcule el área a atomizar usando la solución de natamicina de 1000 ppm.

$$\frac{1\ 000\ \text{mg}\ \text{NataM}}{0,02\ \text{mg}/\ \text{cm}^2} = 50000\ \text{cm}^2 \dots\dots\dots(19)$$

5. Calcule el número de quesos a atomizar para la solución de 1000 ppm.

$$\frac{5\ 0000\ \text{cm}^2}{834,472\ \text{cm}^2/\text{queso}} = 59,9 = 60\ \text{quesos} \dots\dots\dots(20)$$

iii. Modo de preparación

Pesar 2 gramos de natamicina en 1000 mL de agua destilada para que la proporción obtenida sea de 1 000 ppm, para ello, una vez pesada la natamicina se agrega 200 mL de agua destilada. Mezcle la solución anterior en una licuadora por un tiempo de 2 minutos. Luego complete con 800 mL de agua destiladas hasta lograr un volumen de 1000 mL. Mezcle en la licuadora el volumen total por un tiempo de 3 minutos o hasta que la solución se homogenice. Puede homogenizar la mezcla en porciones pequeñas por partes. Todos los utensilios y componentes deben estar previamente esterilizados. Colocar el contenido en una botella con atomizador. Regule la salida del atomizador de tal forma que cubra en dos o tres disparos la superficie de una de las caras del queso.

Es recomendable estandarizar el número de disparos o aplicaciones por queso para que el litro de solución de natamicina pueda cubrir un total de 60 quesos. Si la cobertura por atomización cubrió mayor número de quesos, debería volver a atomizar por segunda vez la superficie, ya que la concentración planificada en la primera aplicación podría ser menor a la esperada.

iv. Conclusión

Pesando 2 gramos de natamicina al 50 % e incorporándolo en 1 litro de agua destiladas, se pueden atomizar 60 quesos para que la concentración de la cubierta de los quesos sea de 2 mg/dm².

CONCLUSIONES

En este capítulo, se estudiaron los principales aditivos alimentarios empleados en la elaboración de quesos obtenidos por coagulación enzimática. Para cada aditivo alimentario usado en quesería, fueron considerados varios aspectos como la estructura química, propiedades, modo de acción, estabilidad, solubilidad, dosis permitida, modo de aplicación y un ejemplo representativo de cálculo. Los ejemplos incluidos en cada aditivo, fueron realizados para una carga de trabajo de 100 galones de leche, que son aproximadamente 378,5 litros y que proporcionaron una conclusión general de la dosis empleada, lo cual, debido a la complejidad de los cálculos para muchos queseros artesanales, representan uno de los aportes más importantes en presente capítulo.

Los aditivos alimentarios empleados en quesería, provienen de fuentes naturales y procesos biológicos aprobados para su uso y considerados seguro para su incorporación en los quesos, según en las cantidades establecidas por las instituciones internacionales como la FDA y FAO.

Los aditivos en la industria de quesería, que mejoran la apariencia y percepción visual de los quesos son la Norbixina en queso Cheddar y Gouda, y el Peróxido de Benzoílo en queso Mozzarella y quesos blancos pasteurizados. La dosis a incorporar de norbixina al 4% en los quesos tipo Cheddar para lograr el color amarillo en una escala # 3 y considerando una pérdida del 20 % es de 4,2 mL de norbixina por cada 100 kg de leche. Por su parte, se recomienda incorporar 2 g de Peróxido de Benzoílo disuelto en 25 mL de agua destilada, por cada 100 kg de leche, en la fase de premaduración de la leche, para mantener el color blanco en los quesos.

El aditivo químico que coadyuda a la coagulación de la leche es el cloruro de calcio (CaCl₂). La máxima dosis de incorporación de CaCl₂ en la leche, para formar un gel mecánicamente resistente en las leches que han sido previamente pasteurizadas es de 27,5 g de CaCl₂ por cada 100 litros de leche (equivalente a 10 mM Ca), disueltos en 10 veces su peso en agua. Sin embargo, las normas venezolana COVENIN (3822-2003), sugirieron un máximo de 20 g de CaCl₂ por cada 100 litros de leche.

La enzima renina o quimosina es un aditivo alimentario usado en quesería para desestabilizar el sistema proteico de la leche en una de las fases más importante en el proceso de elaboración de quesos denominada coagulación. La capacidad de coagulación de la leche por parte de la quimosina se conoce como fuerza del cuajo. Cuando el cuajo es líquido, la fuerza del cuajo varía entre 2000 a 5000, lo que equivale a una dosificación que va entre 20 a 50 mL por cada 100 litros de leche. Si la presentación del cuajo es en polvo, la fuerza de los cuajos comerciales varían entre 100.000 a 150.000 y representa una dosificación entre 1 a 0,7 g por cada 100 litros de leche, respectivamente.

Entre los aditivos alimentarios que incrementan el sabor y aceleran la maduración de los quesos, se encuentran las lipasas y estererasas pregástrica. Ambas enzimas se adicionan a la leche

para iniciar de manera temprana la hidrólisis de las grasas cuando se fabrica los quesos italianos como Provolone, Pecorino y Parmesano, así como en otros tipos de quesos, como el Roquefort. Las esterasas pregástrica al igual que las lipasas, hidrolizan los ácidos grasos pero se diferencian en que las primeras requieren un sustrato soluble, mientras que las lipasas un sustrato insoluble. Tanto las lipasas como las esterasas pregástrica, tienen su propio perfil del sabor y dosificación. La dosificación de ambas depende de la intensidad del sabor a generar y la fuente de origen. Si la lipasa es de becerrito se incorporan entre 5 mL (sabor suave) a 15 mL (sabor fuerte) por cada 100 litros de leche y se emplean en la maduración del queso Parmesano. Si es de corderito o cabrito, su dosificación varía entre 5 mL (sabor suave) a 20 mL (sabor fuerte) por cada 100 litros de leche.

Existen otros aditivos naturales alimentarios que se emplean como agentes antimicrobianos y evitan el crecimiento de patógenos Gram positivo (Nisina) e inhiben el deterioro por la presencia de hongos/levaduras (Natamicina).

La nisina es un agente antimicrobiano aprobado por la FDA, usado como aditivo alimentario en quesería, para destruir las bacterias Gram positivo (*Staphylococcus aureus*), esporas Gram positivo del *Clostridium botulino* y se puede ampliar su espectro de acción, para controlar bacterias Gram negativa como *Escherichia coli* y *Salmonella* si se combina con un agente quelantes como el EDTA. La máxima cantidad de nisina permitida en los quesos es de 500 UI/kg queso que equivalen a 0,5 g de nisina comercial (Nisaplin) por cada kilogramo de queso.

Por su parte, la natamicina es un agente antimicrobiano natural, aprobado por la FDA, para su uso en los alimentos con la finalidad de prevenir el crecimiento de hongos y levaduras en queso. Se puede aplicar tanto de manera superficial, en una proporción de 2 mg Natamicina / dm², como directo en la cuajada, en una concentración de 20 ppm, o 0,02 g Natamicina por cada kg de cuajada.

Las cantidades a incorporar de aditivos en los quesos respetan el estándar de identidad o características que identifican a cada uno de los quesos durante su tiempo de comercialización, contribuyendo a incrementar la vida útil y evitando de esta forma los brotes y problemas de intoxicación alimentaria ocasionada por el consumo de alimentos deteriorados.

CUESTIONARIO

1. Actividades iniciales

1. Nombre dos aditivos químicos empleados para mejorar la apariencia de los quesos:

a. _____; b. _____;

2. Indique 2 aditivos que se emplean en la industria del queso para coagular la leche pasteurizada:

a. _____; b. _____;

3. Mencione el nombre del aditivo alimentario empleado para acelerar la lipólisis de los quesos:

a. _____;

4. Señale que agente antimicrobiano natural se emplea para controlar bacterias patógenas Gram(+):

a. _____;

5. Mencione el aditivo natural usado para controlar el crecimiento de hongos y levaduras:

a. _____; b. _____;

2. Preguntas relevantes

6. ¿Cuál de los aditivos de color es empleado como agente blanqueador?

a. Onoto

b. Norbixina

c. Peróxido de benzoílo

d. Bixina

7. ¿Qué función cumple el CaCl_2 ?

a. Mejora el sabor

b. Evita el crecimiento de mohos

c. Ayuda a darle blancura a los quesos

d. Coadyuda a la coagulación de la leche pasteurizada

8. ¿La renina de las flores de Cynara es específico para coagular que tipo de caseína?

a. Caseína de la leche de oveja

b. Caseína de la leche de cabra

c. Caseína de la leche de vaca

9. ¿Las lipasas y esteres de cabrito son empleadas en la fabricación de qué tipo de queso?

a. Queso Parmesano

b. Queso Provolone

c. Queso Pecorino

10. ¿Cuál es el modo de acción de la nisina para inhibir el crecimiento de microorganismos?

a. Solubilización del contenido celular

b. Poración de la membrana celular

c. Cambio de permeabilidad de la membrana celular

3. Estudio de casos

11. Se desea calcular la fuerza de un cuajo líquido. Para ello se mide con la pipeta 1 mL del cuajo y se diluye en 99 mL de solución salina al 0,85 %. De la dilución se tomó 1 mL para coagular un volumen de 100 mL de leche cruda. El tiempo de coagulación fue de 40 minutos. Determine la Fuerza del cuajo. **Respuesta: Fc=1 0000; 1:1 0000.**

12. Para una producción de 100 litros de leche pasteurizada se desea incorporar nisina en los quesos para el control de bacterias formadora de esporas. La concentración de nisina deseada en el producto final es de 12,5 mg/kg de queso y el rendimiento en queso es del 12 %. Calcule los gramos de nisina comercial (Nisaplin) requeridas para dicho lote. **Respuesta: 6 gramos de Nisaplin en polvo.**

13. Se desea incorporar una proporción de 12,5 ppm de natamicina en queso para controlar mohos y levaduras. De un lote de leche de 100 litros se elabora el queso con un rendimiento del 12%. Determine la cantidad de Natamicina comercial a pesar, sabiendo que su concentración es del 50 %. **Respuesta: 0,3 gramos de natamicina comercial (Delvolid) en polvo.**

4. Actividades finales

14. La norbixina es soluble en agua __Verdadero __Falso

15. La tasa de incorporación del Peróxido de Benzoílo (PB) para blanquear la leche es de 2 g PB/100 g leche __Verdadero __Falso

16. El CaCl_2 se emplea para mejorar la actividad del cuajo en el proceso de coagulación de la leche pasteurizada __ Verdadero __ Falso

17. La quimosina de ternero hidroliza los enlaces de la kapa-caseína en forma aleatoria
__ Verdadero __ Falso

18. Las proteasas del *Mucor miehei* son las preferidas como sustitutos del cuajo de ternero
__Verdadero __ Falso

19. Las lipasas de corderito es empleada para mejorar el sabor en queso Provolone
__Verdadero __ Falso.

20. La nisina y Natamicina son agentes antimicrobianos con la categoría GRAS por la FDA
__Verdadero __ Falso

5. Palabras de reflexión

La categoría GRAS asignada a algunos aditivos químicos, significa que es generalmente reconocido como seguro por la Food Drug Administration de los Estados Unidos y que por lo tanto no producen daños en el consumidor ya que el cuerpo las puede metabolizar, inactivar y eliminar sin generar efectos colaterales en el organismo. Por lo general los aditivos alimentarios con esta categoría provienen de fuentes naturales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Fattah, A; S. Saleh. 1988. Properties of milk-clotting enzyme from *Aspergillus versicolor* and isolation of rennin-like enzyme. *Biological Wastes*. 25(2): 109-115.
- Alais, Ch. 1994. *Ciencia de la Leche*. Continental. 9na ed. Mexico. pp. 40-187.
- Anon, 2008. Application of lipases. Disponible en: <http://www.aubc.org/beta/bioproj2/uses.html>. Au-KBC Research Center, Chennai, India.
- Aplin y Barrett ltd. 1993. International Acceptance of Nisin as Food Preservative. *England Tech. Info. Sheets*, 12-88 p.
- Aravidan, R; P. Aubumathi; T. Viruthagiri. 2007. Lipase application in food industry. *Ind. J. Biotech*, 6: 141-158.
- Artica, L. Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos. 3ª Ed. Libros y editoriales, TEIA. pp. 136-137.
- Balcao, V.; F. Malcata. 1998. Lipase-Catalyzed modification of milkfat. *Biotechnology adv.* 16(2): 309-341.
- Berry, D. 1999. Natamycin for shredded cheese. *Dairy Foods*. 100 (45).
- Broughton, J.D. 2012. Natural antimicrobials as additive and ingredients for the preservation of food and beverages. *In: Baines D.; R. Seal. (Eds). Natural Food Additives, Ingredients and flavourings. Woodhead publishing series in Food Science, Technology and Nutrition.* pp. 127-161.
- Broyard, C. F. Gaucheron. 2015. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technology challenge. *Dairy Science and Technology*. 95: 831-82.
- Camacaro, J.; J. M. Gomez; C. Jimenez; L. Vega. Manganillo. 2018. Un colorante liposoluble de semillas de onoto (*Bixa orellana* L.) como insumo para la industria alimentaria. *Revista Ingeniería UC*, 25(2): Redalyc. Org.

- Ceruti, R.; M. Pirola; E. Ramos. L. Robert; A. Rubiolo; G. Sihufe. 2016. Use of an exogenous carboxypeptidase to accelerate proteolysis in Reggiano cheese. *Czech. Food Sci.* 34(5): 445-455.
- CFR. 1963. Code of Federal Regulation (CFR). Annatto extract. Title 21, Chapter I, subchapter A, part 73. Subpart A. Contents 73.30. Disponible en: <https://www.ecfr.gov>. [Consultado: 1 de Febrero 2020].
- CFR. 1983. Code of Federal Regulation (CFR). Gouda Cheese. Title 21, Chapter I, subchapter B, part 133. Subpart B. Contents 133.142. Disponible en: <https://www.ecfr.gov>. [Consultado: 9 Enero 2020].
- CFR. 1986. Code of Federal Regulation (CFR). Peroxide of Benzoflo. Title 21, Chapter I, subchapter B, part 184. Subpart B. Contents 184.1157. Disponible en: <https://www.ecfr.gov>. [Consultado: 1 de Febrero 2020].
- CFR. 1996. Code of Federal Regulation (CFR). Cloruro de calcio. Title 21, Chapter I, subchapter B, part 184. Subpart B. Contents 184.1193. Disponible en: <https://www.ecfr.gov>. [Consultado: 1 de Febrero 2020].
- Cha, D.; J. Chen; H. Park; M. Chinnan. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* en tofu by use of a polyethylene film coated with a cellulosic solution containing nisin. *International journal of Food Science and Technology* 38: 499-503.
- Chandan, R.; R. Kapoor. 2011. Manufacturing outlines and applications of selected cheese varieties. *In: Chandan, R. Chandan, R.; A. Kilara. (Eds). Dairy Ingredients for Food Processing.* Blackwell Publishing LTD. Iowa, USA. pp. 267-316.
- Cheigh, C.; Y. Pyun. 2005. Nisin biosynthesis and its properties *Biotechnology Letters* 27, 1641-1648.
- Clerici-Sacco Group (2020). Raff Lactointredientes. Lipasas: Enzimas para incrementar aroma y sabor en crema y quesos. Disponible en: <http://www.raf.com.mx>. [Consultado: 20 de Enero 2020].
- COVENIN-1813. 2000. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondo Norma N°1813-2000. Queso Blanco. 2da Revisión. 5 p.
- COVENIN-3821. 2003. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondo Norma N°3821-2003. Norma General de Quesos. 2da Revisión. 7p.
- Cutter, C.; G. Siragusa. 1995. Population Reductions of Gram-Negative Pathogens Following Treatment with nisin and Chelators Under Various Conditions. *Journal of Food Protection* 58 (9): 977-983.
- Davidson, P.; D. Hoover. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. Ch5. *In: Salmine, S.; A. Von Wright. (Eds.). Lactic Acid Bacteria.. Academic Press, Ins. San Diego. California.* 127-159 p

-
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and Its Application as a Food Preservative. *J. Soc. Dairy Technology*. 43(3): 73-76 p.
- Delves-Broughton, J. 2012. Natural antimicrobials as additive and ingredients for the preservation of food and beverages. In: Daines, D.; R. Seal. (Eds). *Natural Food Additives, Ingredients and flavourings*. Woodhead Publishing limited. Philadelphia, USA. pp. 127-161.
- Delves-Broughton, J.; I. Thomas; G. Willians. 2006. Natamycin as an antimicrobial preservative on cheese and fermented sausages. *Food Australia*, 58: 19-21.
- Delves-Broughton, J.; G. Willian. 1993. Nisin. In: *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Macrae, R.; R. Robinson; M. Sadler. (Eds). London: Academic Press. pp. 3234-3240.
- Delves-Broughton, J.; P. Blackburn. R. Evans; J. Hugenholtz. 1996. Applications of the Bacteriocin, Nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 69, 193-202 p.
- Delves-Broughton, J.; L. Thomas; C. Doan; P. Davidson. 2005. Natamycin. In: Davidson, P.M; J. Sofos; A. Branen (Eds.). *Antimicrobials in Food*, Third Edition. CRC Press; Taylor and Francis Group, Boca-Raton, USA. pp: 275-287.
- Devlieghere, F.; L. Vermeiren; J. Debere. 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*. 14: 273-285.
- DMS, 2014. Natamycin. Conservante de alimentos eficaz y natural. Disponible en: <http://natamycin.com/es/regulatory>. [29 de Enero del 2020].
- Egito, A. J. Girardet; L. Laguna; C. Poirson; D. Molle'; L. Miclo; G. Humbert; J. Gaillard. 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. *International Dairy Journal*, 17, 816-825. doi:10.1016/j.idairyj.2006.09.012.
- Estrada, M. 1997. Nisina: mecanismo de acción, regulación y utilización en alimentos. Seminario de grado. Facultad de Ciencias. Instituto de Ciencia y Tecnología. UCV. 67 p.
- FDA. 2014. ICSA/Office of food Additive safety. Grass Notice Natamycin. Published: 6 November 2015. Disponible en: <http://www.fda.gov>. [Consultado: 29 de Enero 2020].
- Fedrick, I.; J. W. Aston; S. Nottingham; J. Dullely. 1986. The effect of a neutral fungal protease on Cheddar cheese ripening. *NZ. J. Dairy Sci. Technol.* 21:9.
- Fenil. 2017. Federación Nacional de Industrias Lácteas (ENIL). Ministerio de Sanidad, Servicios Asociados e igualdad. España. Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). 2 p.
- Fox, P. F.; T. Guinee; T. Cogan; P. McSweeney. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers, Inc.
-

- Friedman, M.; P. Henika; R. Mandrell. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteric*. *J. Food Prot.* 65: 1545-1560.
- Gao, F.; T. Abee; H. Koning. 1991. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome C Oxidase – containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2164-2170.
- Han, J. 2005. *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, London. 517 p.
- Hayashi, K. 1996. Accelerate maturation of cheese by proteolytic enzymes produced by *Brevibacterium* lines ARQ, 30(2): 129-137.
- Hayashi, K.; D. Revell; A. Law. 1990. Accelerated ripening of cheddar cheese with the aminopeptidase of *B. linens* and a commercial neutral proteinase. *J. Dairy Res.* 57: 571-577.
- Holt, C. 1992. Structure and stability of bovine casein micelles. In *advances protein chemistry*. Eds. J.T. Edall, C.B. Anfimson, F.M. Richards, D.S. Eiseberg, Academic Press, San Diego. pp. 63-151.
- Holt, C. 1998. Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by sephracryl column chromatography. *J. Dairy Sci*, 81: 2994-3003.
- Jacob M; D. Jaros; H. Rohm. 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14–33. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x.
- Jozala, A.; L. Novaes; O. Cholewa; D. Moraes; T. Penna. 2005. Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *African Journal of Biotechnology* 4 (3): 262-265.
- Judkins, H. 1984. *La leche. Su producción y procesos industriales*. Continental, Mexico. pp. 270-277.
- Kanizawa, T.; Y. Yamaguchi; S. Hattori. 1982. Production of dairy flavors by microbial lipase. *J. Food. Sci. Technol. Res.* 29: 93-699.
- Kilara, A.; R. Chandan. 2011. *Enzyme-Modified Dairy Technology. Dairy Ingredients for food processing*. Chandan R. Kilara, A. (Eds). Wiley-Blacwell. Iowa, USA. Pp. 317-333.
- Kilcawley, K.; M. Wilkinson; P. Fox. 2002. Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzy. Microbiol. Technol.*, 31: 310 - 320.
- Law, B. 1984. Flavor development in cheese. In: *Advances in the microbiology and biochemistry o cheese and fermented milk*. Elsevier Appl. Sci. Publ., London, pp. 187-207.
- Law, B.; A. Wigmore. 1982. Accelerated cheese ripening with food grade proteinases. *J. Dairy Research.* 49: 137-146.
- Liu, W.; J. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2551-2558.

-
- Lucey, J.; P. Fox. 1993. Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture. A review. *J. Dairy Sci.* 76(6): 1714-1724.
- Mase, T. K. Asano.; Y. Ikela; Y. Kato; H. Esunki; S. Isshik. 2013. Characterization and application of Lipase 39-A from *Cryptococcus flavescens* for cheese flavoring. *Food Sci. Technol. Res.* 19(1): 89-95.
- McSweeney, P.; M. Sousa. 2000. Biochemical pathway for the production of flavor compound in cheese during ripening: a review. *Le Lait.* 80(3): 293-324.
- Mehar-Afroz, Q.; K. Archana-Khan; P. Ahmed; S. Uprit. 2015. Enzymes used in dairy industries. *International Journal of Applied Research.* 1(10): 523-527.
- Morillo-Piña, O.; P. García-Lugo; B. Guerrero; C. Borregales-Torres; J. Barrios. 2014. Efectos del pH, NaCl, CaCl₂ y la temperatura sobre la firmeza del cuajo de tres coagulantes/Cuajos. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 5(1): 43-56.
- Osorio, A.; N. Gómez; C. Sánchez. 2008. Evaluación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para la producción de renina a partir del moho *Mucor miehei*. *Revista de la Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia,* 45, 17-26.
- Qi, P. 2007. Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Lait,* 87: 363-383.
- Raab, W.; 1972. Natamycin (Primaricin) its properties and possibilities in medicine. Georg thyme publishers, Stuttgart, Germany.
- Raksakulthai, R.; M. Rosenberg; N. Haard. 2002. Accelerated cheddar cheese ripening with an aminopeptidase fraction from squid hepatopancreas. *J. Food Sci.,* 67(3): 923 -929.
- Reps, A.; L. Jedrychowski; J. Tomasik; K. Wisniewska 2002. Natamycin is ripening cheeses. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(5): 243-247.
- Rodríguez, J. 1996. Revisión: espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modo de acción de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*. *Food Science and Technology International* 2: 61-68.
- Roguinski, H.; J. Fuquay; P. Fox. 2003. *Encyclopedia of Dairy Science.* Academic Press, UK. pp. 252-444.
- Roseiro, L.; M. Barbosa; J. Ames; R. Wilbey. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants- the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk *cheeses*. *International Journal of Dairy Technology,* Vol. 56(2): 76-85.
- Ruiz-Rojas, J. 2005. Extracción y caracterización de proteasas de especies vegetales nativas y su potencial utilización en quesería. Tesis de grado. Escuela de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 88 p.
- Sahan, N.; M. Guven; A. Kacar. 2004. The production of strained yogurt from different acidity yogurts and the effect of high pressure heat treatments. *Industria conserve.* 73: 303-315.
-

- Santos, L.; V. Dias; V. Pilla; A. Andrade; L. Alves; E. Munin; S. Zilio. 2014. Spectroscopic and photothermal characterization of annatto: Application in Functional foods. *Dyes and pigments*. 110: 72-79.
- Sathya, R.; B. Pradeep; J. Angayarkanni. M. Palaniswamy. 2009. Production of Milk Clotting Protease by a Local Isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using Agro-industrial Wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 788-794.
- Sharma, P.; A. S. Segat; A. Kelly; J. Sheehan. 2019. Colorants in cheese manufacture: Productions, Chemistry, Interactions, and regulations. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Wiley on line Library. 23 p.
- Schulz, D.; M. Pereira; R. Bonelli; M. Nunes; C. Batista. 2003. Bacteriocina: Mecanismo de Acao e Usona Corsevacao de Alimentos. *Alim. Nutr., Araraguara*. 14(2): 229-235.
- Scotter, M; L. Wilson; G. Appleton; L. Castle. 1998. Analysis of Annatto (*Bixa orellana*). Food coloring formulations I. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 1031-1038.
- Silva, M.; F. Cebola. 2016. Food preservatives-An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of food and Agriculture*. 28(6): 3666-373.
- Siricururatana, P.; M. Lyers; D. Manns; J. Churey; W. Worob; I. Padilla-Zakour. 2013. Shelf-life evaluation of natural antimicrobials for concord and Niagara Grapes Juices. *Journal of food Protection*. 766(1): 72-78.
- Sivropoulou, A.; E. Papanikolaou; C. Nikolaou; S. Kokkini; T. Lanaras; M. Arsenakis. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1202-1205.
- Smith, K. 2014. Annatto and color removal. Wisconsin Center for Dairy Research. 27 p. Disponible en: <http://www.cdr.wisc.edu>. [Consultado: 20 de Enero 2020].
- Smith, J. 2006. Annatto extracts-chemical and technical assessment. 21 p. Disponible en: <http://wwwwww.FAO.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/67/annatto.pdf>. [Consultado: 20 de Enero 2020].
- Sousa, M.; Y. Ardö; P. McSweeney. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11, 327-345.
- Stark, J. 2003. Natamycin: an effective fungicide for food and beverages. In: Roller, S. Ed.: *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. Wood head Publishing Limited, Cambridge, UK. pp: 82-97.

-
- Sukkwai, S.; K. Kijroongrojana; P. Chompracha; K. Pujols; J. Alonso-Marrenco; W. Prinyawiwatkul. 2018. Effect of colorant concentration and natural color or sodium content claim on saltiness perception, consumer liking and emotion, and purchase intent of dipping sauces. *International Journal of Food Science and Technology*, 53: 1246-1254.
- Tippayatum, P. V. Chonhenchob. 2007. Antibacterial activities of thymol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. *Kasetsart J. (Nut. Sci)*. 41(5): 319-323.
- Ture, H.; E. Eroglu; B. Ozen; F. Soyer. 2011. Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(1), 154e160.
- Upadhyay V.; P. McSweeney. 2003. Acceleration of cheese ripening. In: Smit G. (ed.): *Dairy Processing: Improving Quality*. Boca Raton, CRC Press. pp. 419-447.
- Wallin, M. 2006. Annatto Extracts. Chemical and Technical Assessment, 21. Disponible en: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/67/annatto.pdf>. [Consultado: 31 de Enero del 2020].
- Weber, G.; I. Steeson; J. Delvevs-Broughton. 2008. Antimicrobial fermentation technology. Proc. II. Is a natural preservatives in food feed and cosmetic. Haukin-Frenkel, D. et al. (Eds). *Acta. Hort. ISHS*. 79-83.
- Wiedemann, I. E. Breukink; Van Kraaij; O. Kuipers; G. Bierbaum; B. de Kuyff; H. Sahl. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell Wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The journal of biological chemistry*. 276: 1772-1779.
- Wilkinson M.; K. Kilcawley. 2005. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 15: 817-830.
- Wu, F.; C. Chang; I. Shih. 2013. Optimization of the production and characterization of milk clotting enzymes by *Bacillus subtilis*. *SpringerPlus*. 2: 33(31 January).
- Zhang, Y.; S. Gamarra; G. Garcia-Effron; S. Park; D. Perlin; R. Rao. 2010. Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. *PLoS Pathogens*. Online.
-