

Universidad de Guadalajara

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías

Secretaría Académica

Coordinación de Posgrados

"IDENTIFICACIÓN DE PARÁMETROS DE AUTENTICIDAD EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS"

TRABAJO QUE CON CARÁCTER DE TESIS

PRESENTA

LA M. EN C. SANDRA TERESITA MARTÍN DEL CAMPO BARBA

PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

Directores de Tesis
Dr. Ricardo Cosío Ramírez
Dr. Georges Corrieu

Asesor
Dr. Daniel Picque

Guadalajara Jal., México Diciembre de 2006

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Ecole Doctorale ABIES

Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Agroalimentaires

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Sciences Alimentaires

présentée et soutenue publiquement par

Sandra Teresita MARTÍN DEL CAMPO BARBA

le 8 décembre 2006

IDENTIFICATION DES PARAMETRES D'AUTHENTICITÉ DU LAIT ET PRODUITS LAITIERS

IDENTIFICATION OF AUTHENTICITY PARAMETERS IN MILK AND DAIRY PRODUCTS

Directeurs de thèse

Dr. Georges CORRIEU / Dr. Ricardo COSÍO RAMÍREZ

Jury
Dr. Daniel PICQUE
Dr. Carlos PELAYO ORTIZ
Dr. Héctor GÓMEZ HERNÁNDEZ
© UMLV

Dedico este trabajo a….

…Dios, a quien todo lo que soy.

…Mi madre, a quien amo profundamente.

…A mis Hermanos, a quienes quiero enormemente

…A mis amigos, quienes han estado conmigo en las buenas y en las malas.

Agradecimientos

Agradezco a....

... CONACyT por el apoyo que me brindó al otorgarme una beca para realizar mis estudios.

...Al Programa de Cooperación de Posgrados (PCP) México-Francia por la beca que me brindaron y que me permitió realizar este trabajo en cotutela.

...A la Universidad de Guadalajara, que es *mi Alma Mater* y de la que he recibido mi formación académica.

...Al Institu National Agronomique Paris-Grignon, que me acogío en cotutela.

...Al CIATEJ que apoyó la realización del trabajo experimental con leche.

... A la UMR GMPA que me recibió en sus intalaciones y que me apoyó en la realización del trabajo experimental con queso.

...A mis directores y asesores de tesis por sus valosas enseñanzas.

...Estrellita, por ser una gran amiga y por todo el apoyo que ella y su familia me han dado.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la pertinencia de la espectroscopia de infrarrojo (FTIR) combinada con técnicas quimiométricas para identificar algunos parámetros de autenticidad en leche y quesos, considerando ésta como la correcta denominación de leche y productos similares, así como la edad en el caso de los quesos. Los modelos discrimiantes obtenidos para los perfiles espectrales MIR permitieron clasificar las muestras de leche y productos similares según su denominación, así como predecir la edad de quesos Camembert y Emmental y predecir diferentes parámetros fisicoquímicos en queso Camembert a lo largo de la maduración. Los mejores modelos discriminantes entre muestras de leche adulteradas en función de su autenticidad y nivel de adulteración fueron obtenidos para el perfil de FAMES. Estos resultados muestran que la espectroscopia de infrarrojo medio (MIR) tiene potencial como un método rápido y directo para diferenciar la leche de productos similares, y para predecir el tiempo de maduración de quesos Camembert y Emmental.

Palabras Clave: Espectroscopia de infrarrojo, autenticidad, leche, maduración de queso, Camembert, Emmental, ACP, PLS, ADG

◊ **Martín-del-Campo, S.T.,** Pique, D., Cosío-Ramírez, R., and Corrieu, G. (In press). Middle infrared spectroscopy characterisation of ripening stages of Camembert-type cheeses. International Dairy Journal. DOI 10.1016/j.idairyj.2006.10.003

◊ **Martín-del-Campo, S.T.,** Pique, D., Cosío-Ramírez, R., and Corrieu, G. (sometido). Evolution of chemical parameters in soft mould-ripened cheese during ripening by Mid-infrared spectroscopy. Journal of Dairy Science.

Résumé

Dans le présent travail, la pertinence de la spectroscopie moyen infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), combinée avec des techniques chimiométriques, pour identifier quelques paramètres d'authenticité de laits et de fromages est évaluée.

Les modèles discriminants, obtenus à partir des profils spectraux MIR, ont permis de :

- classer les échantillons de lait et de produits similaires selon leur dénomination,
- de prédire l'âge de fromages de type Camembert et Emmental,
- de prédire différents paramètres physicochimiques caractéristiques de fromages de type Camembert pendant leur affinage.

Les meilleurs modèles discriminants entre les échantillons de lait, en fonction de leur authenticité et de leur niveau d'adultération, ont été obtenus pour le profil des acides grases méthylés (FAMES).

Les résultats montrent que la spectroscopie moyenne infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) constitue une méthode rapide et directe pour identifier les laits et produits similaires, et pour prédire les durées d'affinage de fromages de type Camembert et Emmental.

Mots Clés: Spectroscopie infrarouge, authenticité, lait, affinage de fromage, Camembert, Emmental, ACP, PLS, ADG

◊ **Martín-del-Campo, S.T.,** Pique, D., Cosío-Ramírez, R., and Corrieu, G. (In press). Middle infrared spectroscopy characterisation of ripening stages of Camembert-type cheeses. International Dairy Journal. DOI 10.1016/j.idairyj.2006.10.003

◊ **Martín-del-Campo, S.T.,** Pique, D., Cosío-Ramírez, R., and Corrieu, G. (sousmis). Evolution of chemical parameters in soft mould-ripened cheese during ripening by Mid-infrared spectroscopy. Journal of Dairy Science.

Abstract

In this work was evaluated the suitability of infrared spectroscopy (FTIR) in combination with chemometrical techniques to identify some authenticity parameters in milk and cheeses, considering this as the correct denomination of milk and similar products, as well as the age in cheeses. The discriminant models obtained for the MIR spectral profiles made it possible to classify the samples of milk and similar product according to their denomination, as well as, to predict the age in Camembert and Emmental cheeses and to predict some physicochemical parameters in Camembert cheese throughout ripening. The best discriminant models between adulterated milk samples in function of their authenticity and adulteration level were obtained for the FAMES profile. These results show that mid infrared (MIR) has a potential as a fast and direct method to differentiate milk from similar products and to predict the ripening time in Camembert and Emmental cheeses.

Key Words: infrared spectroscopy, authenticity, milk, cheese ripening, Camembert, Emmental, PCA, PLS, GDA

◊ **Martín-del-Campo, S.T.,** Pique, D., Cosío-Ramírez, R., and Corrieu, G. (In press). Middle infrared spectroscopy characterisation of ripening stages of Camembert-type cheeses. International Dairy Journal. DOI 10.1016/j.idairyj.2006.10.003

◊ **Martín-del-Campo, S.T.,** Pique, D., Cosío-Ramírez, R., and Corrieu, G. (submited). Evolution of chemical parameters in soft mould-ripened cheese during ripening by Mid-infrared spectroscopy. Journal of Dairy Science.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos 4
Resumen 5
Résumé 6
Abstract 7
ÍNDICE GENERAL 8
ÍNDICE DE TABLAS 12
ÍNDICE DE FIGURAS 16
ÍNDICE DE ANEXOS 20
Introducción 21
Introducción 22
RESUME DETAILLE EN FRANÇAIS 27
INTRODUCTION 27
PREMIÈRE SECTION. Révision Bibliographique 30
Chapitre 1. Antécédents 30
Chapitre 2. Authenticité des produits laitiers 32
DEUXIÈME SECTION. Matériel et Méthodes 36
Chapitre 3. Lait 36
Chapitre 4. Camembert 39
Chapitre 5. Emmental 41
TROISIÈME SECTION. Résultats et Discussions 43
Chapitre 6. Lait 43
Chapitre 7. Analyse spectrale pour le suivi de l'affinage de Camembert 46
Chapitre 8. Emmental résultats 50
CONCLUSION 52
Primera sección REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 55
Capítulo 1. Antecedentes 56
1.1 Autenticidad de alimentos 56
1.1.1 Un poco de Historia 56
1.1.2 Criterios de autenticidad 57

1.2 Aspectos socioeconómicos del sector lácteo 60
1.3 Aspectos normativos 61
Capítulo 2. Autenticidad de productos lácteos 67
2.1 Cambios bioquímicos en la elaboración de productos lácteos 67
2.1.1 Leche y productos similares 67
2.1.2 Quesos 68
2.2 Parámetros fisicoquímicos 69
2.2.1 Leche y productos similares 69
2.2.2 Quesos 69
2.3 Técnicas instrumentales 70
2.3.1 Espectroscopia de infrarrojo 70
2.3.2 Técnicas separativas 72
2.4 Métodos estadísticos utilizados en la discriminación de productos 73
2.4.1 Análisis de Componentes Principales (ACP) 74
2.4.2 Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) 74
Segunda sección MATERIALES Y MÉTODOS 77
Capítulo 3. Leche 78
3.1 Muestras 78
3.1.1 Leche y productos similares 78
3.1.2 Adulteración con grasa exógena 81
3.2 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR) 81
3.2.1 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Medio (MIR) 82
3.2.2 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIR) 82
3.3 Extracción y purificación de la grasa 83
3.4 Perfil de ácidos grasos 83
3.5 Análisis estadísticos 85
Capítulo 4. Queso Camembert 88
4.1 Producción de muestras y maduración 88
4.2 Muestreo 88
4.3 Análisis fisicoquímicos 89
4.4 Fraccionamiento para análisis espectroscópico 89
4.5 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Medio (FTIR) 91
4.6 Análisis estadísticos 91
Capítulo 5. Queso Emmental 95

5.1 Producción de muestras y maduración ... 95
5.2 Muestreo ... 95
5.3 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Medio (FTIR) ... 96
5.4 Análisis estadísticos ... 97
Tercera sección RESULTADOS Y DISCUSIONES ... 99
Capítulo 6. Resultados Leche ... 100
6.1 Leche y productos similares ... 100
6.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo medio (MIR), análisis discriminante ... 100
6.1.2 Espectroscopia de Infrarrojo cercano (NIR), análisis discriminante ... 106
6.1.3 Perfil de ácidos grasos (FAMES) ... 113
6.1.4 Conclusiones parciales ... 119
6.2 Leche adulterada con grasas exógenas ... 120
6.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo Medio (MIR), análisis discriminante ... 120
6.2.3 Perfil de ácidos grasos, análisis discriminante ... 123
6.2.4 Conclusiones parciales ... 134
Capítulo 7. Resultados Camembert ... 136
7.1 Evolución espectral y análisis de varianza ... 136
7.1.1 Queso ... 136
7.1.2 Suspensión Desgrasada de Queso (DCS) ... 141
7.1.3 Grasa purificada ... 144
7.1.4 Fracciones nitrogenadas ... 145
7.2 Parámetros Fisicoquímicos, correlación y análisis de componentes principales ... 148
7.3 Espectros de infrarrojo, análisis de componentes principales ... 150
7.3.1 Queso ... 150
7.3.2 Suspensiones Desgrasadas de Queso (DCS) ... 153
7.3.3 Grasa purificada ... 154
7.3.4 Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA) ... 155
7.3.5 Nitrógeno Insoluble en Etanol (NI-EtOH) ... 157
7.3.6 Caseínas y Nitrógeno Soluble en Etanol (NS-EtOH) ... 157
7.4 Regresión de mínimos cuadrados parciales ... 157
7.4.1 Predicción del tiempo de maduración ... 158
7.4.2 Predicción de los parámetros fisicoquímicos ... 160
7.5 Conclusiones parciales ... 165
Capítulo 8. Resultados Emmental ... 167

8.1 Evolución espectral 167
8.2 Análisis de componentes principales de los espectros de infrarrojo 172
8.3 Análisis discriminante de los espectros de infrarrojo 174
8.4 Conclusiones parciales 179
Conclusión 181
Conclusión 182
Bibliografía 185
Anexos 198
Anexo A. Metodologías 199
A.1 Elaboración de queso blando tipo Camembert (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004). 201
A.2 Determinación de lactosa y ácido láctico (Leclercq-Perlat *et al.*, 1999) 201
A.3 Determinación de fracciones nitrogenadas por (Leclercq-Perlat *et al.*, 2000) 202
Anexo B. Leche 204
Anexo C. Queso Camembert 219
Anexo D. Queso Emmental 226

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Clasificación de las muestras de productos comerciales utilizados en la discriminación. 80
Tabla 5.1 Muestras de queso Emmental evaluadas. * Código xz donde x= asociación de cepas (A-I) y z= muestreo. 96
Tabla 6.1. Análisis Discriminante (ADG) los espectros de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de las muestras de leche y productos similares en función de la información declarada en la etiqueta.....104
Tabla 6.2. Análisis Discriminante (ADG) los espectros de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de las muestras de leche y productos similares en función de los criterios de la NOM-155-SCFI-2003. 108
Tabla 6.3. Análisis Discriminante (ADG) los espectros de infrarrojo cercano (10000-4000 cm^{-1}) de las muestras de leche y productos similares en función de la información declarada en la etiqueta.....110
Tabla 6.4. Análisis Discriminante (ADG) los espectros de infrarrojo cercano (6000-4000 cm^{-1}) de las muestras de leche y productos similares en función de los criterios de la NOM-155-SCFI-2003. 112
Tabla 6.5. Ácidos grasos (FAMES) seleccionados por el procedimiento paso a paso ascendente para el Análisis Discriminante (ADG) de los perfiles de FAMES según la información de la etiqueta.....115
Tabla 6.6. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de las muestras de leche y productos similares según la etiqueta. Tabla de clasificación para los modelos de calibración y validación cruzada. 116
Tabla 6.7. Ácidos grasos (FAMES) seleccionados por el procedimiento paso a paso ascendente para el Análisis Discriminante (ADG) de los perfiles de FAMES según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003. 117
Tabla 6.8. Análisis Discriminante General (ADG) de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de las muestras de leche y productos similares según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003. Tabla de clasificación para los modelos de calibración y validación cruzada. 119
Tabla 6.9. Análisis Discriminante General (ADG) de los espectros de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de muestras de leche adicionada con diferentes niveles de grasas exógenas. 123

Tabla 6.10. Ácidos grasos seleccionadas por el procedimiento paso a paso para los Análisis Discriminantes (ADG) de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasas exógenas. 125
Tabla 6.11. Análisis Discriminante General (ADG) de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasas exógenas. Tabla de clasificación para los modelos de calibración y validación cruzada. 126
Tabla 6.12. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con aceite de coco (MGA). Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada. 127
Tabla 6.13. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con aceite de soya (MGB). Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada. 129
Tabla 6.14. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con aceite de canola (MGC). Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada. 130
Tabla 6.15. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasa butírica (MGD). Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada. 131
Tabla 6.16. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con cuatro grasas exógenas. Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada. 134
Tabla 7.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de corazón (C) y subcorteza (SC) de queso y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$) 138
Tabla 7.2. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros Suspensión Desgrasada de Queso (DCS) y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$) 143
Tabla 7.3. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de Grasa purificada (PF), Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), Caseína (CN) y Nitrógeno soluble (NS-EtOH) e Insoluble (NI-EtOH) en Etanol y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$) 147
Tabla 7.4. Coeficientes de correlación para las variables fisicoquímicas analizadas en los quesos tipo Camembert durante la maduración [a] 149
Tabla 7.5. Resultados de la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) para el tiempo de maduración de queso usando los espectros de infrarrojo de queso entero* 158
Tabla 7.6. Valores de los parámetros fisicoquímicos usados en las series de calibración y validación para la regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). 160

Tabla 7.7. Resultados de la regresión PLS usando los valores fisicoquímicos y los espectros de infrarrojo medio de queso. 161
Tabla 8.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de queso Emmental y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$) 169
Tabla 8.2. Análisis Discriminante General (ADG) de los espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) del queso Emmental. Tabla de clasificación en función de la edad para los modelos de calibración y validación cruzada. 177
Tabla 8.3. Análisis Discriminante General (ADG) los espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) del queso Emmental. Probabilidad de clasificación de las muestras de predicción. 178
Tabla A.1 Estándares y resultados de calibración para metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) 200
Tabla B.1. Perfil de concentración de ácidos grasos (FAMES) de leche y productos similares expresado en g 100 g^{-1} de ácidos grasos. 205
Tabla B.2. Distancias Mahalanobis al cuadrado y probabilidad de clasificación en función de la etiqueta para los perfiles de ácidos grasos de las muestras individuales leche y productos similares. 208
Tabla B.3. Distancias Mahalanobis al cuadrado y probabilidad de clasificación en función de la etiqueta para los perfiles de ácidos grasos de las muestras individuales leche y productos similares. 209
Tabla B.4 Perfil de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasas exógenas expresado en g 100 g^{-1} de ácidos grasos. Código de las muestras: MGxyz, donde x es la grasa, y el nivel y z la repetición. 210
Tabla C.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de corazón (C) y subcorteza (SC) de queso Camembert y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$) 220
Tabla C.2. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros Suspensión Desgrasada de Queso Camembert (DCS) y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$) 222
Tabla C.3. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de Grasa purificada (PF), Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), Caseína (CN) y Nitrógeno soluble (NS-EtOH) e Insoluble (NI-EtOH) en Etanol y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$) 224
Tabla D.2. Bandas seleccionadas por el procedimiento paso a paso ascendente para el Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de queso Emmental. 228
Tabla D.3. Distancias Mahalanobis al cuadrado para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Calibración. 229
Tabla D.4. Prueba de significancia de la Distancia Mahalanobis al cuadrado ($p < 0,05$). 230

Tabla D.5. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Calibración. 231
Tabla D.6. Distancias Mahalanobis al cuadrado para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Validación Cruzada. 232
Tabla D.7. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Validación Cruzada. 232
Tabla D.9. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Predicción. 233

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Porcentaje por país de la producción mundial de leche en el año 2005 (ton año^{-1}). Fuente: FAO, (2006a). 60

Figura 1.2. Importaciones Mexicanas de leche de vaca entera y descremada en polvo. Fuente: FAO (2006b) 61

Figura 4.1. Esquema del seccionamiento de los quesos Camembert. 89

Figura 6.1 Espectros infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) leche y productos similares respecto a la información declarada en la etiqueta. Espectro promedio A) Leche (L) y B) Fórmula láctea (FL). 101

Figura 6.2 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo medio de leches y productos similares. A) Mapa Factorial en función del producto [▲ Leche (L) y □ Fórmula Láctea (FL)], B) Mapa factorial en función de las muestras (Tabla 3.1 sección 3.1.1), C) PC1, D) PC2 y E) PC3. 102

Figura 6.3 Espectros infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) leche y productos similares respecto a la NOM-155-SCFI-2003. Espectro promedio A) Leche (L), B) Fórmula láctea (FL) y C) Producto Lácteo Combinado (PLC). 105

Figura 6.4 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo medio de leches y productos similares. A) Mapa Factorial en función del producto [▲ Leche (L), + Fórmula Láctea (FL) y □ Producto Lácteo Combinado(PLC)], B) Mapa factorial en función de las muestras (Tabla 3.1 sección 3.1.1), C) PC1, D) PC2 y E) PC3. 107

Figura 6.5 Espectros infrarrojo cercano (10000-4000 cm^{-1}) leche y productos similares respecto a la información declarada en la etiqueta. Espectro promedio A) Leche (L) y B) Fórmula láctea (FL) 108

Figura 6.6 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo cercano de leches y productos similares. A) Mapa Factorial en función del producto [▲ Leche (L) y □ Fórmula Láctea (FL)], B) Mapa factorial en función de las muestras (Tabla 3.1 sección 3.1.1), C) PC1, D) PC2 y E) PC3. 109

Figura 6.7 Espectros infrarrojo cercano (6000-4000 cm^{-1}) leche y productos similares respecto a la NOM-155-SCFI-2003. Espectro promedio A) Leche (L), B) Fórmula láctea (FL) y C) Producto Lácteo Combinado (PLC). 111

Figura 6.8 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo cercano de leches y productos similares. A) Mapa Factorial en función del producto [▲ Leche (L), + Fórmula Láctea (FL) y □ Producto Lácteo Combinado(PLC)], B) PC1 y C) PC2. 112
Figura 6.9 Análisis de Componentes Principales (ACP) de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches y productos similares. Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial y B) Vectores propios (▌PC1 y ▌PC2). Códigos de las muestras en la Tabla 6.1 (sección 6.1.1). 114
Figura 6.10. Gráfica de Cooman para la clasificación de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leche y productos similares en función de la etiqueta. A) Modelo de calibración y B) Modelo de validación. (▲ L y □ FL). 115
Figura 6.11. Gráfica de Cooman para la clasificación de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leche y productos similares según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003. A) Modelo de calibración y B) Modelo de validación. (▲ L , + FL, y □ PLC). 118
Figura 6.12 Espectros infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de muestras de leche con diferentes niveles de adulteración con grasas exógenas. 121
Figura 6.13 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo medio de leche adulterada con grasas exógenas. A) Mapa Factorial en función del nivel de adulteración [● N0 (0 %), □ N1 (25 %), ◊ N2 (50 %), ▲ N3 (75 %) y + N4 (100 %)], B) Mapa factorial en función de las muestras, C) PC1 y D) PC2. 122
Figura 6.14 Perfil de ácidos grasos (FAMES) de las grasas puras. A) grasa nativa de leche (MGT), B) aceite de coc (MGA), C) aceite de soya (MGB), D) aceite de canola (MGC) y E) grasa butírica (MGD). 124
Figura 6.15 Gráfica de Cooman para la clasificación de los perfiles de ácidos grasos FAMES de leche adulterada con grasas exógenas. A) Modelo de calibración y B) Modelo de validación cruzada [◊ N0 (0 %), □ N1 (25 %), + N2 (50 %), ▲ N3 (75 %) y N4 (100 %)]. 133
Figura 7.1 Evolución de espectros normalizados de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de queso Camembert. A) Subcorteza (SC) y B) Corazón (C) (—— d1, – – – d6, • • • • d10, – • • – d15, —— d20, — — d27). 137
Figura 7.2 Evolución de espectros normalizados de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de la Suspensión Desgrasada de Queso Camembert (DCS). A) Subcorteza y B) Corazón. (—— d1, – – – d6, • • • • d10, – • • – d15, —— d20, — — d27). 142

Figura 7.3 Evolución de espectros normalizados de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de las muestras de Grasa Purificada (PF) de la subcorteza (—— d1, – – – d6, • • • • d10, – • • – d15, —— d20, — — d27). 144

Figura 7.4 Evolución de espectros de infrarrojo medio en subcorteza durante la maduración. A) Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), B) Caseína (CN), C) Nitrógeno Soluble en Etanol (NS-EtOH) y D) Nitrógeno Insoluble en Etanol (NI-EtOH) (—— d1, – – – d6, • • • • d10, – • • – d15, —— d20, — — d27). 145

Figura 7.5. Gráficas de los Componentes Principales 1 y 3 (PC1 y PC3) del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los parámetros fisicoquímicos. A: Mapa factorial de resultados y B: Cargas de los factores. xDz: códigos de las muestras, donde x= lote y z = día de maduración, MS: materia seca, NSA: nitrógeno soluble en ácido, NNP: nitrógeno no proteico, L.A.: ácido láctico. 150

Figura 7.6. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros de queso. Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial de Subcorteza (SC), B) Mapa factorial de Corazón (C) y C) Vectores propios (—— PC1 y — — — PC2). Códigos de las muestras: x.y donde x= lote y y= día de maduración. 151

Figura 7.7. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros de Suspensión Desgrasada de queso (DCS). Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial de Subcorteza (SC) y Corazón (C) y B) Vectores propios (———— PC1 y — — — PC2). Código de las muestras SCy y Cy, donde y= días de maduración. 153

Figura 7.8. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros de la Grasa Purificada (PF). Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial y B) Vectores propios (———— PC1 y ————— PC2). Código de las muestras xSCy y xCy, donde x= lote y y= días de maduración. 155

Figura 7.9. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros del Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA). Gráficas de los tres primeros componentes, PC1 PC2 y PC3: A) Mapa factorial (SC: Subcorteza y C: Corazón) y B) Vectores propios (———— PC1, ———— PC2 y — — — PC3). Código de las muestras SCy y Cy, donde y= días de maduración. 156

Figura 7.10. Gráficos de la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) a partir de los espectros de queso. Gráficos de regresión lineal establecidos entre el tiempo de maduración real y el predicho: A) Subcorteza y B) Corazón; (– – – y ●) datos de calibración; (—— y) datos de validación. Gráficos de cargas PLS: Cargas 1 C) subcorteza y D) corazón; Cargas 2 E) subcorteza y F) corazón. 159

Figura 7.11. Gráficas de regresión lineal para la regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), establecidas entre los valores medidos y predichos. A) Materia seca (MS) en g•100 g-1 de Queso, B: Nitrógeno soluble en ácido (NSA) en g•100 g-1 de NT, C: Nitrógeno no proteico (NNP) en g•100 g-1 de NT, D: Amoniaco (NH4+) en mmol•kg-1 de MS y E) Ácido Láctico mmol•kg-1 de MS; (—— y ♦) datos de calibración; (– – –y) datos de validación.....163

Figura 7.12. Coeficientes de la regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) a lo largo de las regiones espectrales (3000-2800 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1} números de onda). A: Materia seca (MS), B: Nitrógeno soluble en ácido (NSA), C: Nitrógeno no proteico (NNP), D: Amoniaco (NH_4^+), E: Ácido Láctico (LA). 164

Figura 8.1 Evolución de espectros normalizados de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de queso Emmental con dos asociaciones bacterianas (A y B). (—— d20, – – – d27, — — d34, • • • • d51, – • • – d58, —— d65, — — FIN). 168

Figura 8.2. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros de queso Emmental. Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial y B) Vectores propios (———— PC1 y — — — PC2).....173

Figura 8.3 Bandas seleccionadas por el Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo normalizados (3000-950 cm^{-1}) de queso Emmental. Selección por el proceso de inclusión paso a paso (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05). (—— Espectro completo, ■ bandas seleccionadas).....175

Figura 8.4. Gráfica de Cooman para la clasificación de los espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) de queso Emmental. A) Modelo de calibración y B) Modelo de validación. (◊ d20, ■ d27, ▲ d34, × d51, ✳ d58, ♦ d65, □ AM).....176

Figura 8.5. Gráfica de Cooman para la clasificación de los espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) de las muestras de predicción de queso Emmental. (◊ d20, ■ d27, ▲ d34, × d51, ✳ d58, ♦ d65, □ AM).....178

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Metodologías 199
Anexo B. Leche.....204
Anexo C. Queso Camembert.....219
Anexo D. Queso Emmental.....226

Introducción

Introducción

El fenómeno de globalización de los mercados que se presenta en la actualidad ha incrementado la oferta de productos accesibles a los consumidores. Productos provenientes de todo el mundo que presentan características de calidad y composición propias y que compiten en los mercados contra los productos locales.

La dinámica de estos mercados globalizados ha generado mayor inquietud en los consumidores que exigen la certificación del origen y la calidad de los alimentos, lo que ha puesto de moda términos como inocuidad, calidad, trazabilidad y autenticidad de los productos.

La adulteración de los alimentos no es un problema nuevo, sin embargo, se ha hecho más sofisticada en tiempos recientes, siendo los alimentos o ingredientes de mayor valor comercial o de fácil adulteración los principales blancos de adulteraciones.

Se puede definir como un alimento auténtico a aquel que se ajusta a la descripción y especificaciones proporcionadas por el productor o el fabricante al momento de vender el producto. Ésta descripción es un factor importante en su precio ya que productos superficialmente similares pueden diferir marcadamente en el precio dependiendo de los ingredientes y procesos utilizados, así como su origen geográfico.

El sector lechero presenta una gran importancia socioeconómica a nivel mundial, debido a que la leche es un elemento indispensable de la nutrición humana, lo que la convierte en un producto de gran consumo. Ésta se produce y procesa sea para ser vendida como tal a los consumidores directamente o a los industriales para ser utilizada como materia prima en la elaboración de una gran variedad de productos como yogur, queso, leche fermentada, mantequilla, entre otros.

Uno de los grandes problemas que enfrenta el sector lechero en México es la adulteración de la leche debido a que por su naturaleza es un producto fácilmente adulterable. Es sabido que algunos productores e industriales desleales le adicionan productos como leche en polvo, proteínas de suero o grasas vegetales, para incrementar sensiblemente su volumen. También es sabido que en muchas ocasiones se sustituye la leche fresca con leche deshidratada reconstituida.

Estas prácticas no solo generan problemas a los consumidores, que creyendo adquirir leche pudieran estar adquiriendo productos con propiedades nutrimentales inferiores, sino que también pueden representar fraudes económicos para los industriales, y en consecuencia éstos productos pueden tener un gran impacto desfavorable en sus procesos, así como en la calidad y denominación de sus productos. Se ha demostrado que las características de la leche utilizada como materia prima tienen una gran importancia en las características organolépticas (Bertoni *et al.*, 2001; Bugaud *et al.*, 2001; Coulon *et al.*, 2004; Barcenas *et al.*, 2005), fisicoquímicas (Caridi *et al.*, 2003), así como en las propiedades de maduración (Benfeldt *et al.*, 1997; Beuvier *et al.*, 1997) de quesos madurados.

El garantizar la calidad y autenticidad de éstos productos ha sido la preocupación de muchos países quienes además de contar con normas propias, se han organizado para contar con normas internacionales. Sin embargo, muchas de las adulteraciones practicadas en éstos productos no son fácilmente detectables por los métodos de referencia establecidos en las diferentes normas.

La tarea de establecer la autenticidad o detectar la adulteración de éstos productos es muy compleja e intervienen una gran cantidad de factores tales como las diferencias entre razas de ganado, las características geoclimáticas, los diferentes procesos de manufactura empleados, entre otros, haciendo extremadamente difícil elucidar la composición química detallada y única de muchos de éstos productos.

Para poder determinar la autenticidad se requiere de contar con metodologías analíticas que permitan detectar cambios sutiles en los productos, bien sean debidos a la adición de diferentes componentes o diferenciarlos en base a las características obtenidas por los procesos y/o las propiedades asociadas a las regiones de origen.

Identificar los parámetros que marcan las diferencias entre auténtico y adulterado, tanto de la leche como materia prima como de diferentes productos lácteos procesados, permitiría utilizar estos parámetros para discriminar los productos en función de su composición, origen y/o procesos utilizados, mediante metodologías de análisis rápidas y confiables integradas en paquetes analíticos.

En la bibliografía se reporta el uso de diferentes técnicas analíticas para discriminar productos lácteos en función de diferentes parámetros como el tipo de producto (Herbert *et al.*, 2000), el origen geográfico, edad (Karoui *et al.*, 2004), los tratamientos térmicos (Feinberg *et al.*, 2006), entre otros. Entre la variedad de técnicas analíticas utilizadas con este fin, la espectroscopia de infrarrojo ha demostrado ser una técnica rápida y confiable.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo consistió por una parte, en identificar parámetros que permitan discriminar entre leche y productos similares en función de diferencias debidas a los ingredientes utilizados en su elaboración, por otro lado, en el caso de productos procesados a base de leche, se seleccionaron dos tipos de quesos madurados (Camembert y Emmental) para identificar parámetros que permitan discriminarlos en función de su madurez por los cambios en la composición que ésta involucra, implementando metodologías analíticas que permitan discriminarlos de una forma confiable.

Para lo cual se plantearon como objetivos, a) Establecer metodologías analíticas para la identificación de parámetros que permitan diferenciar entre leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado y b) Establecer metodologías analíticas para la identificación de parámetros que permitan determinar la autenticidad de dos quesos, considerada en función de su edad de maduración.

Las hipótesis planteadas fueron:

1) Si los diferentes productos agroalimentarios presentan característics que permiten al consumidor diferenciar entre ellos, y si éstas se deben a una gama de compuestos de diferente naturaleza química y que presentan concentraciones muy variables, entonces es posible establecer metodologías analíticas que permitan determinar los atributos, parámetros o descriptores que permiten diferenciar a dos de ellos;

2) Si la adición de cualquier compuesto altera la composición de un producto, entonces es posible medir ésta por el impacto que tenga en algunos sus atributos;

3) Si existen metodologías analíticas novedosas que permiten determinar parámetros composicionales muy específicos de una forma rápida, precisa y confiable en materias primas y

productos alimenticios, entonces es posible utilizar éstas para determinar los parámetros que permitan discriminar entre diferentes materias primas y productos agroalimentarios.

Para el logro de los objetivos planteados, de entre las metodologías analíticas rápidas reportadas en la bibliografía, se seleccionó la espectroscopia de infrarrojo debido a que es una técnica directa, confiable y rápida que permite determinar diferentes parámetros simultáneamente por cambios en bandas específicas. Los resultados obtenidos por esta metodología fueron comparados con los obtenidos por métodos de referencia.

La selección de quesos madurados como sujetos de estudio, para desarrollar y validar la metodología analítica a proponer, se realizó considerando que estos productos presentan un alto grado de complejidad en sus reacciones bioquímicas y de variedad compuestos generados a lo largo de la maduración, por lo que consideramos que son un buen sujeto de estudio para la identificación de sus parámetros de autenticidad. Adicionalmente, se buscó que los dos tipos de queso seleccionados presentaran características de composición, texturales y de procesos muy diferentes. El queso Camembert es un queso blando, con una maduración corta y cuya pasta no se somete a tratamientos térmicos, mientras que, el Emmental es un queso semi-duro, con una maduración larga y cuya pasta se somete a cocimiento antes del moldeo.

El presente documento presenta el trabajo de investigación realizado con la finalidad de demostrar estas hipótesis. Se presenta en tres secciones como se describe a continuación:

La Primera Sección, denominada Revisión Bibliográfica agrupa los dos primeros capítulos del documento. En el primer capítulo intitulado Antecedentes, presenta brevemente el concepto de autenticidad de alimentos y los principales criterios que la definen, algunos aspectos socioeconómicos relativos al sector lácteo en México y Francia, así como las normas mexicanas e internacionales que regulan la calidad y autenticidad de leche y quesos Camembert y Emmental. En el capítulo 2, intitulado Autenticidad de productos lácteos, se muestran los principales cambios bioquímicos de la leche durante el tratamiento térmico y de los quesos durante su maduración, además de una recopilación de los principales métodos fisicoquímicos e instrumentales utilizados para evaluar la autenticidad de éstos productos y de los principales métodos estadísticos utilizados en el tratamiento de los datos.

Enseguida, la Segunda Sección intitulada Materiales y Métodos, se presenta en tres capítulos, enfocados a cada sujeto de estudio, el capítulo 3 a leche, el capítulo 4 a queso Camembert y el capítulo 5 a queso Emmental. En cada capítulo se presentan las metodologías analíticas y/o instrumentales y sus condiciones de operación, así como las técnicas de análisis multivariado utilizadas para el tratamiento de los datos correspondientes. Se presentan también las técnicas estadísticas de análisis multivariado utilizadas para la construcción de los modelos de discriminación.

Finalmente en la Tercera Sección denominada Resultados y Discusiones, se muestran los resultados obtenidos para cada sujeto de estudio se presentandos en capítulos independientes. En el capítulo 6 se presentan los resultados obtenidos de la discriminación entre leche y productos similares, así como entre leches auténticas y adulteradas intencionalmente con grasas exógenas. En el capítulo 7 se presentan los resultados obtenidos del seguimiento de la maduración de queso Camembert mediante la evolución de los espectros de infrarrojo, así como la correlación entre la evolución espectral y la evolución de diferentes parámetros fisicoquímicos durante la maduración. En el capítulo 8 se presentan los resultados del seguimiento de la maduración de quesos Emmental mediante espectroscopia de infrarrojo

Por último, se presnentan las Conclusiones y Recomendaciones más relevantes a las que se llegó con los resultados que se presentan en la sección anterior. Se presentan los puntos más relevantes respecto a la pertinencia de los métodos estudiados en la discriminación o clasificación según los criterios establecidos para cada uno de los sujetos de estudio. Finalmente se sugieren algunos puntos importantes para continuar la investigación en está línea así como las perspectivas que se abren a la luz de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

RESUME DETAILLE EN FRANÇAIS

INTRODUCTION

Le phénomène actuel de globalisation des marchés a augmenté l'offre des produits accessibles aux consommateurs. Ces produits, provenant du monde entier, présentent des caractéristiques de qualité et composition propres et font concurrence aux produits locaux. La dynamique de ces marchés a généré l'inquiétude des consommateurs qui exigent la certification de l'origine et de la qualité des aliments.

L'adultération des aliments n'est pas un problème récent, mais elle est devenue plus sophistiquée, lorsque les aliments ou les ingrédients ont une haute valeur commerciale. On peut définir comme étant un aliment authentique celui qui correspond à la description et aux spécifications formulées par le producteur ou le fabriquant au moment de vendre le produit.

Le secteur laitier présente une grande importance socio-économique au niveau mondial, car le lait est un élément indispensable de la nutrition humaine, et un produit de grande consommation. Le lait est produit et traité pour être vendu tel quel aux consommateurs directement ou aux industriels qui l'utilisent comme matière première pour l'élaboration d'une grande gamme des produits.

Un des grand problèmes qu'affronte le secteur laitier, au Mexique, est l'adultération du lait qui, du fait de sa nature, peut être facilement adultéré. Quelques producteurs et industriels déloyaux additionnent au lait des produits comme du lait en poudre, des protéines du sérum ou de la matière grasse végétales, afin d'augmenter sensiblement son volume. En plusieurs occasions, du lait déshydrate reconstitué est substitué au lait frais.

Ces pratiques trompent les consommateurs, qui en croyant acheter du lait peuvent acheter des produits avec des propriétés nutritionnelles inférieures, mais aussi représentent des fraudes économiques pour les industriels. En conséquence, les produits correspondants peuvent avoir un impact défavorable sur la qualité et la dénomination des produits finis fabriqués à partir de ces

laits. Il a été démontré que les caractéristiques du lait utilisé comme matière première ont une grande importance sur les caractéristiques organoleptiques (Bertoni *et al.*, 2001; Bugaud *et al.*, 2001; Coulon *et al.*, 2004; Barcenas *et al.*, 2005), physico-chimiques (Caridi *et al.*, 2003), et aussi sur les propriétés de maturation (Benfeldt *et al.*, 1997; Beuvier *et al.*, 1997) des fromages affinés.

Garantir la qualité et l'authenticité de ces produits a été une préoccupation de plusieurs pays qui, en plus d'avoir des normes propres, se sont organisés pour avoir des normes internationales. Cependant, beaucoup des adultérations pratiquées dans ces produits ne sont pas facilement détectables par les méthodes de référence établies dans les différentes normes.

Etablir l'authenticité d'un produit ou détecter des adultérations dans ces produits est très un tache complexe et beaucoup de facteurs interviennent, comme les différences entre races de bétail, les caractéristiques géo climatiques, les différents procédés de fabrication utilisés.

Être capable de déterminer l'authenticité requiert des méthodologies analytiques qui permettent de détecter des changements subtils dans la composition des produits, dus à l'addition de différents constituants, ou de différencier les produits sur la base de caractéristiques résultant de leur transformation et/ou de propriétés associées aux régions d'origine.

Identifier les paramètres analytiques marquant les différences entre authentique et adultéré, pour le lait, considéré comme matière première, ainsi que pour différents produits laitiers transformés, permettrait utiliser ces paramètres pour authentifier les produits en fonction de leur composition, de leur origine et/ou des procédés de transformation utilisés. De plus l'usage, à cet effet, de méthodologies analytiques rapides et fiables est requis.

La bibliographie rapporte l'utilisation de différentes techniques analytiques pour discriminer les produits laitiers en fonction de différentes paramètres comme le type de produit (Herbert *et al.*, 2000), l'origine géographique, l'âge (Karoui *et al.*, 2004), les traitements thermiques subis (Feinberg *et al.*, 2006),. Parmi les techniques analytiques utilisées dans ce but, la spectroscopie infrarouge s'est montré être une technique rapide et fiable.

L'objectif de ce travail a été double :

- identifier les paramètres qui permettent discriminer le lait de produits similaires adultérés, en fonction des différents constituants utilisés pour ce faire,
- dans le cas des produits laitiers transformés, deux types de fromage affinés (Camembert et Emmental) ont été analysés pour identifier des paramètres qui permettent de les discriminer en fonction de leur maturité,

Nos objectifs ont consisté a :

(i) Établir des méthodologies analytiques pour l'identification des paramètres qui permettent de différentier entre lait, formule lactée et produit laitier combiné ;
(ii) Établir des méthodologies analytiques pour identifier des paramètres qui permettent de déterminer l'authenticité de deux fromages, en fonction de l'avancement de leur maturation.
Les principales hypothèses de travail sont les suivantes.

1) Si les différents produits agroalimentaires présentent des attributs qui permettent au consommateur de les différentier, et si ces attributs sont dus à une gamme de composés de différente nature chimique, qui présentent des concentrations très variables, alors il est possible d'établir des méthodologies analytiques pour déterminer les attributs, les paramètres ou les descripteurs qui permettent les différentier ;

2) Si l'addition d'un composé quelconque change la composition d'un produit, alors il est possible de mesurer cette addition par l'impact qu'il a sur les attributs de ce produit ;

3) S'il existe des méthodologies analytiques nouvelles qui sont capables de mesurer des paramètres de composition très spécifiques, d'une façon rapide, précise et fiable dans les matières premières et les produits alimentaires, alors il est possible d'utiliser ces méthodologies analytiques pour déterminer les paramètres de composition qui permettent de discriminer différentes matières premières et différents produits transformés.

Pour atteindre ces objectives, parmi les méthodologies analytiques rapides mentionnées dans la bibliographie, nous avons sélectionné la spectroscopie infrarouge qui est une méthode directe, fiable et rapide, permettant de déterminer différents paramètres de façon simultanée sur différentes bandes spécifiques. Les résultats obtenus avec cette méthode ont été comparés avec

ceux obtenus par des méthodes de référence (profil des acides gras, évolution des fractions azotées, lactose, lactate, etc.).

La sélection des fromages affinés comme sujet d'étude, pour développer et valider la méthodologie analytique proposée, a été effectuée en considérant que ces produits présentent un haute degré de complexité du fait des réactions biochimiques intervenant pendant l'affinage et de la variété des composés qui sont alors générés. On a également fait en sorte que le deux types des fromages sélectionnés présentent des caractéristiques de composition, de texture différentes, et soient issus de procédés de fabrication bien différentiés. Ainsi, le Camembert est un fromage à pâte molle, dont l'affinage est court (environ 4 semaines) et dont la pâte n'est pas soumise à un quelconque traitement thermique, tandis que, l'Emmental est un fromage à pâte pressée cuite, avec un affinage long (plusieurs mois) dont la pâte est soumise à thermisation avant moulage.

PREMIÈRE SECTION. Révision Bibliographique

Chapitre 1. Antécédents

Malgré la nouveauté des termes comme qualité, sécurité, traçabilité et authenticité, l'adultération des aliments n'est pas un problème récent, mais il est devenu plus aigu dans les dernières années.

Il y a différents critères qui interviennent dans la définition de l'authenticité d'un produit. Les principaux font référence à la description figurant sur l'étiquette, tel que l'origine géographique, sa nature, sa définition, ainsi qu'aux espèces ou variétés des ingrédients utilisés , voire aux procédés de fabrication.

Le lait est un produit qui, du fait de ses propriétés nutritives, est considéré, par des organisations internationales telles que la FAO et l'UNESCO (SAGARPA, 2006), comme un produit de base dans l'alimentation humaine, principalement celle des enfants. En 2005, la production mondial du lait de vache a été de 239 millions de tonnes. L'Inde est le principal producteur mondial avec le 15 % de la production totale, tandis que le Mexique et la France représentent seulement 3 % et 2 % de cette production (FAO, 2006a). Dans les pays développés, des grands volumes du lait sont produits. Ils se traduisent par des excédents qui sont commercialisés sur le marché international grâce à des subventions (SAGARPA, 2006).

Le Mexique, comme nombre d'autres pays sous-développés, ne sont pas autosuffisants par rapport à la production du lait. Ils doivent recourir à l'importation de divers sous-produits laitiers pour couvrir la demande. En 2004, Mexique a importé 175 985 tonnes du lait en poudre, dont le 80,5 % de lait écrémé. De plus, le Mexique importe une grande quantité de sous-produits tels que le lactosérum déshydraté et le lactose, 57 514 tonnes et 22 833 tonnes en 2004, respectivement (FAO, 2006b).

Dans le monde, à partir du lait, s'élabore une grande variété de produits, parmi lesquels se distinguent les fromages. La France est un pays qui se caractérise par la grande variété de ses fromages. En 2002, la production totale du fromage en France a été de 1 790 000 tonnes, tandis qu'au Mexique elle a été de 158 861 tonnes seulement (FAO, 2003).

Étant donné l'importance socio-économique du lait et les produits laitiers, ainsi que l' exigence croissante des consommateurs, plusieurs pays et organisations internationales ont publié des normes que permettent garantir la qualité, la sécurité et l'authenticité de ces produits.

En Mexique, on commercialise en plus du lait, des produits semblables à celui-ci, catalogués comme « formule lactée » et « produit laitier combiné » (NOM-155-SCFI-2003, 2003), en fonction de leurs ingrédients. Cependant, la normalisation n'oblige pas les producteurs à vérifier la teneur de ses produits

Le Camembert est un fromage originaire de Normandie (France). Le Codex Alimentairus (C-33-1973, 1973) le définit comme un fromage à pâte molle, non friable, avec une croûte recouverte uniformément de moisissures blanches, fabriqué à partir de lait de vache. Son affinage se fait en cave spéciale (hâloir) à une température comprise entre 10 ºC et 14 °C pendant 10 à 14 jours, suivi d'un stockage après emballage à des températures inférieures (4 °C) .

L'Emmental, originaire de Suisse, est un fromage á pâte dure, de couleur ivoire à jaune clair, avec des trous régulières, élaboré à partir du lait de vache (C-9-1967, 1967). Son affinage se fait en cave, à des températures successives comprises entre 10 ºC et 25 ºC. Le fromage est prêt à la consommation quand lorsqu'il est âgé de 60 jours minimum à partir de la date de fabrication.

Les méthodes décrites par la norme (NOM-155-SCFI-2003, 2003) servent á vérifier la qualité du lait, des formules lactées et des produit laitiers combinés en mesurant les teneurs en

protéine, matière grasse, lactose, etc…, mais elles ne permettent pas vérifier l'origine de ces composés. D'un autre côté, les normes C-9-1967 (1967) et C-33-1973 (1973) établissent les limites acceptables de la teneur en matière grasse, extrait sec et humidité, mais ne font pas référence aux méthodes permettant de les évaluer.

Pouvoir déterminer si un produit correspond à la dénomination, région d'origine, âge, traitement thermique déclarés requiert la mise en œuvre de méthodologies analytiques spéciales que permettent de déterminer d'une manière fiable les différences entre les produits et/ou leur composition chimique d'une façon détaillé.

Chapitre 2. Authenticité des produits laitiers

Par rapport à d'autres aliments, le lait est remarquablement stable à la chaleur, ce qui permet l'élaboration d'une gamme des produits stérilisés thermiquement, néanmoins ces traitements induisent des réactions qui ont une influence sur la composition et les propriétés nutritionnelles des produits finis (Anema y McKenna, 1996). Une des plus importantes réactions est la dénaturation des protéines, dont celles du sérum, les plus thermo sensibles. Le degré de dénaturation dépend de la protéine, du traitement thermique et du pH du milieu (Anema y McKenna, 1996).

Dans la fabrication des fromages, principalement pendant l'affinage, des réactions biochimiques comme la protéolyse, la glycolyse et la lipolyse, provoquent des changements de composition et la formation de composés d'arômes qui interviennent dans les propriétés organoleptiques. Pendant la protéolyse, l'hydrolyse enzymatique des caséines produit une gramme de composés, de tailles moléculaires différentes, allant de gros peptides jusqu'au acides aminés libres (Fox et McSweeney, 1996; McSweeney et Sousa, 2000; Sousa *et al.*, 2001). Les cinétiques d'hydrolyse et les profils des composés générés sont caractéristiques de chaque type de fromage (Hasouna *et al.*, 1996; Gagnaire *et al.*, 2001). Pendant la glycolyse, le lactose est transformé en lactate, métabolisé à son tour en d'autres composés comme des acides organiques ainsi qu'en CO_2 et H_2O (McSweeney y Sousa, 2000). Pour les fromages affinés, comme le Camembert, ensemencés avec des flores spécifiques (*Kluyveromyces lactis, Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti*), ce phénomène est très important. Il influence la texture, par

des modifications en la solubilité des caséines, et affecte les croissances microbiennes et les activités enzymatiques (McSweeney, 2004).

Les triglycérides sont hydrolysés en mono- et di-glycérides et en acides gras libres (AGL) (McSweeney et Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2003). Même si ce phénomène n'a pas été signalé comme un index significatif de maturation, il a une forte influence sur le développement de la saveur et de l'arôme du fromage (McSsweeney et Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2003; Mallatou *et al.*, 2003).

La composition du lait et des produits laitiers est évaluée par des méthodes de référence (Nom-155-Scfi-2003, 2003) qui visent à déterminer la concentration des principaux constituants des matrices.

Ainsi, les sucres, acides organiques, matières azotées, matières grasses ainsi que les phénomènes de protéolyse, glycolyse et de lipolyse sont évalués généralement par des méthodes physico-chimiques (Ardö et Polychroniadou, 1999). La protéolyse est évaluée par la mesure de différentes fractions azotées (méthode Kejdhal) obtenues par précipitations sélectives (Christensen *et al.*, 1991). Le degré de lipolyse est évalué en mesurant l'acidité de la fraction lipidique (Evers, 2003) et la glycolyse en quantifiant le lactose résiduel et le lactate produit (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004). Ces méthodes ont été décrites pour différents fromages comme le Camembert (Schlesser *et al.*, 1992; Engel *et al.*, 2001; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004), le Ragusano (Fallico *et al.*, 2004) et le Prato (Gorostiza *et al.*, 2004).

Pour obtenir une caractérisation plus détaillée de la composition (caséines, peptides, acides aminés, matières grasses) du lait et des fromages, des techniques séparatives, telles que l'électrophorèse, la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse (CG) (Acuña *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2003), sont mises en œuvre. Le profil en acides gras du lait a été utilisé pour différencier des laits produits à des altitudes différentes. Ainsi, Collomb *et al.* (2002) ont observé des différences significatives dans les profils des acides gras des laits produits au niveau de la mer ou en montage. Par ailleurs, Destaillats *et al.* (sous presse) ont décrit l'utilisation du profil des triglycérides pour la détection de l'adultération de la matière grasse du lait par des huiles végétales partiellement hydrogénées. Pour déterminer l'origine géographique de fromages de type Emmental, différents profils de composition, comme

celui des acides gras libres (AGL), des triglycérides (Pillonel *et al.*, 2002), mais aussi des profils des composés volatiles (Pillonel *et al.*, 2003a) ont été utilisés.

Tous ces résultats sont obtenus à partir de la mise en œuvre de plusieurs méthodes analytiques et/ou à partir de méthodes lourdes. Ces mesures multiples prennent du temps et ne permettent pas d'accéder rapidement à la composition de la matrice dont la connaissance permettrait, par exemple, de vérifier l'identité du produit, sa qualité, son origine ou encore son niveau de transformation lors d'un affinage.

La spectroscopie infrarouge (IRTF) est une méthode directe, fiable et rapide qui permet d'obtenir des informations spécifiques sur différents paramètres simultanément, principalement dans la région spectrale 3000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} puisque les bandes d'absorption y sont associées aux vibrations des groupes fonctionnels des molécules (Karoui *et al.*, 2005b). Cette technique est utilisée pour quantifier les protéines, les matières grasses et le lactose dans le lait et les produits laitiers (Chen *et al.*, 1998; Grappin *et al.*, 2000; Wust et Rudzik, 2003). La réponse des protéines entre 1700 cm^{-1} et 1500 cm^{-1}, associée à la liaison peptidique (CO-NH), est très sensible à la conformation adoptée par ces molécules. Pour les matières grasses, les régions d'absorption sont bien connues, chaînes acyle à 3000 cm^{-1} - 2800 cm^{-1}, celle associée avec les esters à 1800 cm^{-1} - 1700 cm^{-1}, et différentes bandes dans la zone 1243 cm^{-1} -1110 cm^{-1} associées avec l'élongation des liaisons C(O)-O et C-O (Riaublanc *et al.*, 2000). Le spectre du lactose fait apparaître des bandes dues à l'élongation de la liaison C-O et la déformation du O-H dans la région 1112-1050 cm^{-1} (Grappin *et al.*, 2000). La réponse du lactate à 1575 cm^{-1} est caractéristique de l'ion carboxylate (Picque *et al.*, 1993; Mazerolles *et al.*, 2001).

Étant donné qu'en spectroscopie infrarouge, les liaisons chimiques présentes dans une molécule produisent des bandes spécifiques, il doit être possible de l'utiliser pour déterminer la composition de produits comme le lait et des changements de composition, comme ceux intervenant lors de l'élaboration des produits laitiers, par exemple l'affinage des fromages.

Pour évaluer l'affinage du fromage Cheddar, Chen *et al.* (1998) ont corrélé les teneurs en matières grasses et protéines mesurées par des méthodes classiques avec les aires intégrées des pics d'absorbance des spectres infra rouge dans les régions 1765 cm^{-1} - 1730 cm^{-1} (matière grasse), 1690 cm^{-1} - 1620 cm^{-1} (Amide I, protéine) et 1570 cm^{-1} - 1535 cm^{-1} (Amide II, protéine).

Ils concluent que la spectroscopie IR peut être une technique appropriée pour caractériser les fromages pendant l'affinage. Guerzoni *et al.* (1999) ont étudié les effets de différents traitements du lait sur l'affinage de fromage de chèvre. La spectroscopie infrarouge a permis de montrer que les cinétiques d'évolution des peptides solubles (1700 cm^{-1} à 1330 cm^{-1}), des acides grasses libres (1740 cm^{-1}, 1160 cm^{-1} et 1100 cm^{-1}), de l'acide lactique (1740 cm^{-1}) et des sucres (1300 cm^{-1} - 1000 cm^{-1}) étaient différentes selon le lait mis en oeuvre. Vannini *et al.* (2001) ont évalué la pertinence de la spectroscopie infrarouge pour le suivi de l'activité protéolytique des différentes souches de *Yarrowia lipolytica* en mesurant les changements spectraux intervenant dans les régions Amide I et Amide II. Plus récemment, Lanciotti *et al.* (2005) ont mesuré le potentiel de quatre souches de *Y. lipolytica* comme levains d'affinage. L'activité protéolytique de ces souches a été évaluée dans les zones spectrales Amide et lipidique. Récemment, Rodriguez-Saona *et al.* (2006) ont montré le potentiel de la spectroscopie infrarouge, couplée avec de la réflexion totale atténue (ATR-IRTF), à fournir de bonnes estimations de l'humidité, des matières grasses et des protéines de fromages suisses.

Les méthodes statistiques multi variées ont pris une grande importance pour la discrimination de produits car elles permettent d'extraire les informations pertinentes dans de grandes bases de données. Van de Voort *et al.* (1992) ont développé un modèle de régression par les moindres carrés partiels (PLS) pour quantifier l'extrait sec, la matière grasse, les protéines et le lactose à partir des spectres infrarouge du lait. En utilisant la régression PLS sur les composantes principales (RPC) des spectres moyen infrarouge de lait, Luinge *et al.* (1993) ont déterminé les teneurs en matière grasse, en protéine et en lactose. En associant les valeurs du pH, de d'activité de l'eau (a_w), de la matière sèche et les teneurs des fractions azotées dans un modèle PLS, García Ruiz *et al.* (1998) ont prédit le temps d'affinage des fromages Manchego affinés pendant 60 à 150 jours avec une erreur moyenne de 10,3 jours. En utilisant l'ACP, Hynes *et al.* (2003) ont discriminé des fromages Reggianito Argentino à différents degrés d'affinage grâce aux profils peptidiques de la fraction d'azote soluble dans l'eau. Pillonel *et al.* (2003a) ont discriminé des fromages Emmental en fonction de la région de production en utilisant les concentrations en certains acides aminés libres (asparagine, glycine, lysine, phénylalanine et proline), ainsi que deux fractions caséiques. Poveda *et al.* (2004b) ont montré par PLS, que le pH, l'activité de l'eau (a_w), et la matière sèche sont les variables les plus importantes pour prédire le temps de maturation de fromages Manchego. Les meilleures résultats pour différentier l'âge de

fromage Ragusano ont été obtenus par une combinaison des données analytiques de profils des peptides et d'acides aminés avec une régression PLS (Fallico *et al.*, 2004)

Dufour *et al.* (2000) ont décrit l'utilisation de l'ACP des spectres infrarouge des fromages (région 3000-2780 cm^{-1}) pour évaluer les modifications d'état des triglycérides. Mazerolles *et al.* (2001), en utilisant la même méthode statistique, ont identifié des bandes spécifiques dans la zone Amide I et Amide II qui ont permis de discriminer entre différents états de maturation des fromages. Karoui *et al.* (2003) ont publié une synthèse des différentes méthodes chimiométriques qui peuvent être utilisées pour analyser des données spectroscopiques et les corréler avec les informations chimiques, physiques, avec d'autres informations spectrales ou pour extraire des informations sur la structure moléculaire des protéines et matières grasses. Karoui *et al.* (2006d) ont appliqué l'ACP aux spectres MIR (3000-900 cm^{-1}) et VIS-NIR (315-1700 nm) des fromages à pâte molle pour discriminer entre les procédés d'élaboration et les zones d'échantillonnage. Coker *et al.* (2005) concluent, de leur étude sur l'évaluation de la maturité des fromages, qu'il n'existe pas de combinaison pré définie entre méthodes analytiques et statistiques qui puisse être recommandée pour chaque situation.

Skeie *et al.* (2006) ont développé des modèles PLS pour prédire la concentration de quelques acides aminés à partir des spectres NIR des fromages norvégiens. La teneur en azote non protéique (NNP) et en azote soluble dans l'eau (WSN) ainsi que le pH ont été prédits avec une bonne précision à partir des spectres moyen infrarouge (MIR) d'Emmental européens produits en été (Karoui *et al.*, 2006b) et en hiver (Karoui *et al.*, 2006c). Les teneurs en matière grasse et azote total (NT) ont été estimées avec une précision plus faible, mais les résultats ont été améliorés en utilisant les spectres PIR (Karoui *et al.*, 2006a).

DEUXIÈME SECTION. Matériel et Méthodes

Chapitre 3. Lait

Le travail expérimental avec le lait a été réalisé en deux étapes. Dans la première, des méthodologies analytiques qui permettaient de discriminer le lait de produits similaires, de composition différente, ont été sélectionnées. La spectroscopie infrarouge à été retenue. Les résultats ainsi obtenus ont été comparés avec ceux du profil des acides gras (FAMES) qui est une méthode de référence (NOM-155-SCFI-2003) pour la caractérisation de la matière grasse du lait.

Dans la deuxième étape, ces méthodes ont été utilisées pour étudier la discrimination des échantillons de laits adultérés intentionnellement avec des matières grasses exogènes.

ÉCHANTILLONS

Pour effectuer une discrimination entre le lait et les produits similaires, 21 échantillons de produits UHT différents ont été achetés sur le marchés local, en considérant leur teneur en matière grasse et en carbohydrates, ainsi que la définition portée sur l'étiquette (NMX-026-1997-SCFI) (Tableau 3.1). Selon l'étiquette et la norme NOM-155-SCFI-2003, 16 échantillons correspondaient à du lait (L), 4 à des produits laitiers combinés (PLC) et 1 à une formule laitière (FL). Les échantillons ont été stockes a 18 ºC avant d'être analysés.

Les échantillons de lait soumis à une adultération des matières grasses exogènes sont des laits de vache UHT, sans matière grasse. Les échantillons ont été additionnés de mélanges de matières grasses selon un plan de expériences comportant 5 types de matières grasses (matière grasse native du lait (MGT), huile de noix de coco (MGA), huile de soja (MGB), huile de canola (MGC) et matière grasse butyrique (MGD) et 5 niveaux d'adultération (0 %, 25 %, 50 %, 75 % et 100 %, niveaux 0-4). La MGT avait une teneur de 42 % de matière grasse.

ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

Les échantillons ont été analysés par spectroscopie infrarouge (IRTF) dans les régions du moyen infrarouge (MIR) (4000-400 cm^{-1}) et du proche infrarouge (PIR) (10000-4000 cm^{1}). Pour chaque échantillon, 5 spectres ont été obtenus dans chaque région spectrale par réflexion totale atténue (ATR), avec une cellule horizontale de ZnSe (45º et 12 réflexions). Chaque spectre a été la moyenne de 200 lectures, avec une résolution de 4 cm^{-1} (espacement des donnes 1,928 cm^{-1}) et, dans tous les cas, le spectre de l'eau a été soustrait.

PROFIL DES ACIDES GRASES (FAMES)

Afin d'obtenir les profils des acides gras (FAMES), la matière grasse des échantillons a été purifiée selon la méthode au chloroforme-méthanol décrite par Folch *et al.* (1957). Les méthyles esters des acides gras ont été obtenus par trans estérification avec du méthoxide de sodium.

Les FAMES ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les composés ont été séparés avec une colonne HP-23 (50 % cyanopropil, 50 % methyl polyxilosane) de 60 m x 250 μm x 0,25 μm. Pour la quantification avec standardisation externe, 35 composés ont été calibrés. La corrélation minimale obtenue se caractérise par un cœfficient R supérieur à 0,999, excepté pour les acides élaidique (R = 0,997), nervonique R = 0,9951) y eicosapentaenoique (R = 0,995). La quantification des FAMES non inclus dans la calibration a été fait en utilisant des acides gras de poids moléculaire proche. L'identification des composés non calibrés a été faite par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur de mass (MS) et dans les mêmes conditions que celles de la quantification.

ANALYSE STATISTIQUE

Les données obtenues par les deux méthodes (infra rouge et FAMES) ont été analysées par des méthodes statistiques multivariées afin d'obtenir des modèles qui permettent de différencier les échantillons.

L'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse discriminante générale (ADG) ont été appliquées aux profils FAMES des échantillons de laits et de produits similaires, ainsi qu'aux échantillons de laits adultérés avec des matières grasses exogènes.

L'analyse discriminante des profils spectraux du lait, des produits similaires et des laits adultérés a été appliquée séparément pour chaque région spectrale et pour chaque critère de classification. Les spectres ont été analysés directement sans correction.

Pour la discrimination entre les échantillons de lait et de produits similaires, la base de données a été divisée en deux groupes, le groupe de calibration (11 échantillons) et le groupe de validation croisée (10 échantillons).

Pour l'adultération avec des matières grasses exogènes, les modèles ont été construits en considérant la présence d'adultération (authenticité) et les niveaux d'adultération pour chaque type de matière grasse, de façon individuelle et pour l'ensemble des profils. Les données ont été séparées en deux groupes : un de calibration (8 échantillons MGA, 6 MGB, 7 MGC, 7 MGD et 25 pour l'ensemble), un de validation croisée 7 échantillons de MGA, 6 de MGB, 7 de MGC, 7 de MGD et 22 pour l'ensemble). Afin de diminuer la taille du modèle, les composés

discriminants les plus significatifs ont été sélectionnés par la procédure pas à pas ascendant ou descendent selon le cas (P inclusion 0,05 ; P exclusion 0,05).

Chapitre 4. Camembert

Les échantillons de fromages proviennent de deux productions de fromages à pâte molle et croûte fleurie de type Camembert réalisées à l'échelle pilote, sous conditions aseptiques, en utilisant la méthode décrite par Leclercq-Perlat *et al.* (2004). Après salage (jour 1), les fromages ont été transférés dans une chambre d'affinage de 1 m^2 et ils sont maintenus à 13°C ± 1°C et sous une humidité relative du 85 % ± 2 % (HR) pendant 24 h. À partir du deuxième jour (noté d2), l'humidité a été portée à 95 % ± 2 % et est maintenue ainsi jusqu'au j15. A j15, les fromages ont été emballés et conservés à 4 ºC jusqu'au j27.

Pour chaque production, un fromage entier a été prélevé dans la chambre d'affinage chaque jour de j1 et j10. Par la suite, un fromage a été prélevé à j13, j15, j17, j20 et j27. Les fromages sont conditionnés en utilisant la méthode décrite par Leclercq-Perlat *et al.* (2004). Une croûte de 3 mm a été éliminée et le fromage a été coupé horizontalement pour obtenir deux sections, le cœur (C) qui est la section centrale et la sous croûte (SC) qui correspond à la section entre la croûte et le cœur. Les deux sections ont été analysées par des méthodes physicochimiques et spectroscopiques.

ANALYSES PHYSICOCHIMIQUES

Sur les échantillons de sous croûte sont déterminés le pH, la matière sèche (MS), le lactose et l'acide lactique (Leclercq-Perlat *et al.,* 1999), les fractions azotés comme l'azote soluble en milieu acide (NSA), l'azote non protéique (NNP), l'ammoniac (NH_4^+) et l'azote total (NT) (Leclercq-Perlat *et al.*, 2000). Le lactose et l'acide lactique ont été mesurés aussi dans les échantillons de cœur.

ANALYSES SPECTROSCOPIQUES

Les échantillons des sections cœur et sous croûte des fromages ont été analysés par spectroscopie infrarouge (IRTF) directement ou après fractionnement selon la méthode décrite par Kuchroo et Fox (1982) et Christensen *et al.* (1991). Ainsi, des fractions plus spécifiques sont

obtenues: suspensions de fromages dégraissés (DCS), azote soluble à l'acide (NSA), caséine (CN), azote soluble (NS-EtOH) et insoluble (NI-EtOH) dans l'éthanol à 70 %. Pour la dissolution des fromages, la méthode de Kuchroo & Fox (1982) a été légèrement modifiée: 10 g du fromage ont été dissous dans 20 mL d'eau dés ionisée. Par ailleurs, le précipité d'azote insoluble dans l'éthanol (NI-EtOH) a été dissous dans 2 mL de tampon 50 mM (pH 7,5) Tris-HCl (Tris-(hydroxyméthyl-aminométhane) contenant 1 mM EDTA (acide Ethylènediamine-Tétraacétique). La matière grasse non purifiée (PF) a été purifiée par la méthode décrite par Anderson *et al.* (1974) puis conservée à -20 ºC.

Les différentes fractions obtenues (PF, CN, DCS, NSA, NS-EtOH et NI-EtOH) ont été analysées par spectroscopie moyen infra rouge dans la région 4000 cm^{-1} -400 cm^{-1}. La mesure a été réalisée sur un cristal de réflexion totale atténue (ATR) horizontale de ZnSe (45º et 12 réflexions). Chaque spectre est la moyenne de 32 lectures avec une résolution de 4 cm^{-1} (espacement des données 1,928 cm^{-1}) et le spectre du cristal de ZnSe a été soustrait. A chaque spectre, le spectre de l'eau a été soustrait par la méthode décrite par Powell *et al.* (1986) et Dousseau *et al.* (1989). La correction de la ligne de base a été réalisée manuellement en 6 points du spectre, 3000 cm^{-1}, 2850 cm^{-1}, 1800 cm^{-1}, 1700 cm^{-1}, 1490 cm^{-1} et 950 cm^{-1}.

ANALYSES STATISTIQUES

Avant de réaliser les analyses statistiques, les spectres des fromages, PF et DCS ont été normalisés. Toutes les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel STATISTICA version 6 (StatSoft, France).

Des tableaux de corrélations ont été établis entre les différentes données physicochimiques. L'ANOVA a été réalisée pour chaque groupes de spectres des fromages et des fractions afin d'identifier les bandes d'absorbance présentant les changements les plus significatifs pendant l'affinage ($p \leq 0,05$).

L'analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée aux données physicochimiques et spectrales, séparément, afin d'évaluer l'évolution de la matrice pendant l'affinage.

Deux régressions par les moindres carrés partiels (PLS) ont été faites. La première avait pour objectif de prédire le temps d'affinage, la deuxième pour établir les modèles de régression entre les données physicochimiques et spectroscopiques. Dans la première analyse sont utilisés les données spectrales des sections cœur et sous croûte de fromages. Les spectres ont été séparés en un groupe de calibration (17 échantillons) et un groupe de validation croisée (8 échantillons). Dans la deuxième analyse, les données spectrales de sous croûte ont été utilisées en combinaison avec les résultats physicochimiques obtenus pour la même section. Les données ont été séparées en un groupe de calibration avec 17 échantillons pour pH, MS, NSA, NNP, et NH_4^+ et 33 échantillons pour le lactose et l'acide lactique ; et un groupe de validation croisée avec 8 échantillons pour pH, MS, NSA, NNP, et NH_4^+ et 16 échantillons pour le lactose et l'acide lactique. Le nombre des facteurs a été déterminé en utilisant la valeur minimale du PRESS. La qualité des modèles a été évaluée à partir des valeurs des coefficients de détermination R^2, et les erreurs standard calculées pour les ensembles de calibration (SEC) et de validation croisée (RMSECV).

Chapitre 5. Emmental

Les échantillons analysés proviennent de fromages Emmental élaborés par l'Institut Technique Français des Fromages (ITFF). Ils ont été élaborés la même semaine, à partir de lait thermisé à 63 ºC pendant 30 s. Après le salage, les fromages ont été pré affinés pendant 20 jours dans une cave à 8-10 ºC. À partir du jour 20 (j20), les fromages ont été placés dans une cave tempérée entre 15 ºC et 16 ºC. A j34, les fromages ont été transférés à 22-23 ºC , sous une humidité relative variant entre 84 % et 86 % pendant 40 jours approximativement, jusqu'à l'ouverture des meules. Puis, les fromages ont été conservés dans une cave froide à 6 ºC pendant 15 jours.

Pour chaque fromage, un échantillon de 15 à 20 g a été prélevé à l'entrée dans les caves, puis à différents temps (Tableau 5.1). Ces échantillons ont été coupés longitudinalement pour obtenir des segments à analyser par spectroscopie infrarouge/ATR.

ANALYSE SPECTROSCOPIQUE

Les échantillons du fromage ont été analysés directement par spectroscopie moyen infra rouge dans la région 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1}. Les méthodologies d'obtention et de correction des spectres sont identiques à celles décrites pour le fromage Camembert.

ANALYSES STATISTIQUES

Avant de réaliser les analyses statistiques, les spectres ont été normalisés en considérant 4 régions de normalisation : 3030-2750 cm^{-1}, 1800-1700 cm^{-1}, 1700-1490 cm^{-1} et 1490-950 cm^{-1}. Une fois normalisés, les spectres des différentes régions spectrales ont été regroupés dans la même base de données. Les analyses statistiques ont été faits avec le logiciel STATISTICA version 6 (StatSoft, France).

L'ANOVA a été fait pour chaque groupe des spectres afin d'identifier les bandes qui montraient les changements les plus significatifs pendant l'affinage ($p \leq 0,05$), en considérant comme facteur le temps d'affinage.

L'analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée à la collection de spectres normalisés afin d'évaluer leur évolution pendant l'affinage.

L'analyse discriminante générale (ADG) a été appliquée à la collection des données spectrales afin d'évaluer le potentiel de la spectroscopie infrarouge pour discriminer les échantillons d'Emmental en fonction de son état d'affinage. La collection des données a été divisée en trois groupes, le groupe de calibration (34 échantillons), le groupe de validation croisé (14 échantillons) et le groupe de prédiction (14 échantillons). Les distances de Mahalanobis au carré et leurs niveaux de signification ($p<0,05$) ont été calculés.

TROISIÈME SECTION. Résultats et Discussions

Chapitre 6. Lait
LAITS ET PRODUITS SIMILAIRES

Analyse Spectrale Moyen Infrarouge

L'analyse discriminante (ADG), appliquée aux spectres infrarouges du lait et de produits similaires, a permis de les discriminer selon l'information figurant sur les étiquettes (cas des laits (L) et des formules laitières (FL)) et selon les critères de la NOM-155-SCFI-2003 (cas des laits (L), des produits laitiers combinés (PLC) et des formules laitières (FL)).

Pour la discrimination selon l'information des étiquettes, la meilleure discrimination a été obtenue dans la région 3000-950 cm^{-1}. Le plan factoriel (Figure 6.2A et B) défini par les composants PC1, PC2 et PC3, qui expliquent respectivement 79,4 %, 8,9 % et 5,8 % de la variance totale, rend possible la séparation de deux groupes bien définis, un pour les échantillons L, et l'autre pour les échantillons FL. Le modèle discriminant a permis classifier correctement 95,14 % des échantillons (Tableau 6.1). Tous les spectres L ont été classés correctement, tandis que pour les spectres FL seulement 88 % des spectres ont été classés correctement.

Pour la discrimination selon les critères de la NOM-155-SCFI-2003, la meilleure discrimination a été obtenue dans la région 3000-950 cm^{-1}. Le plan factoriel (Figure 6.4A et B), défini par les composants PC1, PC2 et PC3 (qui expliquent 74,7 %, 8,7 % et 8,8 % de la variance totale, respectivement), a permis séparer trois groupes. La principale séparation est obtenue par une combinaison de PC1 et PC2. Les vecteurs propres PC1, PC2 et PC3 (Figure 6.4C-E) ont montré le même profil que les vecteurs calculés pour le modèle discriminant selon l'information de l'étiquette. Le modèle discriminant entre L, PLC et FL a permis de classer correctement 95,25 % des spectres selon la définition de la norme NOM-155- SCFI-2003 (Tableau 6.2). Le modèle a classé correctement tous les spectres L et FL, mais seulement 75 % des spectres PLC.

Analyse Spectrale Proche Infrarouge

Pour la discrimination selon l'étiquette, la meilleure discrimination a été obtenue dans la région 10000-4000 cm^{-1}. Le plan factoriel (Figure 6.6A et B) défini par les composants PC1, PC2

et PC3, qui expliquent respectivement 75,4 %, 10,2 % et 5,0 % de la variance totale, n'a pas permis de séparer complètement les deux groupes d'échantillons. Les vecteurs propres (Figure 6.6 C et E) n'ont pas montré des bandes spécifiques que puissent être associées aux principaux groupes compositionnels. Le modèle discriminant a montré des résultats inférieurs à ceux obtenus dans la région MIR, car il a permis de classer correctement seulement le 75,2 % des échantillons (Tableau 6.3).

Pour la discrimination selon les critères de la NOM-155-SCFI-2003, la meilleure discrimination a été obtenue dans la région 6000-4000 cm^{-1}. Le plan factoriel (Figure 6.8A) défini par les composants PC1 et PC2 (qui expliquent 82,9 % et 14,6 % de la variance totale, respectivement), n'a pas permis de séparer complètement les trois groupes des échantillons. Les vecteurs propres PC1 et PC2 (Figure 6.8B-C) ont montré le même profil que les vecteurs calculés pour le modèle discriminant entre L et FL selon l'information de l'étiquette. Le modèle discriminant entre L, PLC et FL a permis classifier correctement le 80 % des spectres selon la définition de la norme NOM-155- SCFI-2003 (Tableau 6.4). Le modèle a classifié correctement seulement le 71,3 % des spectres L.

Profil des Acides Gras (FAMES)

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) a permis de montrer que les acides gras permettent de différentier les échantillons de lait et de produits similaires. Le plan factoriel et les graphiques des charges (Figure 6.9A et B) ont été définis par les PC1 et PC2 qui expliquent 54,7 % et 37,2 % de la variance totale. Dans le plan factoriel, une combinaison entre les deux composantes a permis une séparation des échantillons en trois groupes. Le PC1 a séparé les échantillons en fonction de l'origine de la matière grasse (végétale ou butyrique), tandis que le PC2 a séparé les échantillons contenant de la matière grasse d'une seule origine de ceux contenant plusieurs types de matières grasses.

Le vecteur propre 1 (Figure 6.9B) a montré des valeurs importantes pour les acides palmitique, tétradécanoique et l'acide codifié « P17 » (non identifié). Les acides palmitique et oléique ont montré une opposition entre eux. Le vecteur propre 2 a indiqué des valeurs importantes pour les acides linoléique, octadécanoique, *cis*-6-pétroselinique et oléique. Parmi les

acides ainsi observés, ceux majoritaires dans la matière grasse du lait sont les acides palmitique et oléique (avec 28 % et 21 % du total respectivement) (Creamer y MacGibbon, 1996).

L'Analyse Discriminante Générale (ADG) selon l'information de l'étiquette, a permis sélectionner 4 acides par la méthode pas à pas ascendant (Tableau 6.5). Le modèle de calibration a permis de classifier correctement 100 % des échantillons, tandis que, celui de validation croisée a permis de classifier correctement seulement 77,8 % des échantillons. Tous les échantillons de lait (L) ont été correctement classifiés.

L'ADG selon les critères de la norme NOM-.155-SCFI-2003 a permis de sélectionner 9 acides par la méthode pas à pas ascendant (Tableau 6.7). Tandis que le modèle de calibration a permis de classifier correctement 100 % des échantillons, celui de validation croisée a permis de classifier correctement seulement 88,9 % des échantillons. Tous les échantillons L et FL ont été correctement classifies.

LAIT ADULTERÉE AVEC DES MATIÈRES GRASSES EXOGÈNES

Analyse Spectrale Moyen Infrarouge

Les spectres moyens obtenus pour le 5 niveaux d'adultération sont montrés à la figure 6.12. Le meilleur modèle discriminant a été obtenu dans la région 3000-950 cm^{-1}. Le plan factoriel défini par PC1 et PC2 (53,8 % et 36 % de la variance expliquée, respectivement) ne montre pas une complète séparation des spectres en fonction du niveau d'adultération.

Le modèle discriminant obtenu a montré un bas pouvoir de discrimination car il a permis de classifier correctement le 53,16 % des spectres en fonction du niveau d'adultération. Le groupe des spectres le mieux classifié, avec le 88,9 % de classification correcte, correspond à la matière grasse native du lait (MGT).

Profil des Acides Gras (FAMES)

L'ADG a été appliquée aux profils des acides gras de chaque type de matière grasse, de façon individuelle et au groupe complet des profils, pour discriminer les laits authentiques (AU) des laits adultérés (AD), et aussi, si possible, les différents niveaux d'adultération étudiés.

Les modèles discriminants entre laits AU et AD, ont permis de classifier correctement 100 % des échantillons pour chaque matière grasse de façon individuelle et pour le groupe des profils (Tableau 6.11). L'analyse pas à pas a permis de sélectionner les acides que permettent discriminer les échantillons pour chaque modèle obtenue (Tableau 6.10).

Les modèles de discrimination en fonction des niveaux d'adultération, pour chaque matière grasse de façon individuelle, ont été moins performants, et ils présentent des différences de performance selon la matière grasse. Pour la MGA, les modèles de calibration et validation croisée ont permis de classer correctement respectivement 100 % et 85,7 % des échantillons (Tableau 6.12) ; pour la MGB, ces pourcentages sont de seulement 50 % et 33,3 % des échantillons, respectivement (Tableau 6.13) ; pour la MGC, ils atteignent 71,4 % et 42,9 % des échantillons, respectivement (Tableau 6.14) et 100 % et 42,9 % pour la MGD (Tableau 6.15).

D'un autre côté, les modèles de discrimination obtenus pour l'ensemble des profils FAMES ont montré de bonnes performances. L'analyse pas à pas ascendant a permis de sélectionner 6 acides gras. Les distances Mahalanobis au carré ont été significatives pour les 5 niveaux d'adultération. Les modèles de calibration et validation croisée ont permis de classer correctement 100 % et 72,7 % des échantillons respectivement (Tableau 6.16).

Chapitre 7. Analyse spectrale pour le suivi de l'affinage de Camembert

Évolutions Spectrales

L'évolution des spectres IRTF normalisés (3000-2800 cm^{-1} et 1800-950 cm^{-1}) a été différente selon la section de fromage analysée, sous croûte ou cœur (Figure 7.1A-B). Les spectres des échantillons de sous croûte ont montré des modifications pendant toute la durée de l'affinage, tandis que les spectres de cœur montrent seulement une faible progression jusqu'au j20, puis un fort changement d'absorbance entre j20 et j27. L'ANOVA et le test LSD ont mis en évidence les bandes spectrales présentant des changements significatifs pendant l'affinage pour chacune des sections des fromages analysés ainsi que pour les sous fractions obtenues.

Les spectres de fromage entier ont montré des évolutions significatives d'absorbance ($p<0,05$) pour les bandes associées au lactose, aux monosaccharides et aux protéines (Tableau 7.1). La suspension de fromage dégraissé (DCS) a montré des évolutions spectrales similaires à

celles observées pour le fromage entier (Tableau 7.2). Les évolutions spectrales de la matière grasse purifiée (PF) ont été très limitées et l'ANOVA n'a pas montré de différences significatives pour la PF de cœur ni pour celle de sous croûte (Tableau 7.3).

Les réponses spectrales des fractions azotées ont été observées dans la région 1700 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} associées aux liaisons peptidiques. Les spectres des fractions «azote soluble dans l'acide » (NSA) ont montré une évolution significative ($p<0,05$) seulement pour la bande Amide II. Pour les caséines (fractions CN), aucune des bandes amides n'a montré de changement significatif. Seule le rapport entre les absorbances des bandes amides I et II a montré des changements significatifs de valeurs après j13. Des résultats statistiques similaires ont été obtenus pour l'évolution spectrale de la fraction « azote soluble dans l'éthanol ». Les changements d'absorbance dans les spectres des fractions « azote insoluble à éthanol » ont été limités dans le temps et faibles et n'ont pas permis de souligner des évolutions significatives.

Paramètres physicochimiques, corrélations et analyses en composantes principales (ACP)

La plupart des paramètres physico-chimiques mesurés ont donné des corrélations significatives ($p<0,05$) entre eux, à l'exception de la matière sèche (MS) qui n'est correctement corrélée qu'avec le lactose ($R= -0,53$) et le NNP ($R = 0,52$). Le lactose et l'acide lactique sont corrélés positivement entre eux et négativement avec le pH, mais aussi avec NSA, NNP et NH_4^+. Les fractions azotées sont fortement corrélées entre elles ($R>0,87$). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Fallico *et al.* (2004) pour le pH et les fractions azotées pendant l'affinage de fromage Ragusano.

Le plan factoriel de l'ACP sur les données physico-chimiques (Figure 7.5A), défini par les PC1 et PC3, explique 82,2% de la variance totale, avec respectivement 80,6 % et 3,6 % pour les axes 1 et 3. Le positionnement des échantillons dans le plan factoriel a montré une évolution en deux étapes. Sur le premier axe, les valeurs des coordonnées factorielles décroissent continuellement en fonction du temps d'affinage. Selon le troisième axe, elles décroissent entre j1 et j7, puis elles augmentent de j8 à j20. Dans le plan des variables (Figure 7.5B), on relève que toutes les variables étudiées sont fortement corrélées positivement ou négativement ($R>0,89$) avec l'axe 1 à l'exception de la MS ($R= -0,486$). Ces observations suggèrent que l'axe 1 décrit simultanément la glycolyse mesurée par la décroissance des concentrations en lactose, en acide

lactique, et l'accroissement du pH ; et également la protéolyse décrite par l'augmentation de valeurs des fractions azotées étudiées.

Spectres infrarouge et analyse en composantes principales (ACP)

Le plan factoriel de l'ACP des spectres de fromages (Figure 7.6), défini par le PC1 et le PC2 (81,2 % et 10,8 % de la variance totale, respectivement) a montré une évolution en deux phases selon le temps d'affinage. Dans la première phase, une combinaison des deux composants permet de décrire une évolution continue du positionnement des spectres des échantillons de j1 à j8 ou jusqu'à j15 dans la sous croûte et le cœur respectivement. Dans la deuxième phase, l'évolution jusqu'au j27 se fait principalement selon l'axe 1. Le tracé des valeurs du vecteur propre 2 en fonction des nombres d'ondes a révélé deux zones importantes, la région 1490-950 cm^{-1} associée aux sucres, et la région amide (1700-1490 cm^{-1}) associée aux protéines. Ces observations suggèrent que ce vecteur décrit l'hydrolyse du lactose et le phénomène de protéolyse. Les zones spectrales les plus importantes liées à la première composante (PC1) sont celles assignées aux protéines et au lactate, suggérant que ce vecteur décrit principalement la protéolyse et la consommation du lactate associé à le remontée du pH.

L'évolution spectrale de la zone 1700-1500 cm^{-1} a été étudiée pour des fromages semi-fermes (Mazerolles *et al.*, 2001) et à pâte molle (Kulmyrzaev *et al.*, 2005). Les changements dans cette région ont permis de classifier ces fromages selon la durée de l'affinage. Les modifications d'absorbance de la bande du lactate à 1743 cm^{-1} ont été observées lors de l'affinage de fromages expérimentaux (Guerzoni *et al.*, 1999; Lanciotti *et al.*, 2005) et celles à 1589 cm^{-1} lors de l'étude de fromages à pâte molle (Kulmyrzaev *et al.*, 2005).

L'ACP sur les spectres infrarouge (Figure 7.5A) du fromage a montré des résultats similaires à ceux observés pour les paramètres physico-chimiques avec une évolution en deux phases. Cette similitude suggère que les données spectrales peuvent être corrélées avec les valeurs physico-chimiques.

Le plan factoriel de l'ACP réalisée sur les suspensions de fromage dégraissé (DCS), définie par deux premières composantes, explique 92,8% de la variance totale, avec 85,6% et 7,2% respectivement. Une évolution en deux phases, similaire à celle décrite pour le fromage entier, est

visible. Cependant, quelques échantillons ne sont pas correctement placés dans le plan factoriel. Ces échantillons ont été plus instables que le fromage pendant la mesure ATR et peuvent perturber la mesure.

Le plan factoriel de l'ACP des spectres de PF définis par PC1 et PC2 ne permettent pas de décrire une évolution claire pendant la maturation (Figure 7.7).

Le plan factoriel de l'ACP sur les spectres des fractions ASN (Figure 7.8) défini par les PC1, PC2 et PC3 explique 90,5% de la variance totale, 57,0%, 28,7% et 5,5% respectivement par composante. Selon l'axe de la PC2, une séparation des échantillons en fonction de la section de prélèvement (cœur ou sous croûte) est notée. A cœur, deux groupes d'échantillons peuvent être définis. Jusqu'à j8 (groupe P_{c1}), la position des échantillons ne montrent pas de modification notable, puis on note une évolution continue de j8 à j27 (P_{c2}). Pour les spectres des échantillons de sous croûte, une séparation en deux zones est observée, la première inclus les échantillons avant j8 et la deuxième après j8 (P_{ur1} et $P_{ur2,}$ respectivement). Les valeurs propres les plus élevées apparaissent dans la région des chaînes acyle et la région Amide I, ce qui suggère que ce plan factoriel décrit l'hydrolyse du lactose et le phénomène de protéolyse.

Comme attendu après les résultats de l'ANOVA, les ACP sur les spectres de CN et NI-EtOH ne permettent pas décrire clairement l'évolution de l'affinage en fonction du temps.

<u>Régression par Moindres Carrés Partielles (PLS)</u>

La régression PLS a été appliqué d'abord aux groupes de spectres des deux sections de fromage (cœur et sous croûte) afin de prédire le temps d'affinage. Dans un deuxième analyse, la régression PLS a été appliquée pour évaluer la relation entre les valeurs physico-chimiques et les réponses spectrales des échantillons pendant l'affinage.

Les résultats de modèles PLS pour prédire le temps d'affinage sont donnés dans le Tableau 7.5. De bonnes corrélations ont été obtenues entre les temps d'affinage observés et calculés (R^2 >0,96) avec un erreur d'un jour pour les séries des échantillons de calibration, à la fois en sous croûte et à cœur. Ces résultats ont été confirmés par les bonnes corrélations entre les valeurs observées et prédites pour les séries de validation (R^2>0,97). LE RMSECV est toujours proche de 1 jour pour le deux sections de fromage analysées.

Les résultats des modèles PLS pour prédire les paramètres physicochimiques sont reportés dans le Tableau 7.7. Pour la série des échantillons de calibration, des bonnes corrélations entre les valeurs physico-chimiques et les spectres infrarouges sont obtenues pour le pH, la MS, le NNP, le NH_4^+, le lactose et l'acide lactique. Pour tous ces paramètres, le R^2 et le RPD ont été supérieurs à 0,83 et 2,6 respectivement. En comparaison, la prédiction de NSA peut être considérée comme mois bonne (R^2= 0,73, RPD= 2,01). Pour la série des échantillons de validation, les prédictions des concentration en lactose et en acide lactique sont insuffisantes. Par contre, les prédiction de la MS, du NSA, du NNP et le NH_4^+ présentent des valeurs statistiques satisfaisantes (R^2= 0,81, RPD= 2 et RMSEC proche du SEC).

Chapitre 8. Emmental résultats

Évolutions Spectrales

Les spectres IRTF normalisés (3000-2800 cm^{-1} et 1800-950 cm^{-1}) ont montré de légères différences selon l'association des souches employées. L'ANOVA et le test LSD ont mis en évidence les bandes spectrales présentant des changements significatifs pendant l'affinage indépendamment de l'association des souches (Tableau 8.1). Les bandes associées aux phosphates, aux monosaccharides, aux acides organiques et aux protéines sont les plus notables.

Spectres infrarouges, analyse de composants principaux (ACP)

Le plan factoriel de l'ACP des spectres de fromage Emmental (Figure 8.2A), défini par les PC1 et PC2, décrit 70,9% de la variance totale, respectivement 44,9% et 26,0%. Ce plan permet de visualiser une évolution en deux phases. La première phase, décrite par une combinaison de PC1 et PC2, intègre les échantillons de j20 (0CT) à j58 (24CC), séparés en deux groupes notés G1; comprenant les échantillons de j20 à J51; et G2, composé par les échantillons de J51 à J56 respectivement. La seconde phase, visible principalement selon l'axe 1, met en évidence l'évolution de j58 (24CC) jusqu'au AM, en séparant clairement les échantillons de 24CC (G2), 30CC (G3) et AM (G4).

Le tracé du vecteur propre 1 (Figure 8.2B) a montré deux zones importantes, la région 1800-1710 cm^{-1} et la région amide (1700-1490 cm^{-1}). Dans la première région, on observe un pic important à ~1743 cm^{-1} (–C=O) et un pic mineur à ~1749 cm^{-1} (C=O) (Karoui *et al.*, 2003). Dans

la deuxième région, seul le pic assigné à la liaison Amide II est observé. Le tracé du vecteur propre 2 a présenté aussi les pics ~1743 cm^{-1} et ~1749 cm^{-1} mais avec un intensité inférieure à celle du vecteur 1. Dans la région amide, seul le pic correspondant à la liaison Amide I est observé. Ces résultats suggèrent que les deux vecteurs décrivent les phénomènes relatives à la consommation du lactate, à lipolyse et la protéolyse avec des modifications différentes selon le vecteur considéré.

L'évolution spectrale dans la zone Amide (1700-1500 cm^{-1}) a été étudiée pour des fromages semi fermes affinés à 13 ºC (Mazerolles *et al.*, 2001; Mazerolles *et al.*, 2002) et des fromages à pâte molle (Kulmyrzaev *et al.*, 2005). Ces études ont permis de montrer le potentiel de la spectroscopie infrarouge pour discriminer les fromages en fonction de leur âge . Comme observé dans nos travaux, Vannini *et al.* (2001) mentionnent différents comportements des bandes amide I et II en fonction de l' âge du fromage et des souches utilisées.

Spectres infrarouges, analyse de discriminante générale (ADG)

La régression linéaire pas à pas ascendante a conduit à la sélection de 24 nombres d'onde (P inclusion 0,05, P exclusion 0,05) (Figure 8.3) associés aux sucres, protéines et matières grasses. Ces nombres d'ondes ont déjà été reportés pour la discrimination de 3 types de fromage Emmental (Picque *et al.*, 2002). Des changements pendant l'affinage dans les bandes correspondant aux groupes méthyle et méthylène dans la région 3000-2800 cm^{-1} ont été reportés pour des fromages semi fermes (Dufour *et al.*, 2000).

Les distances de Mahalanobis calculées à partir des spectres des échantillons de calibration et de validation croisée ont été significatives ($p< 0,05$) pour les 7 états d'affinage évalués. Les modèle obtenu pour le groupe de calibration a permis de classifier correctement 100% des spectres en fonction de l'âge du fromage (Tableau 8.2). Pour le groupe de validation croisée, le modèle a été moins performant puisqu'il n'a permis de classifier correctement que 85,7% des spectres (Tableau 8.2). Ce pourcentage a été principalement affecté par la classification incorrecte de 50 % des échantillons de j20 (assignés en j34), et de j51 (assignés en j58).

La classification des échantillons sur la base de la probabilité à appartenir à un groupe déterminé est montrée dans le Tableau 8.3. Une classification correcte de 57,1% des échantillons

est relevée pour le groupe de prédiction. Seul les échantillons j27 et AM ont présentés un taux de 100 % de classification correcte. En fonction de la classification des spectres de prédiction (Tableau 8.3), on peut distinguer trois groupes au lieu des 7 initialement définis. Le premier, formé par les fromages les plus jeunes collectés du début de l'affinage à l'entrée dans la cave chaude (j20 à j34); le deuxième formé par des fromages á mi-affinage (de j51 à j58); et le troisième formé par des fromages les plus affinés (j65 jusqu'au l'ouverture des meules, AM). Aucun des échantillons assignés dans un de ces 3 groupes n'a été mal classé (Tableau 8.3).

Il y a peu des travaux dans la littérature sur la discrimination par spectroscopie d'infrarouge des fromages en fonction de l'affinage. Cet méthodologie a été utilisée pour discriminer entre fromages du type Emmental en fonction du type du fromage (Picque *et al.*, 2002) ou de la région de production (Pillonel *et al.*, 2003b; Karoui *et al.*, 2005a; Karoui *et al.*, 2005b).

CONCLUSION

Les analyses factorielles discriminantes des données spectrales moyen infrarouge (MIR) ont donné de bons résultats pour la discrimination des échantillons de lait et des produits similaires selon les deux critères de classification utilisés (95,15 % selon l'étiquette et 95,25 % selon la norme). Les analyses factorielles des profils spectraux obtenus en spectroscopie proche infrarouge (PIR) et des profils des acides gras (FAMES) ont conduit à des résultats similaires de discrimination des mêmes groupes d'échantillons (75,24 % et 77,8 % en fonction de l'étiquette, respectivement ; 80 % et 88,9 % en fonction de la norme, respectivement). Pour ces deux méthodes, les résultats obtenus ont été inférieurs à ceux obtenus avec la méthode MIR. Les trois techniques ont montré une meilleure performance de discrimination des échantillons selon les critères de la norme NOM-155-SCFI-2003 que selon la dénomination notée sur l'étiquette.

L'ADG des données spectrales MIR des laits adultérés avec des matières grasses exogènes a donné des résultats médiocres (53,16 % de classification correcte). Ce résultat peut être lié à des problèmes d'émulsion des matières grasses pendant la préparation des échantillons. Les analyses des profils de FAMES ont fourni des résultats de niveau excellent en séparant 100 % des échantillons authentiques et contrefaits quelle que soit la matière grasse utilisée. Les analyses en fonction des niveaux d'adultération ont donné de bons résultats pour l'huile de noix de coco (MGA) et le groupe des profils (85,7 % et 72,7 % pour les échantillons de validation croisée,

respectivement). Une performance inférieure a été observée pour l'huile de soja (MGB), l'huile de canola (MGC) et la matière grasse butyrique (MGD) (33,3 %, 42,9 % et 42,9 % pour les échantillons de validation croisée, respectivement).

L'ANOVA et l'analyse en composantes principales des données spectrales du fromage entier de type Camembert ont montré des évolutions des absorbances et des profils spectraux en relation avec le temps d'affinage. Ces évolutions peuvent être expliquées par les changements biochimiques survenant lors de l'affinage et déjà décrits pour les fromages de type Camembert. Les analyses des autres fractions du fromage n'apportent pas plus d'information ou une meilleure discrimination que les spectres du fromage entier.

Les modèles prédictifs, obtenus par régression PLS, pour les spectres des échantillons de fromage issus soit du cœur, soit de la sous croûte, ont donné de bons résultats pour la prédiction du temps de maturation (temps de prélèvement) avec une erreur moyenne proche de 1 jour.

Les régressions PLS entre les données physico-chimiques et spectrales ont montré que l'IRTF est une bonne méthode pour prédire les valeurs de la matière sèche (MS), de l'acide lactique, de l'azote soluble en milieu acide (NSA), de l'azote non protéique (NNP) et de l'ammoniac (NH_4^+) observées pendant l'affinage. Cependant, les modèles obtenus pour la teneur en lactose et pour le pH ont été moins précis.

L'ANOVA et l'ACP des données spectrales du fromage Emmental ont montré des évolutions notables en fonction du temps d'affinage. Ces évolutions peuvent être expliquées par les changements biochimiques dans les composés les plus importants comme décrit dans la littérature. L'ADG a montré que l'IRTF est une bonne méthode pour différencier les échantillons de fromage jeunes, demi affinés et affinés.

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que la spectroscopie moyen infrarouge (MIR) constitue une méthode rapide et économique pour :

◊ classer les laits et les produits similaires en fonction des critères de la législation Mexicaine,

◊ prédire le temps d'affinage des fromages Camembert et Emmental de façon directe,

◊ prédire le niveau de la protéolyse.

Malgré l'intérêt de cette méthode, sa facilité, sa rapidité de mise en œuvre, il serait nécessaire de faire des recherches plus approfondies pour élargir son utilisation à d'autres types d'adultérations ou au suivi de l'affinage d'autres fromages.

Pour améliorer la performance des modèles discriminant pour les laits et les produits similaires, il serait utile d'appliquer différentes corrections aux spectres infrarouges, similaires à celles appliquées aux spectres des fromages. Enfin, pour améliorer la discrimination entre les matières grasses exogènes, il serait souhaitable utiliser une méthode plus performante pour réaliser les émulsions afin de pouvoir évaluer directement leur l'adultération ; une autre alternative serait la construction de modèles de discrimination basés sur les spectres des matières grasses purifiées.

Seule une étude plus large permettrait de confirmer les résultats obtenus pour les fromages et d'envisager leur application à d'autres types de fromages, avec l'ambition d'obtenir des informations qui porteraient non seulement sur le niveau d'affinage mais également sur leur origine géographique, les procédés de fabrication, voire leur authenticité.

Primera sección
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Capítulo 1. Antecedentes

La leche y productos lácteos presentan una gran importancia en la nutrición humana. Su calidad, seguridad y autenticidad son cuestiones relevantes tanto para los procesadores como para las autoridades reguladoras y consumidores. Definir que es la autenticidad o la aulteración de los alimentos o los parámetros que permiten determinarla no es algo sencillo, ya que ésta depende de una variedad de criterios.

A continuación se presentan de forma general algunos conceptos enfocados a definir que es la autenticidad de los alimentos. Adicionalmente se presentan algunas cifras que muestran la importancia socioeconómica del sector lechero para países como México y Francia y así como algunos aspectos normativos para la leche y algunos productos lácteos.

1.1 Autenticidad de alimentos

1.1.1 Un poco de Historia

La globalización de los mercados que se presenta en la actualidad ha hecho accesible para los consumidores una gran cantidad y variedad de productos provenientes de todo el mundo, principalmente en el sector agroalimentario. Productos de diferentes características, denominaciones, calidades y orígenes compiten por las preferencias de los consumidores.

Los consumidores actuales exigen una mayor seguridad y calidad en los productos alimenticios, lo que ha originado la inclusión en nuestro vocabulario de términos como calidad, seguridad, trazabilidad y autenticidad. A pesar de lo novedoso que éstos nos puedan resultar, la adulteración de los alimentos no es un problema reciente, sin embargo, se ha hecho más sofisticada en los últimos años. Los ingredientes y alimentos que más comúnmente han sido el blanco de éstas incluyen aquellos de mayor valor comercial (Downey, 1996). De igual forma, la publicación de leyes y estatutos encaminados a proteger a los consumidores no son recientes.

La adulteración de los alimentos data desde tiempos bíblicos, iniciándose con el comercio de mercancías. Hace siglos se adicionaba a la cerveza sales de plomo para aumentar su dulzor y se sustituía el lúpulo con estricnina para su amargor, por lo que en el código de Hamurabi

publicado alrededor del año 1750 A.C. en Babilonia, se estableció una ley que prohibía vender cerveza de baja fuerza a un precio elevado. En la antigua Roma y Atenas se adulteraban vinos con sabores y colores, al grado que se mencionaba que ya no era posible adquirir un vino autentico (Downey, 1996; Dennis, 1997).

En el siglo XVIII era común la adulteración del té, el café y el cacao, mercancías de elevado valor comercial en esa época. En esta época era también muy común la adulteración de la leche, llegando a tal punto que a las bombas de agua del pueblo se les llegó a llamar las vacas negras.

En el siglo XIII en Francia y Alemania se elaboró un estatuto para el control de los alimentos, mientras que en Inglaterra existía una penalización por la adulteración del pan. En el año 1875 se publicó en Reino Unido el Acta para la venta de alimentos y medicamentos (Sumar y Ismail, 1995) estableciendo que un alimento o bebida podía ser considerado como adulterado A) Si contenía cualquier ingrediente que pudiese ocasionar daño a la salud del consumidor; B) Si contenía cualquier sustancia que sensiblemente incrementara su peso, volumen o fuerza, a menos que la presencia de dicha sustancia fuera necesaria debido a su preparación; C) Si cualquier constituyente importante fue completa o parcialmente removido, sin que fuera hecho del conocimiento al momento de la venta; o D) Si era una imitación fraudulenta de, o vendida con el nombre de cualquier otro artículo.

Fue a finales del siglo XIX que se inició el desarrollo de las primeras pruebas químicas para determinar la autentificad de la leche. Al mismo tiempo los timadores desarrollaron mezclas para engañar al lactómetro (Dennis, 1997).

1.1.2 Criterios de autenticidad

La autenticidad es un factor importante en el precio de los alimentos y bebidas, así como de los ingredientes utilizados en su elaboración. Por lo que, productos visiblemente similares pueden diferir marcadamente su precio dependiendo de los ingredientes y procesos que intervienen en su elaboración (Downey, 1996).

De una manera práctica, podemos decir que un alimento auténtico es aquel que se ajusta a la descripción proporcionada por el productor o el procesador en la etiqueta del producto. Los

criterios que intervienen en la definición de su autenticidad se refieren a la descripción del producto, a los ingredientes utilizados y los procesos de elaboración.

Descripción del producto

En la etiqueta de los productos se presentan una serie de descripciones que, dependiendo del producto, puede incrementar fuertemente su precio final. Entre los criterios de descripción del producto más importantes se encuentran su origen geográfico, su naturaleza, su historia, su definición, así como las especies o variedad de los ingredientes.

El Origen geográfico está muy relacionado con la denominación de origen que ostentan algunos productos como vinos, quesos, bebidas destiladas, etc. Los productos protegidos por una denominación de origen tienen un valor comercial mayor que los productos similares que no están protegidos y que se denominan productos "tipo", por ejemplo un queso Gouda o un tipo Gouda, un Jerez o un vino tipo Jerez.

La naturaleza del producto tiene una gran influencia en su precio y aceptación. Un producto de origen sintético generalmente presenta un valor comercial inferior respecto a uno de origen natural, además de presentar mayores restricciones en su uso. Esto es un factor importante en productos tales como colorantes, edulcorantes, saborizantes y aceites esenciales.

La historia del producto tiene una alta relación con los procesos a los que ha sido sometido un producto, tales como el congelamiento, la concentración, la reconstitución, etc., o si se trata de un producto fresco. El valor comercial de una carne fresca es superior al de una carne congelada y descongelada que se venda en refrigeración.

La definición de un producto generalmente es establecida por medio de normas. Productos que procedan de la misma materia prima pueden tener definiciones diferentes y por lo tanto, precios diferentes. A título de ejemplo se puede mencionar el jugo de naranja, que cuando es fresco tiene un valor comercial mayor a un jugo de naranja reconstituido o una naranjada; o bien, una leche pasteurizada no tiene el mismo precio que una leche condensada. En ocasiones un mismo producto puede provenir de diferentes variedades de materia prima, como son los vinos elaborados a partir de uvas Cabernet sauvignon, Merlot o Pinot noire.

En algunos productos la base de su descripción es la especie o variedad de ingredientes, tal es el caso del café 100 % Arábiga, el aceite de oliva extra virgen, el jamón de pavo, la cajeta 100 % de leche de cabra, entre otros productos.

Ingredientes utilizados

Los ingredientes utilizados en la elaboración de los alimentos generalmente se encuentran declarados en las etiquetas, lo que permite a los consumidores elegir entre productos similares pero con ingredientes diferentes. Ente los criterios más importantes relacionados con los ingredientes se encuentran sus propiedades funcionales y la presencia no declarada de éstos.

Algunos ingredientes presentan ciertas propiedades funcionales que confieren atributos a los alimentos. Se pueden tener ingredientes que aún cuando poseen el mismo nombre, no presentan las mismas propiedades, tal es el caso de los almidones cuyas propiedades dependen de su fuente y de los procesos de modificación a los que han sido sometidos.

La presencia de ingredientes no declarados presenta una gran importancia cuando éstos se encuentran restringidos en su uso por la legislación vigente, porque deban ser declarados por a razones de salud debido a que produzcan alergias, reacciones adversas o efectos de acumulación.

Procesos de elaboración

El proceso de elaboración tiene una gran importancia en la autenticad de los productos debido a que algunos procesos no son totalmente aceptados por los consumidores o porque existen diferencias de proceso aceptadas entre países.

Los tratamientos a los que han sido sometidos los alimentos pueden influir en el precio y aceptación por parte de los consumidores. Algunos tratamientos, como el uso de radiación para la conservación, deben ser declarados en la etiqueta, y generalmente presenta un rechazo importante por parte de los consumidores.

Los procesos industriales utilizados en la producción de alimentos pueden presentar restricciones en algunos países mientras que en otros no. Un ejemplo de esto es el lavado de la pulpa en la elaboración del jugo de naranja.

1.2 Aspectos socioeconómicos del sector lácteo

La leche es un producto que se produce y procesa en todo el mundo. Debido a sus propiedades nutricionales es considerado como un producto básico en la alimentación humana, principalmente de los niños, por organismos internacionales como la FAO y la UNESCO (SAGARPA, 2006).

Según datos de la FAO (2006a), la producción mundial de leche de vaca en el año 2005 fue de 239 millones de toneladas. Cómo país individual, la India es el principal productor con el 15 % de la producción total, mientras que la producción de México representó el 3 % y la de Francia sólo el 2 % (Figura 1.1).

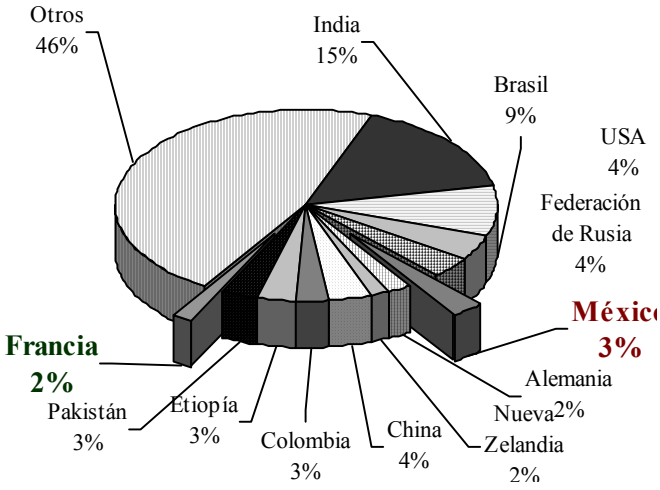


Figura 1.1 Porcentaje por país de la producción mundial de leche en el año 2005 (ton año^{-1}).
Fuente: FAO, (2006a).

En México, según cifras de la SAGARPA (2006), durante el periodo 1992-2001 el 56 % de la producción total de leche de vaca se concentró entre los estados de Jalisco, Durango, Coahuila, Veracruz, Guanajuato y Chihuahua, siendo Jalisco el principal productor con el 17 % de la producción nacional.

En los países desarrollados se producen grandes volúmenes de leche, provocando excedentes de producción que terminan vendiéndose en el mercado internacional con grandes subsidios (SAGARPA, 2006).

México no ha sido un país autosuficiente respecto a la producción de leche, por lo que ha tenido que recurrir a la importación de ésta y de diversos productos lácteos para cubrir la demanda nacional. La importación de leche en polvo se ha incrementado en los últimos años (Figura 1.2), en 2004 se importaron 175 985 ton de leche en polvo, de las cuales el 80,5 % correspondió a leche descremada (FAO, 2006b). Adicionalmente, México importa una gran cantidad de subproductos lácteos como el suero deshidratado cuya importación ascendió en 2004 a 57 514 ton, y la lactosa que fue de 22 833 ton (FAO, 2006b).

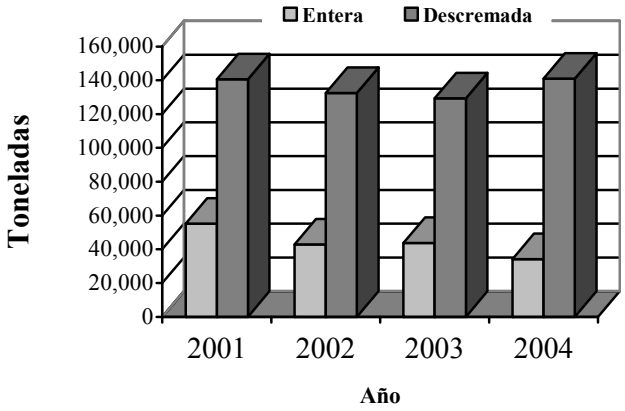


Figura 1.2. Importaciones Mexicanas de leche de vaca entera y descremada en polvo.
Fuente: FAO (2006b).

A partir de la leche en el mundo se produce una gran variedad de productos entre los que destacan los quesos. Francia es un país que destaca por la gran variedad de quesos que ahí se producen. Según cifras de la FAO (2003), en el año 2002 la producción total de queso en Francia ascendió a 1 790 000 ton, mientras que en México ésta sólo alcanzó 158 861 ton. Parte de la producción de queso de ambos países es destinada a la exportación. En el año 2004 la exportación de queso elaborado a partir de leche de vaca entera ascendió a 567 509 ton en Francia y 417 ton en México (FAO, 2006b). Adicionalmente, en el mismo año, Francia exportó 9 977 ton de queso de oveja y 139 ton de queso de leche de vaca descremada (FAO, 2006b).

1.3 Aspectos normativos

Debido a la importancia socioeconómica de la leche y los productos lácteos, así como por la creciente exigencia de los consumidores, muchos países y organismos internacionales han

elaborado normas para garantizar a los consumidores la calidad, seguridad y autenticidad de éstos productos.

La calidad fisicoquímica y microbiológica de los alimentos en general y de los productos lácteos en particular está definida por una serie de normas. A nivel internacional, el Codex Alimentarius se ha convertido en una referencia mundial permitiendo a los países participar en la formulación de normas alimentarias y participar en su aplicación a escala mundial. En México, la normatividad está definida por normas obligatorias denominadas Norma Oficial Mexicana (NOM) emitidas por dependencias como la Secretaría de Economía (SE) y la Secretaría de Salud (SSA). En Francia, la Dirección General de la Competencia, Consumo y la Represión de Fraudes (DGCCRF por sus siglas en francés) es la encargada de la normalización para la protección de los consumidores en materia alimentaria.

Un criterio importante en la calidad y/o autenticidad en los alimentos es la presencia de una Denominación de Origen (DO). El código de Consumo Francés (Legifrance, 2006) en su artículo L115-1 menciona que, consituye una denominación de origen, la denominación de un país, región o de una localidad que sirve a designar un producto que es originarido de ahí y donde la calidad o las características son debidas al medio geográfico, comprendiendo los factores naturales y humanos. En este país, una denominación de Origen Controlada (AOC por sus siglas en francés) es atribuída por el Instituto Nacional de Denominaciones de Origen (INAO) quien verifica la notoriedad de las denominaciones, determina las áreas geográficas involucradas y fija las reglas de producción (DGCCRF, 2006).

Leche

Desde hace algunos años, en México se comercializan además de la leche, productos similares a ésta, bajo las mismas presentaciones comerciales y generalmente a un precio inferior. Para evitar confución en los consumidores al adquirir estos productos, es necesario contar con una definición muy precisa de ellos.

En el Codex Alimentaius solo se reconoce como leche a la secreción mamaria normal de animales de ordeña obtenida a partir de una o de varias ordeñas, sin adicionale o substraerle nada, destinada al consumo como leche liquida o a un tratamiento posterior (Codex-Stan-206-1999,

1999). De igual forma, se menciona que la leche que ha sido modificada en su composición por la adición y/o substracción de constituyentes de leche puede ser identificada por un nombre utilizando el término "leche" a condición de que cerca del nombre se describa claramente la modificación a que fue sometida.

La legislación mexicana establece los criterios que definen cuales productos pueden ser llamados leche y distinguirlos de productos similares en base a su composición (NOM-155-SCFI-2003, 2003) así como los parámetros para asegurar su seguridad microbiológica (NOM-184-SSA1-2002, 2002).

En la norma NOM-155-SCFI-2003 (2003) se define a la leche como el producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro el cual debe ser sometido a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede someterse a otras operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen el producto y cumpla con las especificaciones de su denominación. De igual forma se reconoce como leche, la leche adicionada de grasa vegetal.

Además de la leche, en la norma NOM-155-SCFI-2003 (2003) se definen los criterios de denominación de dos productos similares a la leche, la fórmula láctea y el producto lácteo combinado. La fórmula láctea se define como "el producto elaborado a partir de ingredientes propios de la leche tales como caseína, grasa, lactosueros, agua para uso y consumo humano, con un mínimo de 22 g L^{-1} de proteína de la leche y, de ésta, el 70 % de caseína, puede contener grasas de origen vegetal en las cantidades necesarias para ajustarla a las especificaciones establecidas en la Norma". El producto lácteo combinado está definido como "el producto elaborado a partir de sólidos lácteos y otros ingredientes, el cual debe contener como mínimo de 15 g L^{-1} de proteína propia de la leche y, de ésta, el 70 % de caseína", además de cumplir con las demás especificaciones de la norma.

En la norma NOM-155-SCFI-2003 (2003) se menciona que existe una adulteración cuando la naturaleza o composición de la leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado no corresponda a aquellas con las que se denomine, etiquete, anuncie, suminstre o cuando no corresponda a las especificaciones establecidas, o cuando no haya sido objeto de tratamiento que

disimule su alteración o encubran defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas.

Sin embargo, esta norma no obliga a los fabricantes de leche y productos lácteos a someter a verificación sus productos para garantizar que cumplan con los criterios de denominación, así como con lo declarado en sus etiquetas. Por lo que, el 20 de diciembre de 1999 se publicó en el Diario Oficial un Decreto emitido por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI, 1999) en el cual se establecía la obligación que tienen los fabricantes, envasadores, importadores o comercializadores de someter a verificación la veracidad de la información que ostentan las etiquetas de la leche. Sin embargo, este programa sólo tuvo una duración de 2 años.

Queso Camembert

El queso Camembert originario de Francia, está definido en el Codex Alimentarius (C-33-1973, 1973) como un queso de pasta blanda pero no desmenuzable, cubierto de una corteza uniforme de mohos blancos. Un queso de tamaño normal debe presentar la forma de un cilindro plano con un diámetro de 10 cm a 11 cm, una altura entre 3 cm y 3,5 cm y un peso mínimo de 250 g (C-33-1973, 1973).

Respecto al proceso de elaboración, la norma C-33-1973 (1973) especifica que se debe utilizar leche de vaca, bacterias ácido lácticas (LAB) y hongos como *Penicillium caseicolum* (actual *Penicillium camemberti*) y de *Bacterium linens* (actual *Brevibacterium linens*) y la coagulación realizarse con cuajo. La cuajada no debe recibir ningún tratamiento térmico y el desuerado se realiza por escurrido natural. El salado puede realizarse en seco o en salmuera. La maduración se realiza por almacenamiento a una temperatura comprendida entre 10 ºC y 14 ºC durante aproximadamente 10 días, seguida de un posible almacenamiento a temperaturas más bajas.

Respecto a la composición, la norma C-33-1973 (1973) especifica que el producto debe contener un mínimo de 45 % de grasa en el extracto seco y un contenido mínimo de extracto seco del 44 %.

Este queso sólo podrá llamarse “Camembert” cuando se ajuste a las disposiciones de la norma C-33-1973 (1973). En los quesos no producidos en Francia deberá indicarse el país

productor. Los quesos con un contenido de grasa inferior al 45 % deberán adicionar un prefijo o sufijo a la denominación indicando el contenido de grasa.

Queso Emmental

El queso Emmental o Emmentaler, originario de Suiza, es fabricado en la actualidad en ese país además de Finlandia, Francia y los Estados Unidos de América, y está definido en el Codex Alimentarius (C-9-1967, 1967) como un queso duro de pasta que se presta al corte con cuchillo, de color marfil a amarillo claro, con ojos regulares de raros a abundantes. El queso debe presentar la forma de un cilindro con un diámetro de 70 cm a 100 cm, una altura entre 12 cm y 30 cm y un peso mínimo de 50 kg.

Para su elaboración se debe utilizar leche de vaca, bacterias inocuas productoras de ácido láctico (LAB) y bacterias productoras de ácido propiónico; y en la coagulación se emplea cuajo u otras enzimas coagulantes adecuadas (C-9-1967, 1967). Una vez obtenida, la cuajada, es cortada y recibe un tratamiento térmico a 50 ºC mínimo.

El salado puede realizarse introduciendo los quesos en salmuera y/o salando la superficien en seco, durante la maduración la superficie de los quesos se lava, limpia y sala a intervalos regulares (C-9-1967, 1967).

La maduración se realiza por almacenamiento a temperaturas sucesivas que oscilan entre 10 ºC y 25 ºC. Las fermentaciones lácticas y propiónicas se realizan a una temperatura mínima de 20 ºC durante al menos tres semanas. El queso está listo para su consumo cuando tiene una edad mínima de 60 días a partir de la fecha de fabricación (C-9-1967, 1967).

Un queso Emmental debe contener un mínimo de 45 % de grasa en el extracto seco y un contenido mínimo de extracto seco del 60 % (C-9-1967, 1967).

Este queso sólo podrá llamarse “Emmental” o “Emmentaler” cuando se ajuste a las disposiciones de la norma C-33-1973 (1973). En los quesos no producidos en Suiza deberá indicarse el país productor.

Las especificacione mencionadas anteriormente para leche y productos similares, así como para los quesos Camembert y Emmental están encaminadas a proporcionar una correcta definición y clasificación de los productos, que permita que productos correctamente descritos permanezcan accesibles para los consumidores.

Sin embargo, debido a diferencias entre razas de ganado, geoclimáticas y de manufactura, es extremadamente difícil elucidar la composición química detallada y única de muchos de estos productos, propiciando que establecer la autenticidad de un alimento sea una tarea muy compleja.

Las metodologías establecidas en la NOM-155-SCFI-2003 (2003) están encaminadas a verificar la calidad de la leche con base a parámetros composicionales muy generales como es el contenido de proteína, grasa, lactosa, etc. Si bien estas metodologías permiten determinar si la leche y los productos lácteos cumplen o no con las características composicionales de acuerdo a su clasificación, no permiten discriminar entre leche y productos similares.

Por otro lado, las normas C-9-1967 (1967) y C-33-1973 (1973), sólo establecen los límites para parámetros composicionales como el contenido de grasa, extracto seco y humedad en los quesos. Sin embargo, éstos parámetros no permiten discriminar estos productos en función de su estado de maduración o de los procesos utilizados.

El poder determinar si un producto corresponde a la denominación, región de origen, edad o tratamientos térmicos declarados requiere de la implementación de metodologías analíticas especiales que permitan determinar de una manera confiable los parámetros que marcan las diferencias entre los productos y/o su composición química de una forma más detallada.

Capítulo 2. Autenticidad de productos lácteos

La leche y los quesos son productos complejos no solo respecto a su composición, sino también los sistemas fisicoquímicos y enzimáticos que en ellos intervienen, haciendo que establecer su autenticidad sea una tarea muy compleja. A continuación se presentan de forma general los principales cambios bioquímicos que presntan estos productos, así como las principales técnicas instrumentales y estadísticas que se reportan en la bibliografía utilizadas para evaluar la calidad y para discriminar estos productos en función de criterios tales como la región de origen, la edad, o los procesos utilizados.

2.1 Cambios bioquímicos en la elaboración de productos lácteos

2.1.1 Leche y productos similares

Generalmente la leche es sometida a tratamiéntos térmicos con la finalidad de mejorar su conservación y asegurar su calidad microbiológica. Comparada con otros alimentos, la leche es notoriamente estable al calor, lo que permite la elaboración de una gama de productos esterilizados por calor, sin embargo, durante el proceso de calentamiento se presentan numerosas reacciones que tienen influencia sobre sus propiedades nutricionales y composicionales (Anema y McKenna, 1996).

Entre las reacciones más importantes se encuentra la desnaturalización de las proteínas, siendo las proteínas de suero las más sensibles. La desnaturalización cambia la conformación de la proteína y su grado depende de la proteína, así como del tratamiento térmico y del pH del medio (Anema y McKenna, 1996).

La destanturalización térmica de las proteínas ha sido evaluada en leches reconstituidas enteras (Anema y McKenna, 1996) y descremadas (Anema y Klostermeyer, 1997). Anema y McKenna (1996) observaron que la desnaturalización de la β-lactoglobulina es independiente de la concentración inicial de la proteína en un rango de temperatura de 70 ºC a 115 ºC, mientras que para la α-lactalbúmina, a temperaturas inferiores a 85 ºC la desnaturalización es dependiente de la concentración inicial. Por otro lado, (Anema y Klostermeyer, 1997) observaron que la disociación de las miscelas de caseína está influenciada por el pH (6,3-7,1) y la temperatura

utilizada (20 ºC a 90 ºC). Estos autores mencionan que la proporción de β-caseína en la caseína soluble fue constante independientemente de la temperatura y del pH, mientras que las concentraciones de α_s-caseína y κ-caseína variaron tanto con la temperatura como con el pH.

El impacto de los tratamientos térmicos en la leche usada como materia prima en la fabricación de quesos han sido estudiadas con anteroridad (Beuvier *et al.*, 1997; Buffa *et al.*, 2001).

2.1.2 Quesos

Durante los procesos que intervienen en la elaboración de los quesos se presentan una gran cantidad de reacciones bioquímicas que originan cambios en su composición y que inducen el desarrollo de sus propiedades organolépticas. Es durante la etapa de maduración donde aparecen los fenómenos bioquímicos más importantes como son la proteólisis, la glucólisis y la lipólisis.

Durante la proteólisis, por hidrólisis enzimática, la cadenas de caseína se rompen generando una gran variedad de compuestos de diferentes tamaños moleculares que varían desde péptidos grandes a pequeños, hasta aminoácidos libres (Fox y McSweeney, 1996; McSweeney y Sousa, 2000; Sousa *et al.*, 2001). Las cinéticas de esta hidrólisis, así como los perfiles de compuestos generados dependen de las diferentes enzimas involucradas y son característicos de cada tipo de queso (Hasouna *et al.*, 1996; Gagnaire *et al.*, 2001b). Estas cinéticas son afectadas por diferentes factores, como son los microorganismos usados (McSweeney y Sousa, 2000; Poveda *et al.*, 2004a; Lanciotti *et al.*, 2005), el proceso de manufactura (Moatsou *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2004) y el tiempo de maduración (Poveda *et al.*, 2004b; Prieto *et al.*, 2004), entre otros.

Durante la glucólisis, la lactosa es transformada en lactato, que a su vez es metabolizado generando otros compuestos como ácidos orgánicos (pirúvico, propiónico y acético), etanol, así como CO_2 y H_2O (McSweeney y Sousa, 2000). En los quesos madurados por iniciadores secundarios como en el Camembert (*Kluyveromyces lactis, Geotrichum candidum* y *Penicillium camemberti*), este fenómeno es muy extensivo. Éste influencía la textura por modificaciones en la solubilidad de las caseínas, y afecta los crecimientos microbianos y las actividades enzimáticas (McSweeney, 2004).

Los triglicéridos, los lípidos más importantes del queso, son hidrolizados hacia mono- y di-glicéridos, y ácidos grasos libres (AGL) (McSweeney y Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2003). Aun cuando este fenómeno no ha sido reportado como un índice de maduración importante, éste tiene una fuerte influencia en el desarrollo del sabor y aroma del queso (McSweeney y Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2003; Mallatou *et al.*, 2003).

2.2 Parámetros fisicoquímicos

En la evaluación de la calidad de la leche y productos lácteos se utiliza una gama de técnicas de referencia, generalmente basadas en la determinación de diferentes parámetros fisicoquímicos. A continuación se presentan algunas de estas metodologías.

2.2.1 Leche y productos similares

En la industria las características composicionales en leche y productos similares son evaluadas por métodos fisicoquímicos de referencia. En México la NOM-155-SCFI-2003 (2003) establece las metodologías para determinar la concentración de los principales grupos como proteínas, grasa, lactosa y sólidos totales.

Estas metodologías sólo permiten evaluar la concentración de los grandes grupos composicionales, pero no permiten diferenciar el origen de estos compuestos.

2.2.2 Quesos

Los fenómenos de proteólisis, glucólisis y lipólisis son evaluados generalmente utilizando métodos fisicoquímicos (pH, Kjeldahl, humedad, extracto seco, etc.) encaminados a evaluar cambios en diferentes fracciones de queso (Ardö y Polychroniadou, 1999). La proteólisis es evaluada cuantificando el nitrógeno en diferentes fracciones nitrogenadas obtenidas por precipitación selectiva (Christensen *et al.*, 1991), como es el nitrógeno total (NT), nitrógeno no proteíco (NNP), nitrógeno no caseico (NNC), nitrógeno soluble en agua (NSA), nitrógeno soluble e insoluble en etanol (NS-EtOH y NI-EtOH, respectivamente). El grado de lipólisis es evaluado midiendo la acidez de la fracción lipídica (Evers, 2003) y la glucólisis cuantificando la lactosa residual y el lactato generado (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004).

Estos métodos han sido descritos para diferentes quesos como Camembert (Schlesser *et al.*, 1992; Engel *et al.*, 2001b; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004), Ragusano (Fallico *et al.*, 2004) y Prato (Gorostiza *et al.*, 2004).

2.3 Técnicas instrumentales

El uso de técnicas instrumentales en la evaluación de la calidad, así como en la discriminación de productos en función de parámetros como su origen, se ha ido incrementando en los últimos años, en gran medida por especificidad y confiabilidad de estas técnicas. Entre las más utilizadas se encuentran las técnicas espectroscópicas como la fluorescencia, el infrarrojo, y las técnicas separativas.

2.3.1 Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo (FTIR) es un método directo, confiable y rápido que permite obtener información específica sobre diferentes parámetros simultáneamente, principalmente en la región 3000-400 cm^{-1} ya que las bandas son asociadas a vibraciones de los grupos funcionales de las moléculas (Karoui *et al.*, 2005b).

Esta técnica es utilizada para cuantificar proteínas (1700-1500 cm^{-1}), grasas (3000-2800 cm^{-1} y 1800-1700 cm^{-1}), y lactosa (1112-1050 cm^{-1}) (Chen *et al.*, 1998; Grappin *et al.*, 2000; Wust y Rudzik, 2003) en leche (fresca, evaporada, UHT, en polvo, etc.), quesos (Cheddar, Gorda, Edad, etc.).

La respuesta de las proteínas entre 1700 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} está asociada con el enlace peptídico (CO-NH), y es muy sensible a la conformación adoptada por las proteínas. Ésta muestra dos zonas, la Amida I (1700-1600 cm^{-1}) asociada con el estiramiento C=O y C-N y la Amida II (1600-1500 cm^{-1}) asociada con el estiramiento C-N y el balanceo N-H (Dufour y Robert, 2000; Karoui *et al.*, 2003).

Para las grasas, son bien conocidas diferentes regiones de absorción. La primera debida a las cadenas acilo (3000-2800 cm^{-1}) presenta dos picos asociados con los grupos metileno (2920 cm^{-1} y 2845 cm^{-1}) y dos hombros asociados con los metilos (2962 cm^{-1} y 2872 cm^{-1}). La segunda zona (1800-1700 cm^{-1}) está asociada con los ésteres (estiramiento C=O y C(O)-O).

Adicionalmente presentan bandas en la zona 1243-1110 cm^{-1} asociadas con el estiramiento de los enlaces C(O)-O y C-O (Riaublanc *et al.*, 2000).

La lactosa muestra el estiramiento del enlace C-O y la deformación del O-H en la región 1112-1050 cm^{-1} (Grappin *et al.*, 2000). La respuesta del lactato a 1575 cm^{-1} es característica del ion carboxilato (Picque *et al.*, 1993; Mazerolles *et al.*, 2001).

Puesto que en la espectroscopia de infrarrojo, cada enlace químico dentro de una molécula produce bandas específicas, es posible seguir cambios composicionales y moleculares en productos como la leche y el queso, además de realizar el seguimiento de procesos como la maduración del queso.

La espectroscopia de infrarrojo ha sido utilizada para determinar la concentración de los principales parámetros composicionales de la leche (Van de Voort *et al.*, 1992; Luinge *et al.*, 1993). Van de Voort *et al.* (1992) obtuvieron un modelo de calibración para determinar la concentración de sólidos totales, grasa, proteína y lactosa utilizando el espectro de infrarrojo completo (~3000-1000 cm^{-1}). Estos autores mencionan que el uso de la espectroscopia de infrarrojo con Transformadas de Fourier es totalmente aplicable al análisis de la leche, ya que provee resultados comparables a los obtenidos con los analizadores IR para leche clásicos. Luinge *et al.* (1993) correlacionaron los contenidos de grasa, proteína y lactosa determinados por métodos tradicionales con la absorbancia de las bandas a 2854 cm^{-1} y 1746 cm^{-1} (grasa), 1548 cm^{-1} (proteína), y 1041 cm^{-1} (lactosa). Ellos afirman los modelos desarrollados presentaron valores dentro de los límites impuestos por la Federación Internacional de Lácteos (IDF, por sus siglas en inglés).

Para evaluar el proceso de maduración en queso Cheddar, Chen *et al.* (1998) correlacionaron los contenidos de grasa y proteína determinados por métodos clásicos con las áreas integradas de las regiones 1765-1730 cm^{-1} (grasa), 1690-1620 cm^{-1} (Amida I, proteína) y 1570-1535 cm^{-1} (Amida II, proteína). Ellos afirman que la espectroscopia IR puede ser una técnica adecuada para caracterizar los quesos durante la maduración. Guerzoni *et al.* (1999) estudiaron los efectos de diferentes tratamientos de la leche, en el proceso de maduración de queso de cabra. La espectroscopia de infrarrojo mostró que las cinéticas de evolución de los péptidos solubles (1700 a 1330 cm^{-1}), ácidos grasos libres (1740 cm^{-1}, 1160 cm^{-1} y 1100 cm^{-1}),

ácido láctico (1740 cm^{-1}) y carbohidratos (1300-1000 cm^{-1}) fueron diferentes. Vannini *et al.* (2001) evaluaron la pertinencia de la espectroscopia de infrarrojo en el seguimiento de la actividad proteolítica de diferentes cepas de *Yarrowia lipolytica* midiendo los cambios espectrales en las regiones Amida I y Amida II. En trabajos más recientes, Lanciotti *et al.* (2005) midieron la habilidad de cuatro cepas de *Y. Lipolytica* como cultivos de maduración. La actividad proteolítica y lipolítica de estas cepas fue evaluada en las zonas espectrales Amida y lipídica (3100-2800 cm^{-1} y alrededor de 1740 cm^{-1}, respectivamente).

Recientemente, Rodriguez-Saona *et al.* (2006) mostraron la habilidad de la espectroscopia de infrarrojo con reflactancia total atenuada (ATR-FTIR) para proveer buenas estimaciones de humead, grasa y proteínas en quesos Suizos. Karoui *et al.* (2006e) evaluaron el uso de MIR y VIS-NIR para discriminar entre los procesos de elaboración y zonas de muestreo de quesos blandos.

2.3.2 Técnicas separativas

Con la finalidad de obtener una caracterización altamente detallada de cambios en la composición de la leche y quesos se han usado diferentes técnicas separativas entre las que destacan la electroforesis (Urea-PAGE), Isoelectric Focusing (IEF), Cromatografía de Líquidos de Alto Desempeño (HPLC) y la Cromatografía de Gases (CG).

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases ha sido utilizada para evaluar el impacto de la alimentación del ganado en las características sensoriales de la leche (Bendall, 2001).

El perfil de ácidos grasos de la grasa de la leche ha sido utilizado para diferenciar leches producidas a diferentes altitudes. Collomb *et al.* (2002) observaron diferencias significativas en los perfiles de ácidos grasos de leches producidas en tierras bajas, montañas y tierras altas de Suiza. Estos autores observaron que al incrementarse la altitud, se incremento el contenido de los ácidos linoleicos conjugados. Por otro lado, Destaillats *et al.* (in press) describen el uso del perfil de triglicéridos para detección de la adulteración de la grasa de leche con aceites vegetales parcialmente hidrogenados.

Para determinar el origen geográfico de quesos Emmental se han utilizado diferentes perfiles de composición como los perfiles en ácidos grasos libres (AGL), triglicéridos, y ácidos grasos (FAMES) (Pillonel *et al.*, 2002) así como los perfiles de compuestos volátiles (Pillonel *et al.*, 2003a).

Cromatografía de Líquidos

Feinberg *et al.* (2006) evaluaron la concentración de diferentes compuestos en leches sometidas a 5 tratamientos térmicos con la finalidad de identificar los compuestos que pueden ser utilizados como trazadores del tratamiento térmico. Los modelos obtenidos con los compuestos que miden las modificaciones estructurales en la proteína de la leche fueron más discriminates que los obtenidos para los metabolitos de las reacciones de Maillard.

La cromatografía de líquidos (HPLC) se ha utilizado para caracterizar la proteólisis en quesos mediante la evaluación de los perfiles de caseínas y de péptidos a partir de diferentes fracciones nitrogenadas obtenidas por precipitación selectiva.

Para discriminar quesos Emmental en función de la región de producción, Pillonel *et al.* (2003a) utilizaron la concentración de los aminoácidos libres asparagina, glicina, licina, fenilalanina y prolina, así como las fracciones caseícas α_{s1} y la codificada como X3. Hynes *et al.* (2003) discriminaron entre quesos Reggianito Argentino con diferentes grados de maduración mediante el perfil de péptidos de la fracción de nitrógeno soluble en agua, idenpendientemente de las cepas utilizadas

2.4 Métodos estadísticos utilizados en la discriminación de productos

Los métodos estadísticos multivariados han cobrado gran importancia en la discriminación o diferenciación de productos ya que permiten extraer información importante de grandes bases de datos.

El uso de estas técnicas para evaluar el proceso de maduración de quesos ha sido reportada en la literatura. Karoui *et al.* (2003) revisaron diferentes herramientas quimiométricas que pueden ser utilizadas para analizar datos espectroscópicos y correlacionarlos con información química, física o con otra información espectral para extraer información prominente cerca de la estructura

molecular de las proteínas y grasas de quesos. Coker *et al.* (2005) hicieron una revisión de los métodos quimiométricos (PCA, MLR, PLS, etc.) con el objetivo de predecir la madurez de los quesos a partir de datos de la proteólisis, concluyendo que no existe una mejor combinación entre métodos analíticos y estadísticos que pueda ser recomendada para cada situación.

A continuación se presentan algunos de los métodos estadísticos multivariados más utilizados para el tratamiento de los datos obtenidos vía analítica, y que son más utilizados en la diferenciación o discriminación de productos lácteos

2.4.1 Análisis de Componentes Principales (ACP)

Utilizando la Regresión por Componentes Principales (RPC) de los espectros de infrarrojo medio, Luinge *et al.* (1993) obtuvieron un modelo para la determinación en línea del contenido de grasa, proteína y lactosa en leche.

Dufour *et al.* (2000) describieron el uso el ACP de la región 3000-2780 cm^{-1} de los espectros infrarrojo de quesos para evaluar cambios durante la maduración en la cristalización de triglicéridos. Por otro lado, Mazerolles *et al.*, (2001) utilizando el mismo método estadístico, identificaron bandas específicas en las zonas Amida I (1650 y 1620 cm^{-1}) y Amida II (1580, 1560 y 1555 cm^{-1}) que permitieron discriminar entre diferentes estados de maduración de quesos semiduros. Posteriormente, Karoui *et al.* (2006e) aplicaron el ACP a los espectros MIR (3000-900 cm^{-1}) y VIS-NIR (315-1700 nm) de quesos blandos para discriminar entre sus procesos de elaboración y zonas de muestreo. El mejor modelo lo obtuvieron concatenando los espectros de las dos regiones del infrarrojo, lo que permitió la clasificación correcta del 90,7 % y 80,6 % de las muestras de calibración y validación respectivamente.

Hynes *et al.* (2003) aplicaron el ACP a los perfiles de péptidos solubles en agua de quesos Reggianito Argentino, agrupando las muestras en función del tiempo de maduración.

2.4.2 Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

El método de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) ha sido utilizado para determinar la concentración de diferentes componentes en leche, así como para predecir diferentes parámetros de autenticidad, como es el grado de maduración en quesos.

Esta técnica estadística ha sido utilizada para la cuantificación de diferentes parámetros composicionales en leche a partir de sus espectros de infrarrojo. Van de Voort *et al.* (1992) aplicando PLS a los espectros completos de infrarrojo, desarrollaron un modelo para cuantificar sólidos totales, grasa, proteína y lactosa. Luinge *et al.* (1993) desarrollaron un modelo PLS para determinar el contenido de grasa, proteína y lactosa a partir de la absorbancia de bandas específicas de los espectros de infrarrojo medio con un error de estimación del 0,027 % y del 0,024 % para los modelos de calibración y validación.

Poveda *et al.* (2004b) mostraron mediante PLS, que el pH, la a_w y la materia seca son las variables mas importantes para predecir el tiempo de maduración en quesos Manchego. Para quesos comerciales madurados hasta por 150 días, el error de predicción obtenido fue de 11,9 días. Usando las mismas variables y fracciones nitrogenadas con un modelo PLS, García Ruiz *et al.*, (1998) predijeron el tiempo de maduración en quesos Manchego madurados entre 60 y 150 días con un error de 10,3 días. Omar *et al.* (1999) mostraron que la concentración de ác. Glutámico, lisina y ác. aspártico son buenos indicadores en la determinación del tiempo de maduración en queso Kariesh. Los mejores resultados para diferenciar la edad de queso Ragusano fue obtenida por una combinación de los datos analíticos de los cromatogramas de péptidos y aminoácidos con una regresión PLS (Fallico *et al.*, 2004).

Esta técnica ha sido utilizada también para predecir diferentes parámetros fisicoquímicos a partir de datos espectrales. Skeie *et al.* (2006) desarrollaron buenos modelos para predecir la concentración de aminoácidos libres seleccionados a partir de espectros de infrarrojo cercano (NIR) de quesos noruegos. El contenido de nitrógeno no proteico (NNP) y nitrógeno soluble en agua (WSN) así como el pH han sido predichos con una buena precisión a partir de los espectros de infrarrojo medio (MIR) en quesos Emmental europeos producidos durante el verano (Karoui *et al.*, 2006c) y durante el invierno (Karoui *et al.*, 2006d). Los contenidos de grasa y nitrógeno total (NT) fueron estimados con una menor precisión pero los resultados se mejoran utilizando los espectros NIR (Karoui *et al.*, 2006a).

En la revisión bibliográfica mostrada anteriormente se puede observar que existe una vaiedad de métodos analíticos y estadísticos que han sido empeados para discriminar la leche y

quesos en función de diferentes criterios como su región de origen, edad, temporada de elaboración entre otros, mediante la utilización de diferentes parámetros que marcan las diferencias entre ellos, tales como el cambio en las bandas espectrales, la concentración de compuestos diferentes compuestos (ácidos grasos, aminoácidos, fracciones nitrogenadas, etc.), entre otros.

Segunda sección
MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 3. Leche

El establecimiento de metodologías para determinar la autenticidad de los alimentos en general y de la leche y productos lácteos en particular, requiere de la identificación de los parámetros de que permiten discriminar entre éstos en función de criterios establecidos para dicha discriminación.

En la presente sección, dividido en tres capítulos, se presenta el trabajo experimental realizado con la finalidad de identificar los parámetros que permitan discriminar la leche de productos similares, así como para discriminar los quesos Camembert y Emmental en función de su estado de maduración.

El trabajo experimental con leche se llevó a cabo en dos etapas. La primera etapa consistió en la selección y montaje de metodologías analíticas que permitieran discriminar entre leche y productos lácteos, para lo cual se utilizó como sujeto de estudio muestras de leche y productos similares con diferencias en su composición.

De las metodologías rápidas reportadas en la blibliografía por su utilización en la discriminación de alimentos, se seleccionó la técnica de espectroscopia de infrarrojo. Los resutados obtenidos fueron comparados con un método de referencia, para lo cual se eligió la determinación del perfil de ácidos grasos especificada en la NOM-155-SCFI-2003 para la caracterización de la grasa de leche.

En la segunda etapa, de las metodologías implementadas en la primera etapa, se eligieron las que presentaron mejores resultados y se utilizaron para discriminar entre muestras de leche autenticas y muestras adulteradas intencionalmente con grasas exógenas.

3.1 Muestras

3.1.1 Leche y productos similares

Las muestras de leche y productos similares utilizadas fueron adquiridas en mercados locales. En total se utilizaron 21 productos diferentes sometidos a ultra pasteurización (UHT) en presentación de 1 L. Se adquirieron 2 unidades de un mismo lote por marca y tipo.

Al momento de selección de los productos (diciembre de 2002), en el mercado mexicano se comercializaban sólo leches y fórmulas lácteas. Las marcas seleccionadas fueron las marcas líderes que se encontraban en el mercado local al momento de la adquisición.

En la selección de los productos se consideraron diferentes criterios vigentes en esa época. Deacuerdo con las denominaciones aceptadas en la NMX-026-1997-SCFI (1997), se adquirieron productos etiquetados como leche y fórmula láctea con diferencias composicionales en el contenido de grasa y de carbohidratos (Tabla 3.1).

En función del contenido de grasa, se seleccionaron 7 productos con una concentración >30 g L^{-1} (enteras), 10 con una concentración máxima de 28 g L^{-1} y mínima de 6 g L^{-1} (semidescremadas) y 4 muestras con una concentración máxima de 4 g L^{-1} (descremadas).

En función del contenido de lactosa, se seleccionaron 16 muestras con lactosa u otro carbohidrato con una concentración máxima de 50 g L^{-1} y mínima de 43 g L^{-1} ; y 5 muestras con una concentración máxima de lactosa de 8,5 g L^{-1} (deslactosadas).

De acuerdo con la información declarada en la etiqueta correspondiente a los criterios de la NMX-026-1997-SCFI (1997), 16 muestras correspondieron a leche (L) y 5 a fórmulas lácteas (FL).

En la época de adquisición de las muestras, se publicó el PROY-NOM-155-SCFI-2001 (2002), que dio origen a la NOM-155-SCFI-2003 (2003). Con la finalidad de verificar la pertinencia de las técnicas para discriminar la leche y productos similares bajo los nuevos criterios de la normatividad, las muestras fueron reclasificadas. Según los criterios de denominación de la (NOM-155-SCFI-2003, 2003) y los ingredientes declarados en la etiqueta, 16 muestras fueron clasificadas como leche (L), 4 como producto lácteo combinado (PLC) y 1 como fórmula láctea (FL).

Las muestras fueron almacenadas bajo temperatura controlada a 18 ºC hasta el momento del análisis. Cada muestra fue analizada y/o procesada el día de su apertura con la finalidad de evitar cambios en el producto a lo largo del tiempo. El orden de las muestras para el análisis se estableció de forma totalmente aleatorizada.

Tabla 3.1. Clasificación de las muestras de productos comerciales utilizados en la discriminación.

MARCA	CARACTERÍSTICAS DE COMPOSICIÓN	CLASIFICACIÓN SEGÚN				CLAVE
		GRASA[a]	LACTOSA[b]	ETIQ.[#]	NOM [&]	
A	Suero de leche, fructosa, aceite de canola, caseinato de sodio	SD	- - -	FL	PLC	A
B	Leche descremada en polvo, grasa vegetal, proteína concentrada de suero	E	N	FL	PLC	B1
		E	N	FL	PLC	B2
C	Leche entera, leche descremada en polvo, grasa butírica, proteína concentrada de suero	E	N	FL	FL	C
D	Leche descremada en polvo, suero de leche en polvo, grasa vegetal, glucosa, concentrado de proteína de leche	SD	N	FL	PLC	D
E	Leche parcialmente descremada	D	N	L	L	E
F	Leche	D	N	L	L	F1
		SD	N	L	L	F2
		E	N	L	L	F3
G	Leche de vaca	D	N	L	L	G1
		SD	N	L	L	G2
		E	N	L	L	G3
H	Leche parcialmente descremada, mezcla de aceites vegetales (canola, maíz o girasol)	SD	N	L	L	H1
		SD	N	L	L	H2
I	Leche parcialmente descremada	SD	N	L	L	I
J	Leche fresca, lactasa	E	DL	L	L	J1
		SD	DL	L	L	J2
K	Leche de vaca, enzima lactasa	SD	DL	L	L	K1
		D	DL	L	L	K2
		E	DL	L	L	K3
L	Leche fresca	SD	N	L	L	L

[a] Grasa: E: Entera, SD: Semidescremada y D: Descremada
[b] Lactosa: N: Normal, DL: Deslactosada
[#] Etiqueta: L: Leche, FL: Fórmula Láctea
[&] NOM-155-SCFI-2003 (2003): L: leche, FL: Fórmula Láctea, PLC: Producto Lácteo Combinado

3.1.2 Adulteración con grasa exógena

Las muestras correspondieron a leche de vaca UHT con un contenido en grasa de 0 g L^{-1} declarado en la etiqueta, adicionadas con grasa nativa de leche o de mezclas de ésta con grasas exógenas.

La leche utilizada correspondió a 24 unidades en presentación de 1 L pertenecientes a un solo lote adquiridas en el comercio. Éstas fueron almacenadas a temperatura controlada de 18 ºC hasta el momento del análisis.

En el diseño experimental para la adulteración se utilizaron 1 grasa nativa de leche y 4 grasas exógenas con 5 niveles de concentración y 3 repeticiones. La grasa nativa (MGT) con un contenido total de grasa del 42 %, se obtuvo a nivel industrial a partir de un solo lote de leche por desnatado antes de la pasteurización. Las grasas exógenas utilizadas fueron aceite de coco (MGA), aceite de soya (MGB), aceite de canola (MGC) y grasa butírica (MGD). Los niveles de adulteración correspondieron a 0 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % p/p respecto a la grasa total (niveles 0 al 4).

Las mezclas lipídicas fueron preparadas adicionando la grasa exógena a la nativa para alcanzar la proporción correspondiente al nivel de adulteración, fueron fundidas a 30 ºC en baño de agua para lograr una correcta homogeneización. Una vez homogeneizadas se almacenaron en frascos ámbar a -20 ºC hasta su utilización.

Cada día se abrió una nueva unidad de leche, se tomaron alícuotas de 50 mL que fueron adicionadas con 30 g L^{-1} de la mezcla de grasa en un orden totalmente aleatorizado. La incorporación de la grasa en la leche se realizó con ayuda de un homogeneizador escala laboratorio (fabricado en el CIATEJ) y fueron analizadas inmediatamente.

3.2 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

Las muestras de leche y productos similares fueron analizadas por espectroscopia de infrarrojo trasformadas de Fourier (FTIR) en las regiones de infrarrojo medio (MIR) y de infrarrojo cercano (NIR). Para cada muestra se obtuvieron 5 espectros (n=5) en cada región espectral. El orden de lectura fue el mismo para las dos regiones y correspondió al orden aleatorio

establecido para la apertura o preparación de las muestras. Las lecturas de las réplicas de los espectros se tomaron de forma consecutiva.

3.2.1 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Medio (MIR)

Para el análisis por espectroscopia de infrarrojo medio (MIR), los espectros fueron adquiridos en la región 4000-400 cm^{-1} utilizando un espectrómetro Magna Protegé 460 (Nicolet Instrument Co., Madison, USA) equipado con un detector DTGS-KBr (sulfato de triglicina deuterada-bromuro de potasio) y un accesorio de Reflactancia Total Atenuada horizontal (ATR) de ZnSe (45º y 12 reflexiones). La adquisición se realizó utilizando el operador de datos Omnic V. 3.1a.

Las muestras fueron colocadas directamente en la cubeta del ATR y fueron cubiertas con la tapa propia del ATR para evitar su evaporación. Para cada espectro se tomaron un total de 200 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} (espaciado de datos 1,928 cm^{-1}) y les fue substraído el espectro de agua destilada. Se utilizó la apodización Happ-Gentzel sin corrección. Los espectros así obtenidos fueron utilizados directamente para los análisis estadísticos.

3.2.2 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIR)

Para el análisis por espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), los espectros fueron adquiridos en la región 10 000-4 000 cm^{-1} con un espectrómetro Avatar 360N (Nicolet Instrument Co.) equipado con un detector InGaAs (Indio Galio Arsénico) y un accesorio de Reflactancia Total Atenuada horizontal (ATR) de ZnSe (45º y 12 reflexiones). La adquisición se realizó utilizando el operador de datos Omnic v. E.S.P. 5.2a.

Las muestras fueron colocadas directamente en la cubeta del ATR y fueron cubiertas con la tapa propia del ATR para evitar su evaporación. Para cada espectro se tomaron un total de 200 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} (espaciado de datos 1,928 cm^{-1}) y les fue substraído el espectro de agua destilada. Se utilizó la apodización Happ-Gentzel y corrección Mertz. Los espectros así obtenidos no fueron sometidos a corrección alguna antes de realizar los análisis estadísticos correspondientes.

3.3 Extracción y purificación de la grasa

El método descrito por Folch *et al.* (1957) con modificaciones fue utilizado para extraer la grasa de las muestras de leche y productos similares así como para purificar las mezclas lipídicas. A una alícuota de 10 mL de leche o de 10 g de la mezcla lipídica se le adicionaron 5 mL de cloroformo HPLC (Caledon, Georgestown, Canada), 10 mL de metanol HPLC (Analytyka, Monterrey, México) y 0,05 mL de una solución de $MgCl_2$ (Merck, Darmstadt, Alemania) al 20 % p/v.

Después de agitar la mezcla 5 min con un agitador vortex, se añadieron 5 mL de cloroformo y se agitó nuevamente durante 2 min. Se añadió agua destilada hasta completar un contenido total de agua de 9,0 mL incluyendo el agua de la muestra, agitándolo nuevamente durante 0,5 min. El extracto fue filtrado a través de papel filtro Whatman No. 40, seguido de una centrifugación a 1 500 rpm durante 5 min y se eliminó la capa superior acuosa.

A la capa de cloroformo se le añadió 10 mL de una solución de NaCl (J.T. Baker, Xalostoc, México) al 0,1 % p/v y se mezcló suavemente. Después de centrifugación por 5 min a 1 500 rpm, la capa acuosa superior fue eliminada. La capa inferior fue deshidratada con Na_2SO_4 anhidro (Mallinckrodt, Paris, USA) y colocado en un tubo seco.

El cloroformo fue evaporado en baño de vapor, cualquier residuo de éste fue eliminado colocando el tubo en una estufa a 100 ºC durante 5 min. La grasa así obtenida fue colocada en frascos ámbar y almacenada a -20 ºC hasta su análisis por cromatografía de gases (CG).

3.4 Perfil de ácidos grasos

Los metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) de las muestras de grasa purificada fueron obtenidos por transesterificación con metóxido de sodio. A 50 mg de grasa purificada se le agregaron 0,90 mL de éter de petróleo (Caledon) y 0,10 mL de solución 0,5 N de metóxido de sodio en metanol (Aldrich, St. Louis Missouri, USA). Después de una agitación de 5 s con un agitador vortex, la muestra se dejó reposar durante 5 min. La capa superior conteniendo los FAMES fue analizada directamente por cromatografía de gases (CG).

Para la cuantificación, los FAMES fueron separados con una columna HP-23 (50% cianopropil, 50% metil polixilosano) de 60 m x 250 μm x 0,25 μm (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) colocada en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 6890) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y un muestreador automático (HP 6890 Series). En el inyector a 250 ºC y con una relación split 300:1, se inyectaron 0,5 μL de muestra. Se utilizó He como gas acarreador con un programa de flujo. El flujo inicial fue establecido a 1,40 mL min^{-1} durante 20 min, descendiendo entonces fue diminuido con un gradiente de 0,80 mL $(min^2)^{-1}$ hasta 0,60 mL min^{-1} y mantenido así durante 10 min. En seguida fue incrementado hasta 1,2 mL min^{-1} con un gradiente de 0,80 mL $(min^2)^{-1}$ donde se mantuvo hasta el final del análisis.

La temperatura de la columna se estableció a 40 ºC manteniéndose durante 5 min después de la inyección. Entonces se incrementó a una velocidad de 25 ºC min^{-1} hasta 180 ºC. Después de 30 min se incrementó hasta 250 ºC a una velocidad de 5 ºC min^{-1} manteniéndose hasta el final del análisis.

La cuantificación de los FAMES se realizó por estandarización externa. Se calibraron 35 metil ésteres de ácidos grasos (Tabla A.1 del Anexo A) utilizando estándares de referencia con una pureza mínima de 97,6 % (Supelco, Bellefonte, USA) y 8 niveles de concentración en una gama desde 0,04 mg mL^{-1} hasta 35,5 mg mL^{-1}. La correlación mínima obtenida para todos los compuestos fue $R > 0,999$ con excepción de los ácidos elaídico ($R = 0,997$), nervonico $R = 0,9951$) y eicosapentaenoico ($R = 0,995$). La cuantificación de los FAMES no incluidos en la calibración se realizó utilizando la calibración del ácido graso con el peso molecular más próximo a éste.

Una vez obtenida la concentración individual de los ácidos se calculó la proporción porcentual de éstos en la muestra, con la finalidad de eliminar posibles variaciones debidas al análisis cromatográfico.

La identificación de los FAMES no calibrados se realizó por medio de espectrometría de masas (MS). Los compuestos fueron separados en la misma columna utilizada para la cuantificación, colocada en un cromatógrafo de gases 5890 Series II (Hewlett Packard) acoplado a un detector selectivo de masas (HP 5972) y equipado con un muestreador automático (HP 7673). En el inyector a 250 ºC y con una relación de split 1:1, se inyectaron 0,5 μL de muestra.

Se utilizó He como gas acarreador con un flujo de 0,7 mL min^{-1}. La temperatura de la columna fue la misma utilizada para la cuantificación.

Los cromatogramas de iones totales fueron adquiridos en modo de impacto de electrón (EI) a 70 eV, con una velocidad de rastreo de 1,6 barridos s^{-1} y un rango de masas de 30-350 uma. La identificación se realizó por comparación con la biblioteca Wiley 275.

3.5 Análisis estadísticos

Análisis de componentes pincipales

El Análisis de Componentes Principales (ACP) fue aplicado a los perfiles de FAMES con la finalidad de evaluar las diferencias entre muestras de leche y productos similares, así como entre leches autenticas o adulteradas con grasas exógenas.

El ACP hace posible obtener una visión general de la información de los perfiles de composición completos reemplazando las variables originales por algunas nuevas variables llamadas Componentes Principales (CP). Los CP contienen casi toda la información y son ortogonales entre ellos.

Análisis de discriminante de perfiles espectrales

El análisis discriminante se aplicó separadamente a los grupos de espectros de infrarrojo de leche y productos similares en las regiones del medio (3000-950 cm^{-1}) y cercano (10000-4000 cm^{-1}), y para el grupo de espectros de infrarrojo medio de las leches adulteradas intencionalmente.

Los espectros fueron analizados directamente sin corrección. Para cada región del infrarrojo se obtuvieron dos modelos discriminantes, según la información de la etiqueta y según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003 (2003). Los análisis estadísticos se realzaron utilizando el programa TURBOQUANT v.1.0.0.10 (Nicolet Instrument Co.).

Análisis de discriminante general

El Análisis Discriminante General (ADG) se aplicó a los perfiles de FAMES con la finalidad de evaluar el potencial de los perfiles de éstos compuestos para discriminar entre

muestras de leche y productos similares, así como entre leches adulteradas o no con grasa exógena. Para la construcción de los modelos discriminantes se utilizó el programa STATISTICA versión 6 (StatSoft, Francia). El ADG es una técnica estadística que permite generar reglas discriminantes con la finalidad de clasificar las unidades experimentales en dos o más poblaciones definidas de manera única. Mediante la selección de un subconjunto de variables medidas no correlacionadas que permitan alcanzar una discriminación exitosa, éste análisis permite reducir el número de variables iniciales. Su objetivo es poder predecir la pertenencia de un individuo a una clase particular en base a un conjunto de variables predictoras.

La discriminación entre las muestras de leche y productos similares se realizó tomado como criterios de clasificación la información declarada en la etiqueta y los criterios de la NOM-155-SCFI-2003 (Tabla 3.1). La colección de datos fue dividida en 2 grupos, un grupo de calibración (11 muestras) y un grupo de validación cruzada (10 muestras). La validación cruzada permite evaluar el desempeño del método, produciendo estimaciones de la probabilidad de una clasificación errónea.

La discriminación entre muestras adulteradas con grasas exógenas se realizó utilizando como criterios la presencia de adulteración (Autenticidad) y los niveles de adulteración. Ambos criterios fueron evaluados para cada grasa adulterante de forma individual y para el conjunto de éstas. Las colecciones de datos fueron divididas en dos grupos, uno de calibración y uno de validación cruzada. Para los grupos de calibración se separaron 8 muestras para MGA, 6 muestras para MGB, 7 muestras para MGC, 8 muestras para MGD y 25 muestras para el global. Los grupos de validación cruzada estuvieron formados por 7 muestras para MGA, 6 muestras para MGB, 7 muestras para MGC, 7 muestras para MGD y 22 muestras para el global.

Con la finalidad de disminuir el tamaño del modelo y evitar un problema de sobre ajuste, se realizó una selección de los compuestos discriminantes más significativos utilizando los métodos de selección ascendente o descendente (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) según el modelo. Este proceso de selección está basado en la evaluación de una hipótesis de medias iguales de los grupos para cada variable candidata a discriminadora. Las variables seleccionadas son aquellas cuyo valor de F es significativo ($p<0,05$).

Las distancias Mahalanobis al cuadrado y su nivel de significancia ($p<0,05$) fueron calculados para cada uno de los grupos de datos La distancia Mahalanobis es la distancia

estadística entre dos puntos y toma en consideración las varianzas y covarianzas de las variables medidas y está definida por (Ecuación 3.1):

$$\mathrm{MD}_{ik}^{2} = \frac{1}{1-r^{2}}\left[\frac{\left(x_{i1}-x_{k1}\right)^{2}}{s_{1}^{2}} + \frac{\left(x_{i2}-x_{k2}\right)^{2}}{s_{2}^{2}} + \frac{2r\left(x_{i1}-x_{k1}\right)\left(x_{i2}-x_{k2}\right)}{s_{1}\,s_{2}}\right] \qquad (3.1)$$

Donde x_1 y x_2 son variables, i y k son observaciones, s_1 y s_2 son respectivamente las varianzas de las variables 1 y 2, r es el coeficiente de correlación entre las dos variables.

Capítulo 4. Queso Camembert

4.1 Producción de muestras y maduración

Las muestras de queso utilizadas provinieron de dos lotes experimentales de quesos blandos madurados por hongos superficiales, elaborados a escala piloto en la Unidad Mixta de Investigación de Ingeniería y Microbiología de Procesos Agroalimentarios (UMR-GMPA por sus siglas en Francés, Thiverval-Grignon, Francia). Los quesos fueron elaborados bajo condiciones asépticas utilizando la tecnología industrial para la producción de queso Camembert descrita por Leclercq-Perlat *et al.* (2004) cuya metodología se describe en el Anexo A.1. La leche utilizada en su fabricación fue obtenida de la granja experimental del Instituto Nacional Agronómico Paris-Grignon (INA-PG por sus siglas en Francés, Thiverval-Grignon, Francia).

Después del proceso de salado (día 1), los quesos fueron transferidos a una cámara de maduración de 2 m^3 previamente esterilizada con ácido peracético (SEPPIC, Paris, Francia). Inicialmente fueron mantenidos a 13 °C ± 1 °C y una humedad relativa del 85 % ± 2 % (HR) durante 24 h. A partir del segundo día (escrito d2) la humedad se incrementó hasta el 95 % ± 2 % HR que fue mantenida hasta d15. En d15 los quesos fueron embalados y dejados a madurar a 4 ºC y humedad desconocida hasta d27.

4.2 Muestreo

Para cada uno de los lotes experimentales, diariamente se removió un queso completo de la cámara de maduración entre d1 y d10. Posteriormente, se retiró un queso completo por día en los días d13, d15, d17, d20 y d27.

Antes de realizar los análisis, los quesos muestreados fueron seccionados según el método de Le Graët y Brûlé (1988) descrito por Leclercq-Perlat *et al.* (2004). De la superficie del queso se separó la corteza de 3 mm que fue desechada. Los cuerpos de los quesos fueron rebanados horizontalmente para obtener dos secciones. El corazón (C) correspondió a la parte central de 8 mm de espesor y la subcorteza (SC) fue la sección entre la corteza y el corazón (Figura 4.1).

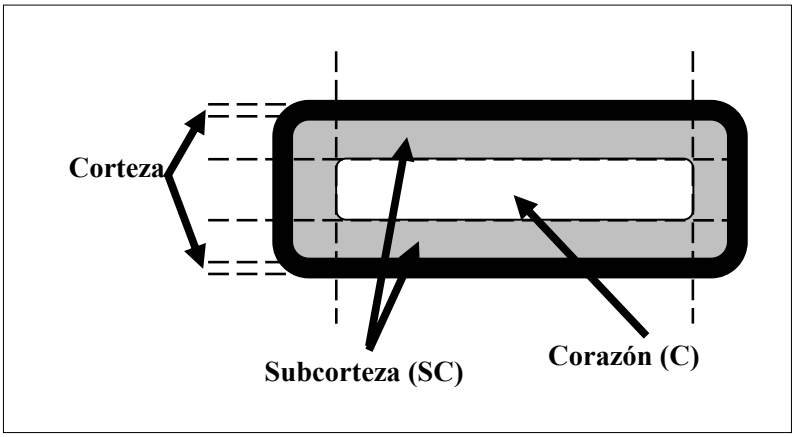


Figura 4.1. Esquema del seccionamiento de los quesos Camembert.

Las dos secciones obtenidas en cada punto de muestreo fueron analizadas por métodos fisicoquímicos y por espectroscopia de infrarrojo medio (FTIR). Adicionalmente fueron fraccionadas separadamente.

4.3 Análisis fisicoquímicos

En las muestras de la subcorteza se determinaron el pH, la materia seca (MS), la lactosa, el ácido láctico según la metodología descrita por Leclercq-Perlat *et al.* (1999), mientras que, para las fracciones nitrogenadas como Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), Nitrógeno no Proteico (NNP), amoniaco (NH_4^+) y Nitrógeno Total (NT) se utilizó la metodología descrita por Leclercq-Perlat *et al.* (2000). La lactosa y el ácido láctico fueron determinadas adicionalmente en las muestras de corazón. La descripción detallada de las metodologías se muestra en el Anexo A (Secciones A.1-A.3).

4.4 Fraccionamiento para análisis espectroscópico

Los métodos de fraccionamiento para las muestras a ser analizadas por espectroscopia de infrarrojo medio (FTIR) fueron seleccionados entre aquellos descritos por Christensen *et al.* (1991) teniendo como criterio aquellos métodos que no ocultaran la señal propia de las muestra. Para la disolución de las muestras se utilizó el método de Kuchroo y Fox (1982) con algunas modificaciones.

Se tomaron 10 g de la muestra de queso y se dispersaron en 10 mL de agua desionizada con un homogeneizador Polytron PT 2100 (Polytron, Kinematica AG, Switzerland) durante 5 min. El homogeneizado obtenido se incubó en un baño María a 40 ºC durante 1 h seguido de una segunda homogeneización con el procedimiento descrito arriba. Después de centrifugar la suspensión obtenida durante 30 min a 4 ºC y 3 000 G, la capa superior de grasa solidificada (NPF) fue removida y conservada a -20 ºC hasta su purificación. Las dos capas inferiores fueron re-homogeneizadas y la suspensión desgrasada (DCS) fue conservada a -20 ºC.

Una alícuota de 1 mL de DCS fue diluida en proporción 1:2 v/v con agua desionizada y posteriormente fue ajustada a 4,6 ± 0,05 con HCl 1N. Después de centrifugación por 30 min a 4 ºC y 3 000 G, el precipitado de caseínas (CN) fue separado y mantenido a -20 ºC. El sobrenadante correspondiente al NSA fue filtrado a través de papel filtro Whatman No. 42 y mantenido a -20 ºC.

La fracción NSA fue a su vez fraccionada por precipitación con etanol. A una alícuota de 10 mL se le adicionó etanol absoluto (Carlo Erba Reactifs SA, France) hasta alcanzar una concentración de 70% de etanol (v/v) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 h. Después durante 30 min a 4 ºC y 3 000 G. El sobrenadante (NS-EtOH) fue separado del precipitado (NI-EtOH) y se conservó a 20 ºC. Con la finalidad de incrementar la concentración, 10 mL de NS-EtOH fueron concentrados a 40 ºC mediante una corriente de nitrógeno gas hasta un volumen final de 3 mL.

El total del precipitado de NI-EtOH fue disuelto en 2 mL de una solución tampón 50 mM (pH 7,5) Tris-HCl (Tris-(hidroximetil)-aminomethano) conteniendo 1 mM EDTA (Ácido Etilendiamino-Tetracético) (Prolabo). Después de la adición del tampón, las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 1 h agitándolas con vortex cada 15 min y fueron colocadas a -20 ºC.

Para la purificación de la grasa se utilizó la metodología descrita por Anderson *et al.* (1974) con algunas modificaciones. Al total de NPF recuperada el primer paso del fraccionamiento fue colocado en un tubo de centrífuga y se le adicionaron 5 mL de agua desionizada y se incubaron en un baño María a 40 ºC durante una hora seguidos de una centrifugación a 4 ºC durante 30 min a 3 500 rpm. La capa sólida en la superficie correspondiente a la grasa purificada (PF) fue recuperada y mantenida a -20 ºC.

4.5 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Medio (FTIR)

Segmentos de 7 cm x 1 cm x 0,5 cm de las muestras de queso, la PF, la CN y las soluciones DCS, NSA, NS-EtOH y NI-EtOH fueron analizadas por espectroscopia de infrarrojo medio con transformadas de Fourier (FTIR).

Los espectros de las muestras fueron adquiridos en la región 4 000-400 cm^{-1} con un espectrómetro Magna IR-750 (Thermo Electron, Francia) equipado un detector DTGS (sulfato de triglicina deuterada) y un accesorio de Reflactancia Total Atenuada horizontal (ATR) de ZnSe (45º y 12 reflexiones).

Las rebanadas de queso, PF y CN, fueron colocadas en la cubeta del ATR y fueron cubiertas con la tapa del ATR sin ninguna presión suplementaria. Las otras fracciones nitrogenadas fueron analizadas directamente sin evaporación del agua. Después de colocar las muestras en el ATR se dejaron estabilizar durante 5 min antes del análisis. Para cada espectro se tomaron un total de 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} (espaciado de datos 1,928 cm^{-1}) y les fue substraído el espectro del cristal del ATR. Se utilizó la apodización Happ-Gentzel sin corrección. Para verificar la consistencia de las mediciones espectroscópicas a lo largo del tiempo se utilizó el programa Val Q (Thermo Nicolet, Francia).

Una vez obtenidos, cada uno de los espectros de las muestras le fue substraído el espectro del agua, con la finalidad de eliminar la fuerte absorción que este compuesto presenta en la región de análisis, y se corrigió el desplazamiento de la línea base debido al ATR. Ambas operaciones se realizaron utilizando el programa OMNIC 4.1a software (Thermo Electron, Francia). Para la substracción del espectro de agua se tomó como referencia la metodología descrita por Powell *et al.* (1986) y Dousseau *et al.* (1989). Debido a que en las muestras de queso existe un pico en la región 1800-1700 cm^{-1}, sólo el área entre 2 300 cm^{-1} y 1900 cm^{-1} fue considerada para calcular el factor de substracción. La corrección de la línea base se realizó de forma manual en 6 puntos del espectro, a 3000 cm^{-1}, 2850 cm^{-1}, 1800 cm^{-1}, 1700 cm^{-1}, 1490 cm^{-1} y 950 cm^{-1}.

4.6 Análisis estadísticos

Con la finalidad de eliminar el efecto de posibles variaciones del contenido de MS a lo largo de la maduración, antes de realizar los análisis estadísticos, los espectros completos

corregidos de los quesos, PF y DCS fueron normalizados dividiendo cada valor de absorbancia entre la suma de todos los valores del espectro (Bertrand, 2000). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATISTICA versión 6 (StatSoft, Francia).

Análisis de correlación

El análisis de correlación fue realizado con la finalidad de evaluar la relación entre los diferentes parámetros fisicoquímicos evaluados ($p<0,05$).

Análisis de varianza

El análisis de Varianza (ANOVA) fue realizado para cada grupo de espectros de los quesos así como para cada una de las diferentes fracciones obtenidas con la finalidad de identificar las bandas que mostraban cambios de absorbancia significativos durante la maduración ($p\leq0,05$). La prueba de la mínima varianza significativa de Fisher (LSD) se realizó para cada variable significativa y sus intervalos de confianza fueron calculados usando la media cuadrada del error de cada ANOVA.

Análisis de componentes principales

El Análisis de Componentes Principales (ACP) fue aplicado a los resultados fisicoquímicos y a los grupos espectrales separadamente con la finalidad de evaluar su evolución a lo largo de la maduración de forma independiente.

En el caso de los grupos espectrales, el ACP fue aplicado a los mismos grupos analizados por ANOVA con la finalidad de evaluar la evolución espectral global durante la maduración y no sólo la de algunas bandas seleccionadas.

El ACP hace posible obtener una visión general de la información de los espectros completos reemplazando las variables originales por algunas nuevas variables llamadas Componentes Principales (CP). Los CP contienen casi toda la información y son ortogonales entre ellos.

Regresión por mínimos cuadrados parciales

Se realizaron dos análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), el primero se utilizó para predecir el tiempo de maduración y el segundo para establecer los modelos de regresión entre los datos fisicoquímicos y espectroscópicos. La PLS es una técnica de compresión de datos que provee buenas correlaciones en casos de colinearidad como es el caso de los datos espectrales. Ésta maximiza la covarianza entre valores PLS sucesivos y las variantes aleatorias. Una de las cuestiones más importantes en la regresión PLS es determinar el tamaño del modelo para describir la fuente importante de variación pero sin ajustarlo en exceso

En el primer análisis, se utilizaron los conjuntos de datos espectrales de las secciones corazón y la subcorteza de los quesos. El tiempo de maduración fue calculado tomando en consideración el día de muestreo y el espectro FTIR obtenido para cada muestra. Los espectros de las muestras fueron divididos en dos grupos, un grupo de calibración (17 muestras) y un grupo para validación cruzada (8 muestras).

En el segundo análisis, se utilizaron los datos espectrales de la subcorteza en conjunto con los resultados fisicoquímicos obtenidos para la misma sección. Entonces, los valores fisicoquímicos fueron divididos en un grupo de calibración y uno de validación cruzada. Para el grupo de validación se tomaron 17 muestras para pH, MS, NSA, NNP y NH_4^+ y 33 muestras para lactosa y ácido láctico. Para el grupo de validación cruzada se tomaron 8 muestras para pH, MS, NSA, NNP y NH_4^+ y 16 muestras para lactosa y ácido láctico.

El número de factores para la calibración PLS fue determinado usando el valor mínimo de la Suma de Cuadrados del Error Residual de Predicción (PRESS). La calidad de los modelos de regresión fue evaluada por el coeficiente de determinación (R^2), el SEC (Error Estándar de Calibración) y el RMSECV (Raíz de la Media Cuadrada del Error de la Validación Cruzada) definidos como (Ecuaciones 4.1 y 4.2):

$$\mathrm{SEC} = \sqrt{\frac{1}{n-k-1}\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2} \qquad (4.1)$$

$$\mathrm{RMSECV} = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2} \qquad (4.2)$$

donde y_i es el valor medido en las unidades de cada parámetro y en días de maduración, $\hat{y}_i$ el valor predicho en las mismas unidades, *n* es el número de muestras y κ el número de factores PLS.

Según el valor de R^2, el modelo es considerado como bueno para predicción si R^2 es superior a 0,81 y como adecuado sólo para predicciones cuantitativas aproximadas si R^2 está entre 0,66 y 0,81 (Karoui *et al.*, 2006b).

El cociente de la Desviación Estándar de Predicción (RPD) fue calculado dividiendo la Desviación Estándar (SD) en el grupo de datos entre los resultados SEC y RMSECV, respectivamente. Mouazen *et al.* (2005) reporta que un cociente superior a 2 indica una Buena calibración mientras que un cociente inferior a 1,5 indica predicciones incorrectas.

Capítulo 5. Queso Emmental

5.1 Producción de muestras y maduración

Las muestras de queso utilizadas correspondieron a quesos Emmental experimentales elaborados en el Instituto Técnico Francés del Queso (ITFF por sus siglas en francés, La Roche sur Foron, Francia). Los quesos fueron elaborados la misma semana por el mismo maestro quesero, a partir de leche calentada a 63 ºC durante 30 seg y correspondieron a 9 asociaciones de diferentes cepas de Estreptococos, Lactobacilos y bacterias propiónicas (código de cepas A-I).

Después del salado (día 1) durante 48 h a 12 ºC, los quesos fueron pre-madurados durante 20 días en una cava de 8 ºC a 10 ºC. A partir del día 20 (d20) hasta d34 los quesos fueron colocados en una cava templada entre 15 ºC y 16 ºC. A d34, los quesos fueron colocados en una cava caliente de 22 ºC a 23 ºC y de 84 % a 86 % de humedad relativa, durante aproximadamente 40 días, hasta la apertura de los moldes. Después de la apertura, los quesos se conservaron en cava fría a 6 ºC durante aproximadamente 15 días. En la Tabla 5.1 se muestran los códigos asignados a los quesos analizados.

5.2 Muestreo

Para cada uno de los quesos se tomaron muestras a la entrada en las cavas y a diferentes tiempos dentro de éstas. En la cava temperada los muestreos se realizaron a la entrada de la cava (d20) y a los 7 días dentro de ésta (d27). En la cava caliente los muestreos se realizaron a la entrada (d34) así como a los 17 días (d51), 24 días (d58) y 30 días (d65). El último muestreo se realizó a la apertura de los moldes y correspondió al fin de la maduración (Tabla 5.1).

Los muestreos se realizaron obteniendo un cilindro de aproximadamente 15-20 g de cada uno de los quesos a cada estado de maduración. Estos cilindros fueron cortados a la mitad longitudinalmente para obtener segmentos de 7 cm x 1 cm x 0,5 cm que fueron analizados directamente por espectroscopia de infrarrojo.

Tabla 5.1 Muestras de queso Emmental evaluadas.

* Código xz donde x= asociación de cepas (A-I) y z= muestreo.

DESCRIPCIÓN	CÓDIGO *			n
1er muestreo Entrada en cava temperada (0CT)=d20	A0CT B0CT C0CT	D0CT E0CT F0CT	G0CT H0CT I0CT	9
2º muestreo 7 días en cava temperada (7CT)=d27	A7CT B7CT C7CT	D7CT E7CT F7CT	G7CT H7CT I7CT	9
3er muestreo Entrada en cava caliente (0CC)=d34	A0CC B0CC C0CC	D0CC E0CC F0CC	G0CC H0CC I0CC	9
4º muestreo 17 días en cava caliente (17CC)=d51	A17CC B17CC C17CC	D17CC E17CC F17CC	* H17CC I17CC	8
5º muestreo 24 días en cava caliente (24CC)=d58	A24CC B24CC C24CC	D24CC E24CC F24CC	G24CC H24CC I24CC	9
6º muestreo 30 días en cava caliente (30CC)=d65	A30CC B30CC C30CC	D30CC E30CC F30CC	G30CC H30CC I30CC	9
7º muestreo Fin de maduración (AM)=d? (apertura de moldes)	AAM BAM CAM	DAM EAM FAM	GAM HAM IAM	9

* Queso no muestreado en d51

5.3 Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo Medio (FTIR)

Los segmentos de las muestras de queso fueron analizadas por espectroscopia de infrarrojo medio con transformadas de Fourier (FTIR). La metodología utilizada para la recolección de los espectros y para la substracción de los espectros de agua y corrección de la línea base se describie en la sección 4.5.

5.4 Análisis estadísticos

Antes de realizar los análisis estadísticos y con la finalidad de estandarizar las respuestas espectrales de los diferentes grupos composicionales, los espectros completos corregidos fueron normalizados considerando 4 regiones de normalización a 3030-2750 cm^{-1}, 1800-1700 cm^{-1}, 1700-1490 cm^{-1} y 1490-950 cm^{-1}. Para cada región, se dividió cada valor de absorbancia entre la suma de las absorbancias de la región (Bertrand, 2000). Una vez normalizadas las regiones, se reconstruyeron cada uno de los espectros. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATISTICA versión 6 (StatSoft, Francia).

Análisis de varianza

El análisis de varianza (ANOVA) fue realizado para el grupo de espectros con la finalidad de identificar las bandas que mostraban cambios de absorbancia significativos durante la maduración ($p \leq 0,05$). Los factores considerados fueron el tiempo de maduración y la asociación de cepas. La prueba de la mínima varianza significativa de Fisher (LSD) se realizó para cada variable significativa y sus intervalos de confianza fueron calculados usando la media cuadrada del error de cada ANOVA.

Análisis de componentes principales

El Análisis de Componentes Principales (ACP) fue aplicado a la colección espectral de espectros normalizados con la finalidad de evaluar su evolución espectral global a lo largo de la maduración.

Análisis discriminante

El Análisis Discriminante (ADG) se aplicó al grupo de espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) del queso Emmental con la finalidad de evaluar el potencial de la espectroscopia de infrarrojo para discriminar las muestras de Emmental en función de su estado de maduración independientemente de la combinación de cepas utilizadas. El ADG es una técnica que permite generar reglas discriminantes para clasificar las unidades experimentales en dos o más poblaciones definidas de manera única. Adicionalmente, ésta permite reducir el número de variables iniciales mediante la selección de un subconjunto de variables medidas no

correlacionadas que permitan alcanzar discriminación exitosa. Su objetivo es poder predecir la pertenencia de un individuo a una clase particular en base a un conjunto de variables predictoras.

La discriminación se realizó tomando como criterio de clasificación la edad del queso según los 7 muestreos realizados (Tabla 5.1) y el espectro FTIR obtenido para cada muestra. La colección espectral fue dividida en 3 grupos, un grupo de calibración (34 muestras), uno de validación cruzada (14 muestras) y un grupo para predicción (14 muestras). La validación cruzada permite evaluar el desempeño del método, produciendo estimaciones de las probabilidades de una clasificación errónea.

Con la finalidad de evitar un problema de sobre ajuste, y de disminuir el tamaño del modelo, se realizó una selección de las bandas discriminantes más significativas utilizando el método de selección ascendente (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05). Este proceso de selección se basa en la evaluación de una hipótesis de medias iguales de los grupos para cada variable candidata a discriminadora. Las variables seleccionadas son aquellas cuyo valor de F es significativo ($p<0,05$).

Las distancias Mahalanobis al cuadrado fueron calculadas para cada uno de los grupos de espectros y su nivel de significancia fue calculado ($p<0,05$). La distancia de Mahalanobis es la distancia estadística entre un dato individual y el centroide de de todos los datos en el espacio definido por las variables independientes, y toma en consideración las varianzas y covarianzas de las variables medidas y está definida por (Ecuación 3.1, capítulo 3)

La aplicación de las metodologías analíticas y estadísticas descritas en los tres capítuloes de ésta sección permitieron identificar los principales parámetros que marcan las diferencias entre los sujetos de estudio seleccionados. Los resultados obenidos se presentant en la próxima sección.

Tercera sección
RESULTADOS Y DISCUSIONES

Capítulo 6. Resultados Leche

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la aplicación de las metodologías establecidas para la identificación de parámetros de autenticidad para poder discriminar entre leche y productos similares, así como para poder discriminar entre leches auténticas o adulteradas con grasas exógenas.

6.1 Leche y productos similares

6.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo medio (MIR), análisis discriminante

La aplicación del Análisis Discriminante (ADG) al grupo completo de espectros permitió extraer importante información espectral que describe las principales diferencias entre los grupos de muestras analizados según la información en la etiqueta de los productos y según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003.

Información de la etiqueta

En la Figura 6.1 (A y B) se muestran los espectros promedio de las muestras de leche (L) y de Fórmula Láctea (FL) según la clasificación basada en la información de las etiquetas de los productos. Los resultados del Análisis Discriminante (ADG) permitieron identificar cambios en las bandas relacionados con las diferencias entre los productos.

La región 1700-1490 cm^{-1} asociada a la respuesta del enlace peptídico de las proteínas (Dufour y Robert, 2000; Grappin *et al.*, 2000; Robert y Dufour, 2000) presenta dos picos importantes, el pico Amida I a ~1650 cm^{-1} (ν C=O, ν C-N) y el Amida II ~1550 cm^{-1} (δ N-H, ν C-N). Las muestras FL presentaron una Absorbancia inferior para ambas bandas amida a la presentada por las muestras L.

En la región 1490-950 cm^{-1} relacionada con la respuesta de los carbohidratos y los ácidos orgánicos (Lanher, 1991; Cadet *et al.*, 2000; Grappin *et al.*, 2000) así como con los grupos fosfato (Casal y Mantsch, 1984; Coates, 2000), se observan diferencias en las bandas ~1045 cm^{-1} (alcohol primario ν C-O) y ~1077 cm^{-1} (δ O-H) relacionadas con las respuesta de la lactosa, la

banda ~1115 cm^{-1} asociada a la suma del lactato y monosacáridos (ν C–OH) (Petibois *et al.*, 2000) y los picos a ~1377 cm^{-1} y ~1402 cm^{-1} relacionados con monosacáridos (δ_s CH_3) (Lanher, 1991; Cadet *et al.*, 2000) y con los iones carboxilato (-COOH) (Coates, 2000), respectivamente.

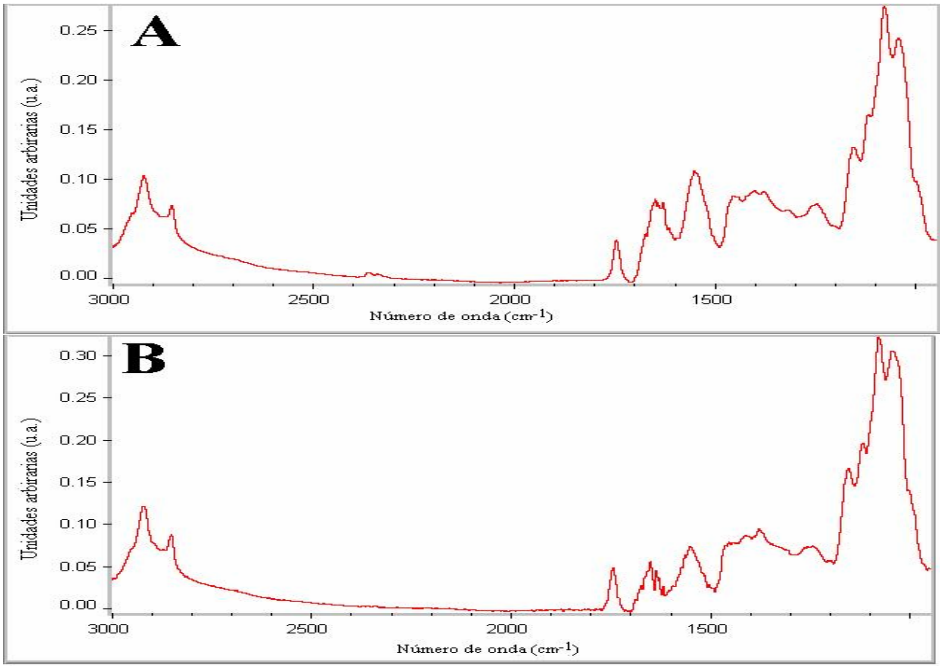


Figura 6.1 Espectros infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) leche y productos similares respecto a la información declarada en la etiqueta. Espectro promedio A) Leche (L) y B) Fórmula láctea (FL).

La mejor discriminación entre las muestras se logró con el modelo construido utilizando la región de 3000-950 cm^{-1}. El mapa factorial del ADG, definido por PC1, PC2 y PC3 (Componentes Principales 1, 2 y 3) que explican respectivamente el 79,4 %, 8,9 % y 5,8 % del total de la varianza, se muestra en la Figura 6.2 (A y B). Para permitir una mejor lectura, en éste se muestran separadamente el tipo de de producto (Figura 6.2A) y las muestras (Figura 6.2B).

El mapa espectral (Figura 6.2A) muestra que la combinación de los tres factores hizo posible separar dos grupos bien definidos, uno correspondiente a las muestras L y otro a las muestras FL. Sin embargo, la mayor separación se obtuvo por una combinación de PC2 y PC3.

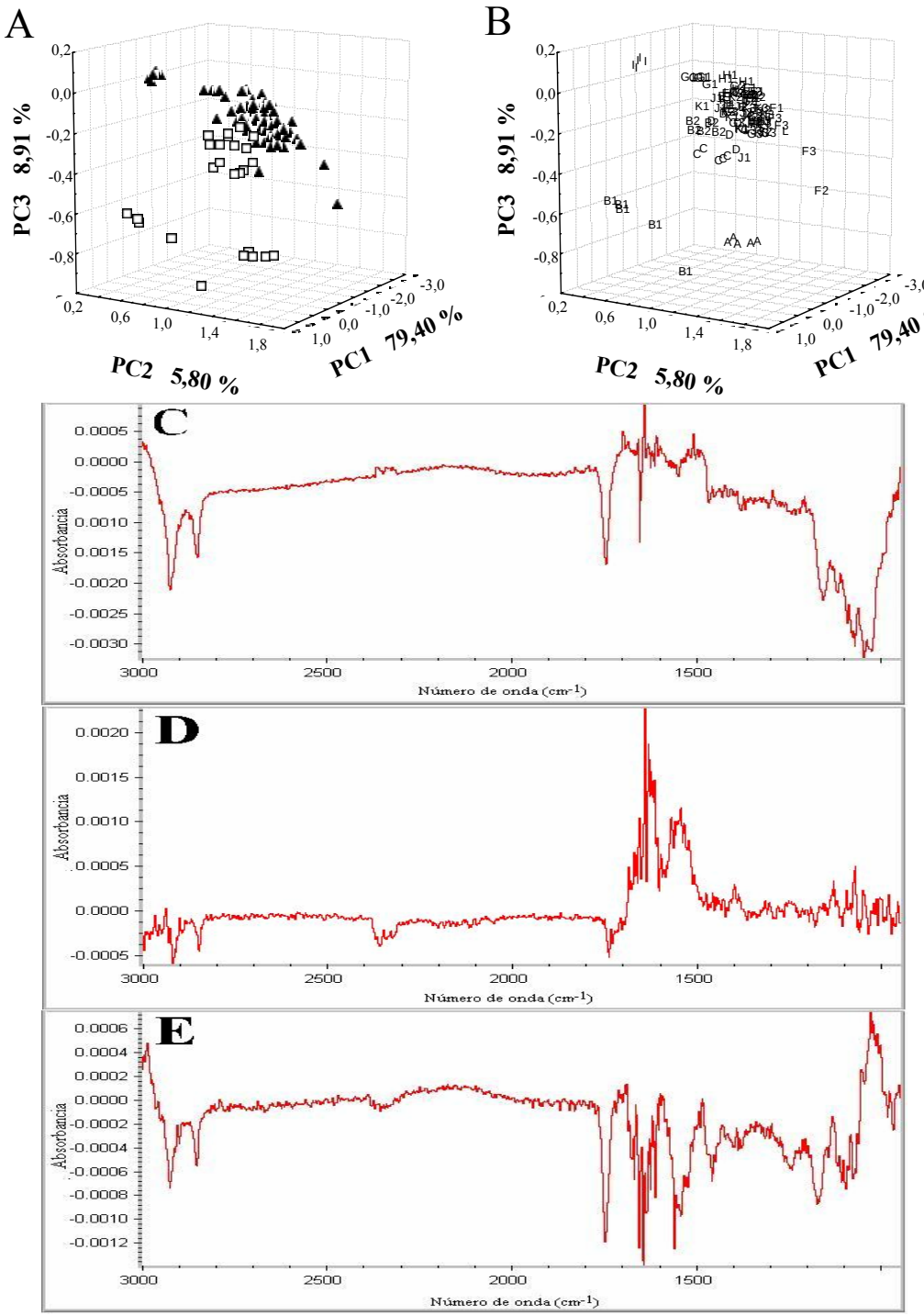


Figura 6.2 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo medio de leches y productos similares. A) Mapa Factorial en función del producto [▲ Leche (L) y □ Fórmula Láctea (FL)], B) Mapa factorial en función de las muestras (Tabla 3.1 sección 3.1.1), C) PC1, D) PC2 y E) PC3.

Los vectores propios correspondientes al PC1, PC2 y PC3 (Figura 6.2C-E) proveen información importante acerca de las vibraciones que permiten diferenciar entre los dos grupos de muestras, así como de los grupos composicionales involucrados. El PC1 mostró los valores más altos en la región 1490-950 cm^{-1} asignada a los carbohidratos, ácidos orgánicos y fosfatos. Bandas menores fueron también encontradas en la región 3000-2750 cm^{-1} y 1800-1700 cm^{-1} relacionadas con los grupos C-H y C=O de las grasas. Estas observaciones sugieren que el PC1 discrimina las muestras en función de los carbohidratos así como del tipo y cantidad de grasa que contienen.

El PC2 presentó los valores más altos en la región 1700-1490 cm^{-1} asignada a respuesta de las proteínas. Se observan dos picos positivos correspondientes a las señales Amida I (~1650 cm^{-1}) y Amida II (~1550 cm^{-1}) sugiriendo que este vector describe diferencias en la en las proteínas.

Para el PC3, se observaron tres zonas importantes, la región 1700-1490 cm^{-1} (región amida), 1800-1700 cm^{-1} (-C=O) y 3000-2750 cm^{-1} (CH_3 y CH_2). Bandas menores se observaron en la región 1490-950 cm^{-1} (zona de carbohidratos). Estas observaciones sugieren que este componente describe las diferencias entre los tres grandes grupos composicionales (grasa, proteína y carbohidratos).

Cambios espectrales en la zona alrededor de 3330-2500 cm^{-1} (3,0-4,0 μm) han sido relacionados con cambios en el valor del índice de iodo en leche de bufalo y vaca así como de otras grasas de origen vegetal (Anderson *et al.*, 1974; Ahmed y Helal, 1977). Estos autores relacionaron el incremento en la abosrbancia de la banda ~3,3 μm (2830 cm^{-1}) con el incremento en el índice de iodo, concluyendo que esta banda está directamente relacionada con el grado de instauración de la grasa.

Debido a que las muestras utilizadas presentaban una concentración similar en proteínas (30 g L^{-1}), las bandas Amida observadas para el PC2 y PC3 podrían deberse a diferencias en el proceso de las muestras así como al tipo de proteína adicionada al producto. La desnaturalización térmica de las proteínas de la leche a diferentes temperaturas ha sido evaluada para leche reconstituída (Anema y McKenna, 1996; Anema y Klostermeyer, 1997). Anema y McKenna (1996) mencionan un grado de desnaturalización para la β-lactoglobulina independiente de la concentración inical de proteína para las temperaturas evaluadas (70-115 ºC) y un grado de

desnaturalización para la α-lactalbúmina dependiente de la concentración a temperaturas inferiores a 85 ºC. Anema y Klostermeyer (1997) mencionan cambios en la solubilidad de la caseína total y de las diferentes subunidades, dependientes de la temperatura (20 ºC-90 ºC) y pH (6,3-7,1) debidos a la disociación de las micelas.

El modelo de discriminación obtenido confirma la buena separación observada gráficamente (Figura 6.2A) entre las muestras L y FL. El resumen de los resultados de clasificación se muestra en la Tabla 6.1. El modelo permitió clasificar correctamente el 95,14 % de las muestras en función de la información declarada en la etiqueta (Tabla 6.1). El 100 % de los espectros de L fueron clasificados correctamente mientras que para los espectros de FL fue del 88,0 %. El modelo clasificó incorrectamente el 60 % de los espectros de la muestra D, que siendo FL fueron clasificadas L.

Tabla 6.1. Análisis Discriminante (ADG) los espectros de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de las muestras de leche y productos similares en función de la información declarada en la etiqueta.

Muestra	**Real**[a]	**Predicha**[b]		**% Clasificación correcta**
		L	FL	
A	FL	0	**5**	100
B1	FL	0	**5**	100
B2	FL	0	**5**	100
C	FL	0	**5**	100
D	FL	3	**2**	40
E	Leche	**5**	0	100
F1	Leche	**5**	0	100
F2	Leche	**5**	0	100
F3	Leche	**5**	0	100
G1	Leche	**5**	0	100
G2	Leche	**5**	0	100

Muestra	**Real**[a]	**Predicha**[b]		**% Clasificación correcta**
		L	FL	
G3	Leche	**5**	0	100
H1	Leche	**5**	0	100
H2	Leche	**5**	0	100
I	Leche	**5**	0	100
J1	Leche	**5**	0	100
J2	Leche	**5**	0	100
K1	Leche	**5**	0	100
K2	Leche	**5**	0	100
K3	Leche	**5**	0	100
L	Leche	**5**	0	100

[a] Clasificación real según la información declarada en la etiqueta.
[b] Clasificación predicha por el modelo de discriminación

Criterios de la NOM-155-SCFI-2003

En la Figura 6.3 (A-C) se muestran los espectros promedio de las muestras de leche (L), Fórmula Láctea (FL) y Producto Lácteo Combinado (PLC) en función de las definiciones

establecidas en la NOM-155-SCFI-2003 (2003). Para realizar la clasificación se consideró la lista de ingredientes declarada en las etiquetas de los productos.

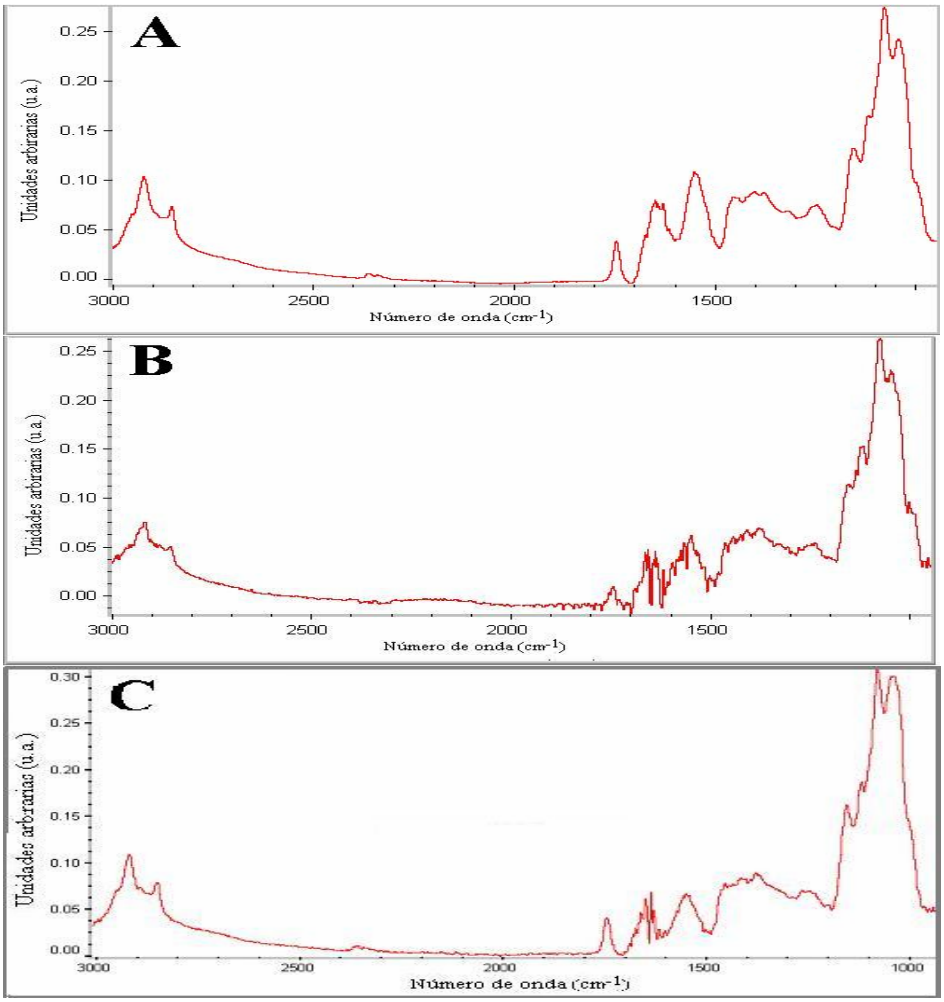


Figura 6.3 Espectros infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) leche y productos similares respecto a la NOM-155-SCFI-2003. Espectro promedio A) Leche (L), B) Fórmula láctea (FL) y C) Producto Lácteo Combinado (PLC).

Las diferencias espectrales observadas entre los tres grupos de productos fueron similares a las descritas para la clasificación según la etiqueta. Éstas se presentaron en la región de proteínas a 1700-1490 cm^{-1} y en la región a 1490-950 cm^{-1} relacionada con la respuesta de carbohidratos, ácidos orgánicos y fosfatos.

El modelo construido con los espectros de infrarrojo en la región de 3000-950 cm^{-1} permitió la mejor discriminación entre las muestras. En la Figura 6.4 (A-B) se muestra el mapa factorial del ADG formado por PC1, PC2 y PC3. Estos componentes explicaron el 92,25 % del total de la varianza (74,7 %, 8,7 % y 8,8 % respectivamente). En el mapa factorial (Figura 6.4A) se observa la separación de tres grupos. La principal separación entre los grupos de producto se presenta por una combinación entre el PC1 y el PC2. Las muestras correspondientes al grupo L se ubican a la derecha respeto al PC2, mientras que las muestras FL y PLC se ubican al centro e izquierda respectivamente.

Los vectores propios del PC1, PC2 y PC3 (Figura 6.4C-E) presentaron el mismo perfil que los vectores calculados para el modelo de discriminación según la información de la etiqueta.

El modelo de discriminación entre L, FL y PLC obtenido corrobora la buena separación observada en el mapa factorial (Figura 6.4A). Éste permitió clasificar correctamente 95,25 % de los espectros en función de los criterios de la NOM-155-SCFI-2003 (Tabla 6.2). El modelo clasificó correctamente el 100 % de las muestras L y FL sin embargo, sólo el 75 % de los espectros de PLC fueron clasificados correctamente. De los espectros de la muestra B2, uno fue clasificado como L y uno como FL, mientras que 3 de los espectros de la muestra D fueron clasificados como L. Los espectros de la muestra D clasificados como L en lugar de PLC fueron los mismos mal clasificados según la información declarada en la etiqueta.

6.1.2 Espectroscopia de Infrarrojo cercano (NIR), análisis discriminante

El ADG realizado utilizando el grupo completo de espectros permitió obtener información que describe las principales diferencias entre las muestras de leche y productos similares clasificados según la información en la etiqueta y los criterios de la NOM-155-SCFI-2003 (2003)

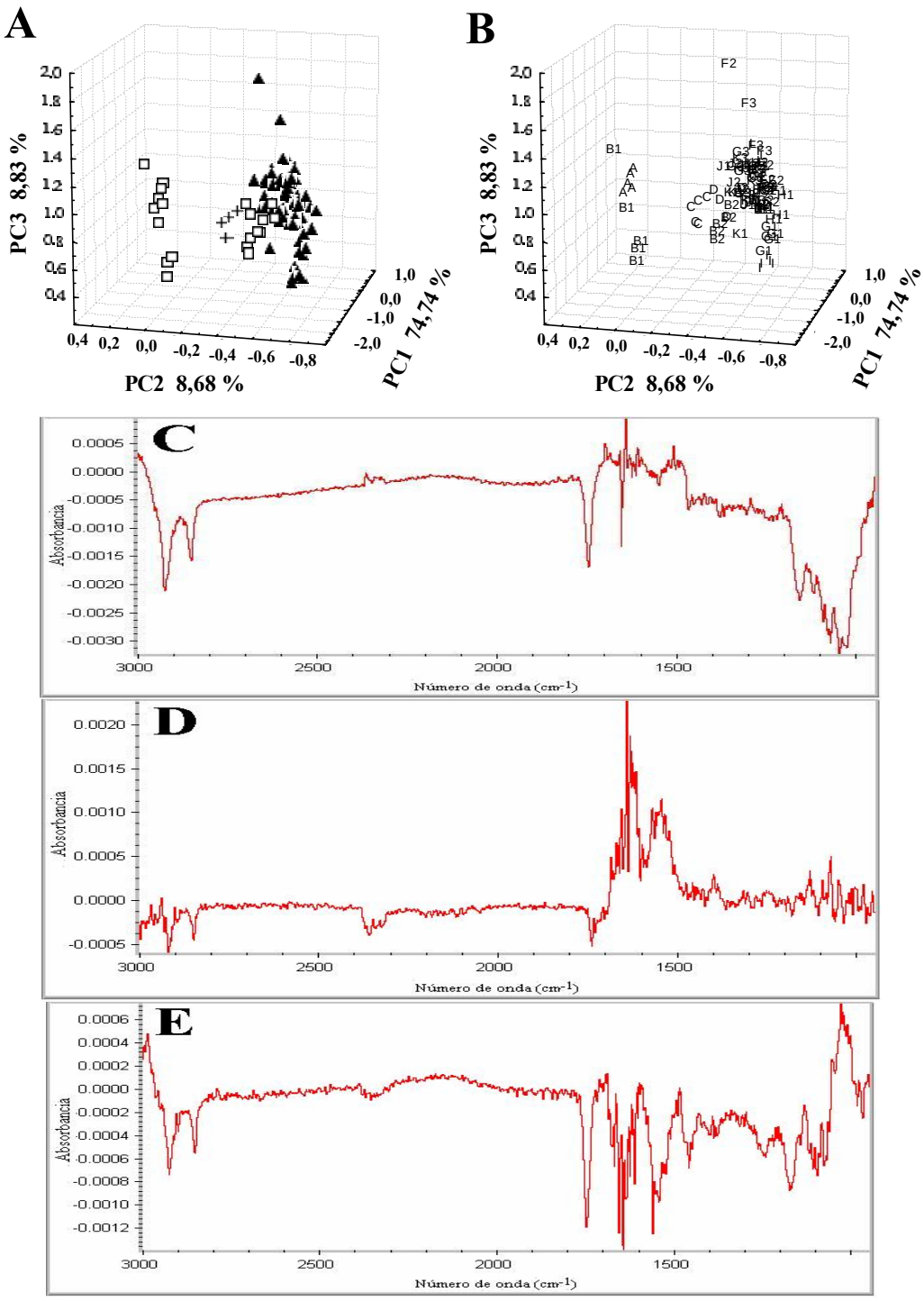


Figura 6.4 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo medio de leches y productos similares. A) Mapa Factorial en función del producto [▲ Leche (L), + Fórmula Láctea (FL) y □ Producto Lácteo Combinado(PLC)], B) Mapa factorial en función de las muestras (Tabla 3.1 sección 3.1.1), C) PC1, D) PC2 y E) PC3.

Tabla 6.2. Análisis Discriminante (ADG) los espectros de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de las muestras de leche y productos similares en función de los criterios de la NOM-155-SCFI-2003.

Muestra	Real[a]	Predicha[b]			% Clasificación correcta
		L	FL	PLC	
A	PLC	0	0	**5**	100
B1	PLC	0	0	**5**	100
B2	PLC	1	1	**3**	60
C	FL	0	**5**	0	100
D	PLC	3	0	**2**	40
E	L	**5**	0	0	100
F1	L	**5**	0	0	100
F2	L	**5**	0	0	100
F3	L	**5**	0	0	100
G1	L	**5**	0	0	100
G2	L	**5**	0	0	100

Muestra	Real[a]	Predicha[b]			% Clasificación correcta
		L	FL	PLC	
G3	L	**5**	0	0	100
H1	L	**5**	0	0	100
H2	L	**5**	0	0	100
I	L	**5**	0	0	100
J1	L	**5**	0	0	100
J2	L	**5**	0	0	100
K1	L	**5**	0	0	100
K2	L	**5**	0	0	100
K3	L	**5**	0	0	100
L	L	**5**	0	0	100

[a] Clasificación real según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003 (2003)
[b] Clasificación predicha por el modelo de discriminación

Información de la etiqueta

Los espectros promedio en la región de 10000-4000 cm^{-1} de las muestras de L y FL (Figura 6.5A y B) presentaron perfiles similares para los dos grupos. La principal diferencia se observa en la región de 7000-4000 cm^{-1}.

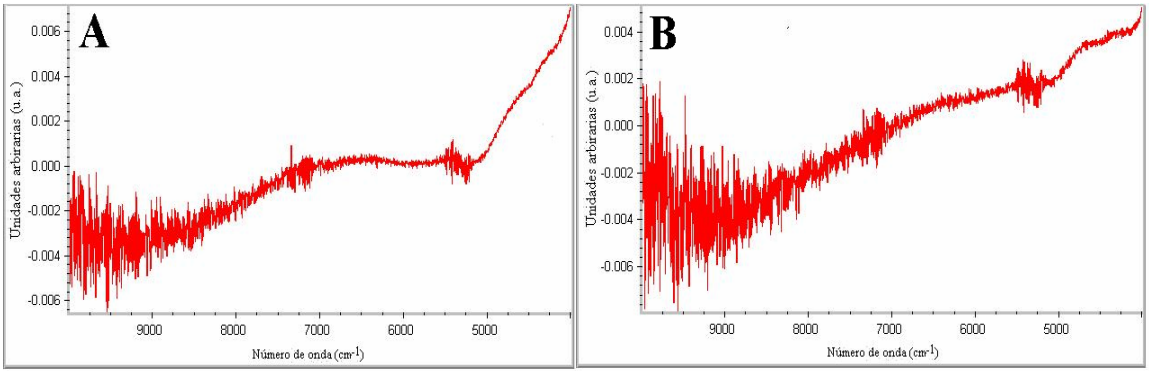


Figura 6.5 Espectros infrarrojo cercano (10000-4000 cm^{-1}) leche y productos similares respecto a la información declarada en la etiqueta. Espectro promedio A) Leche (L) y B) Fórmula láctea (FL).

El modelo que permitió discriminar mejor entre las muestras se construyó utilizando el espectro completo (10000-4000 cm^{-1}). El mapa factorial del ADG definido por PC1, PC2 y PC3

(75,4 %, 10,2 % y 5,0 % de la varianza total, respectivamente) no permitió separar completamente los dos grupos de muestras (Figura 6.6A y B). Los vectores propios correspondientes al PC1, PC2 y PC3 (Figura 6.6C-E) no presentan bandas específicas que puedan asociarse con los principales grupos composicionales.

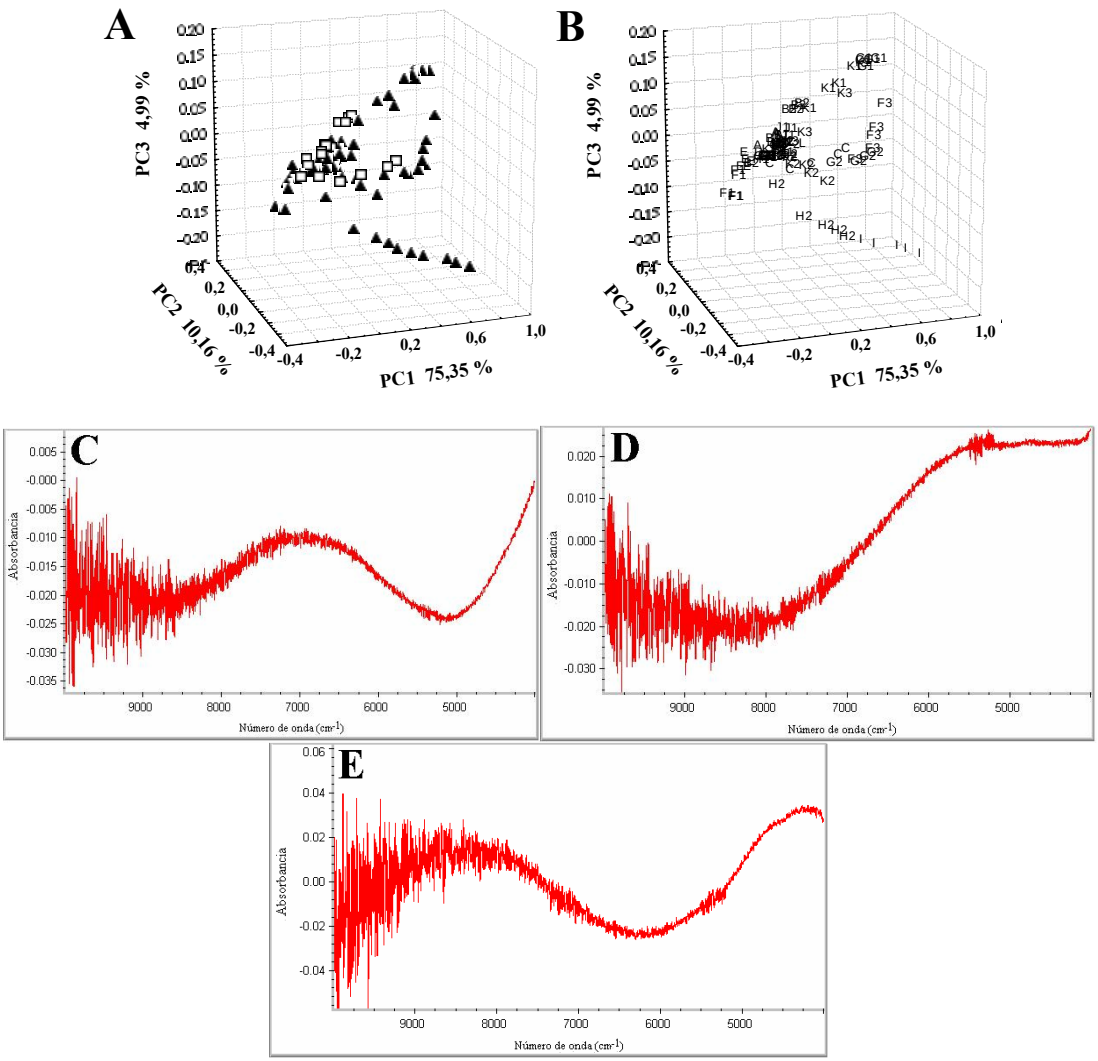


Figura 6.6 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo cercano de leches y productos similares. A) Mapa Factorial en función del producto [▲ Leche (L) y □ Fórmula Láctea (FL)], B) Mapa factorial en función de las muestras (Tabla 3.1 sección 3.1.1), C) PC1, D) PC2 y E) PC3.

El modelo discriminante obtenido para la región del infrarrojo cercano presentó resultados inferiores a los obtenidos en la región de infrarrojo medio, ya que permitió clasificar

correctamente sólo el 75,24 % de los espectros (Tabla 6.3). El 40 % de los espectros de FL fueron clasificados como L, siendo las muestras A y D las que presentaron mayor confusión.

Tabla 6.3. Análisis Discriminante (ADG) los espectros de infrarrojo cercano (10000-4000 cm^{-1}) de las muestras de leche y productos similares en función de la información declarada en la etiqueta.

Muestra	Real[a]	Predicha[b]		% Clasificación correcta
		L	FL	
A	FL	5	0	0
B1	FL	0	**5**	100
B2	FL	1	**4**	80
C	FL	0	**5**	100
D	FL	4	**1**	20
E	Leche	**5**	0	100
F1	Leche	**2**	3	40
F2	Leche	**5**	0	100
F3	Leche	**5**	0	100
G1	Leche	**5**	0	100
G2	Leche	**5**	0	100

Muestra	Real[a]	Predicha[b]		% Clasificación correcta
		L	FL	
G3	Leche	**5**	0	100
H1	Leche	**5**	0	100
H2	Leche	**5**	0	100
I	Leche	**5**	0	100
J1	Leche	0	5	0
J2	Leche	**1**	4	20
K1	Leche	**5**	0	100
K2	Leche	**5**	0	100
K3	Leche	**5**	0	100
L	Leche	**1**	4	20

[a] Clasificación real según la información declarada en la etiqueta.
[b] Clasificación predicha por el modelo de discriminación

Criterios de la NOM-155-SCFI-2003

La mejor discriminación se obtuvo utilizando la región de 6000-4000 cm^{-1}. Los espectros promedio de las muestras L, FL y PLC se presentan el la Figura 6.7 (A-C).

El mapa factorial del ADG mostrado en la Figura 6.8A está definido por el PC1 y el PC2. Estos componentes que explican el 82,9 % y 14,6 % de la varianza total respectivamente, no separan completamente los tres grupos de muestras. Los vectores propios correspondientes a estos componentes presentaron perfiles similares a los calculados para leche y fórmula láctea según la información de la etiqueta.

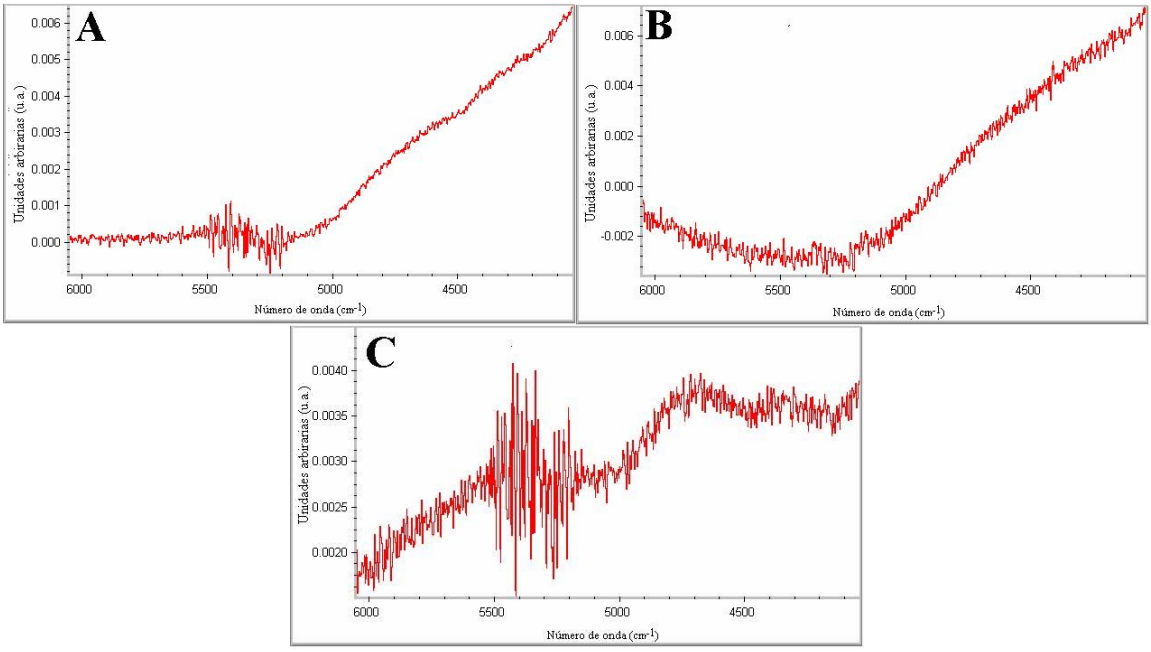


Figura 6.7 Espectros infrarrojo cercano (6000-4000 cm^{-1}) leche y productos similares respecto a la NOM-155-SCFI-2003. Espectro promedio A) Leche (L), B) Fórmula láctea (FL) y C) Producto Lácteo Combinado (PLC).

El modelo discriminante permitió clasificar correctamente el 80,0 % del total de espectros (Tabla 6.4). El 15 % de los espectros de PLC fueron clasificadas como L. Estos espectros pertenecieron a las muestras B1 y D. De los espectros de L, solo el 71,3 % fueron correctamente clasificados. El 100 % de los espectros de las muestras F3, J1 y J2 fueron clasificados incorrectamente.

Los resultados han puesto en evidencia que el desempeño del modelo de NIR fue inferior al del modelo de MIR para el mismo grupo de muestras.

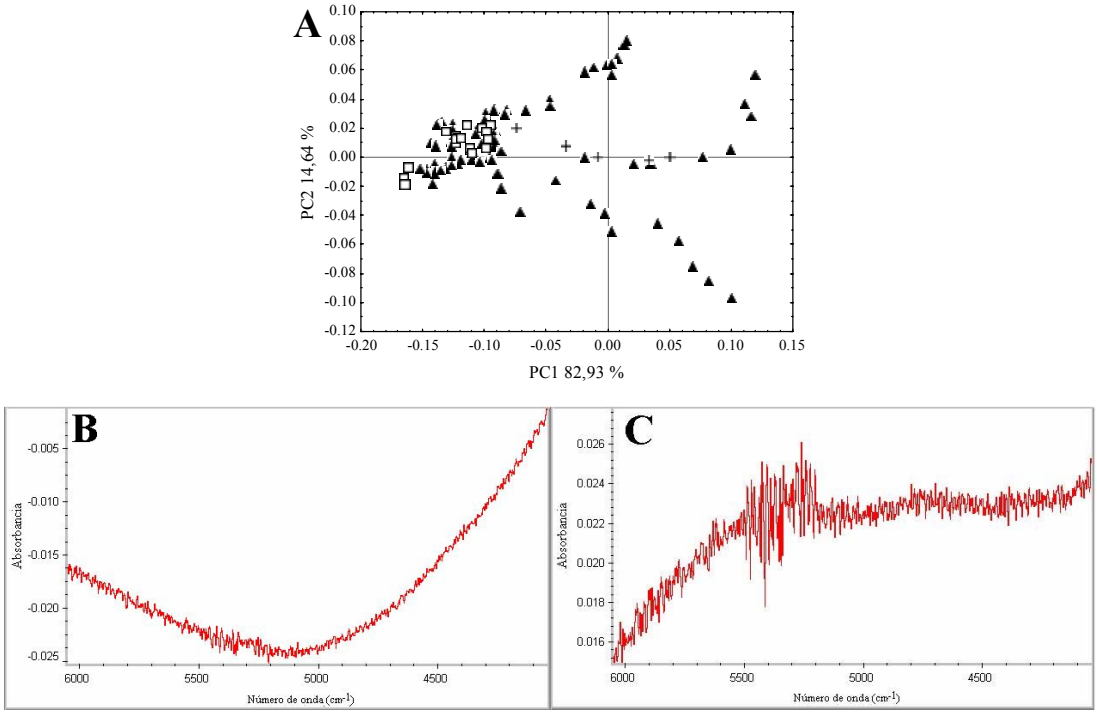


Figura 6.8 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo cercano de leches y productos similares. A) Mapa Factorial en función del producto [▲ Leche (L), + Fórmula Láctea (FL) y □ Producto Lácteo Combinado(PLC)], B) PC1 y C) PC2.

Tabla 6.4. Análisis Discriminante (ADG) los espectros de infrarrojo cercano (6000-4000 cm^{-1}) de las muestras de leche y productos similares en función de los criterios de la NOM-155-SCFI-2003.

Muestra	Real[a]	Predicha[b]			% Clasificación correcta
		L	FL	PLC	
A	PLC	0	0	**5**	100
B1	PLC	0	0	**5**	100
B2	PLC	1	0	**4**	80
C	FL	0	**5**	0	100
D	PLC	2	0	**3**	60
E	L	**5**	0	0	100
F1	L	**3**	0	2	60
F2	L	**5**	0	0	100
F3	L	0	5	0	0
G1	L	**5**	0	0	100
G2	L	**4**	0	0	100

Muestra	Real[a]	Predicha[b]			% Clasificación correcta
		L	FL	PLC	
G3	L	**5**	0	0	100
H1	L	**5**	0	0	100
H2	L	**5**	0	0	100
I	L	**5**	0	0	100
J1	L	0	0	5	0
J2	L	0	0	5	0
K1	L	**5**	0	0	100
K2	L	**5**	0	0	100
K3	L	**5**	0	0	100
L	L	**4**	0	1	80

[a] Clasificación real según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003
[b] Clasificación predicha por el modelo de discriminación

6.1.3 Perfil de ácidos grasos (FAMES)

En la Tabla B.1 del anexo B se muestran el perfil de los FAMES así como las concentraciones promedio (g 100 g^{-1} de ácidos grasos), desviación estándar y Coeficiente de Variación (CV) en función de la clasificación de las muestras por la información de la etiqueta y de los criterios de la NOM-155-SCFI-2003 (2003), utilizados para los análisis estadísticos.

Análisis de componentes principales

La aplicación del Análisis de Componentes Principales (ACP) a los perfiles de FAMES permitió extraer importante información relativa a los ácidos grasos que permiten diferenciar leches de productos similares.

El mapa factorial y la gráfica de cargas para los ácidos grasos, definidos por los PC1 y PC2, se muestran en la Figura 6.9 (A y B). Estos componentes explicaron respectivamente el 54,7 % y 37, 2 % de la varianza total. En el mapa factorial (Figura 6.9A), una combinación de los dos componentes permitió una separación de las muestras en tres grupos bien definidos. El PC1 separó las muestras según el origen de la grasa (Tabla 6.1, sección 6.1.1), las muestras conteniendo grasa vegetal presentaron valores negativos (G_1 y G_3), mientras que las que contenían grasa butírica (G_2) presentaron valores positivos. El PC2 separó las muestras que contenían grasa de un solo origen en el lado positivo (G_1 y G_2) de las mixtas (G_3) (Tabla 6.1, sección 6.1.1).

Los vectores propios correspondientes al PC1 y PC2 (Figura 6.9B) proveen información importante acerca de los ácidos grasos que permitieron separar las muestras en función del origen de sus grasas. El vector propio del PC1 presentó valores importantes para los ácidos palmítico, tetradecanoico y el ácido codificado como P17 (no identificado); y valores menores para los ácidos oleico, linoleico y eicosapentaenoico (EPA). Este vector mostró una oposición en los valores de los ácidos palmítico y oleico. El vector propio 2 presentó valores importantes para los ácidos linoleico, octadecanoico, *cis*-6-petroselínico y oleico; y valores menores para el ácido palmítico y linolénico.

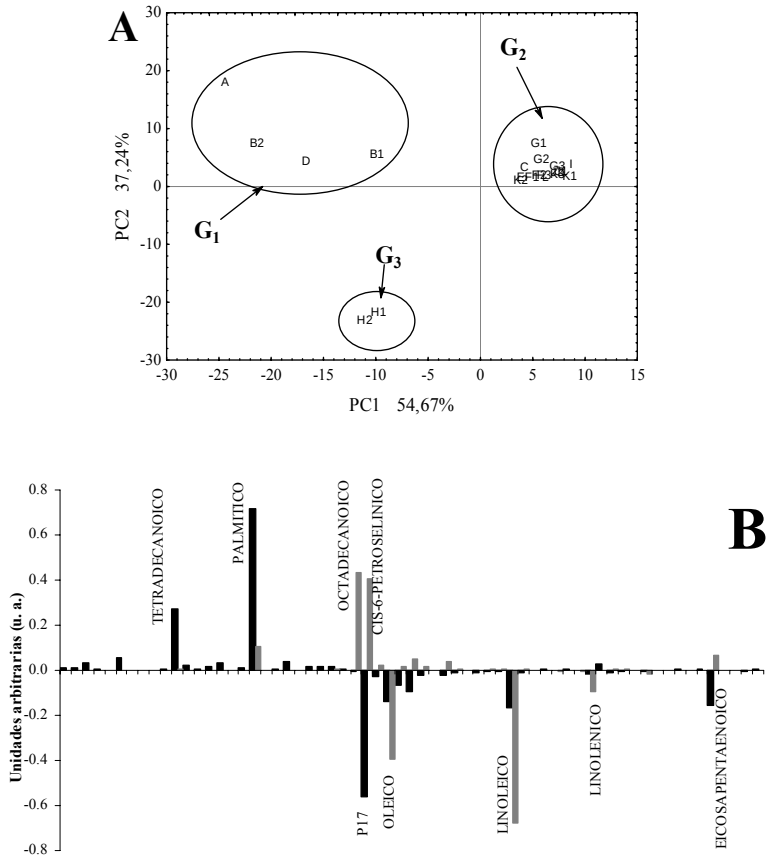


Figura 6.9 Análisis de Componentes Principales (ACP) de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches y productos similares. Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial y B) Vectores propios (▌PC1 y ▌PC2). Códigos de las muestras en la Tabla 6.1 (sección 6.1.1).

De los ácidos grasos observados en los vectores propios, los de mayor proporción en la grasa de leche son el palmítico y el oleico (~28 % y 21 % respectivamente) (Creamer y MacGibbon, 1996).

Información en la etiqueta, análisis discriminante general

El análisis paso a paso ascendente condujo a la selección de 4 ácidos grasos (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) que se muestran el la Tabla 6.5. De los compuestos seleccionados, 2 no

fueron correctamente identificados por lo que se presenta sólo el código asignado (Tabla B.1 del anexo B).

Tabla 6.5. Ácidos grasos (FAMES) seleccionados por el procedimiento paso a paso ascendente para el Análisis Discriminante (ADG) de los perfiles de FAMES según la información de la etiqueta.

Ácido Graso	GL[#]	F exclusión*	P exclusión*
13-octadecenoico	1	306,0814	0,000000
Lignocerico	1	5,8367	0,046368
P20	1	16,0963	0,005111
P22	1	92,1161	0,000028

[#] GL: Grados de libertad
* F exclusión = 0,05; P exclusión = 0,05

Las distancias Mahalanobis calculadas para los modelos de calibración y validación cruzada (Tabla B.2 del Anexo B) fueron significativas tanto para las muestras L (p= 0,000) como para las muestras FL (p= 0,000). Las gráficas de Cooman de las distancias Mahalanobis al cuadrado a L y FL, muestran los agrupamientos según el tipo de producto para los modelos de calibración y validación cruzada (Figura 6.10).

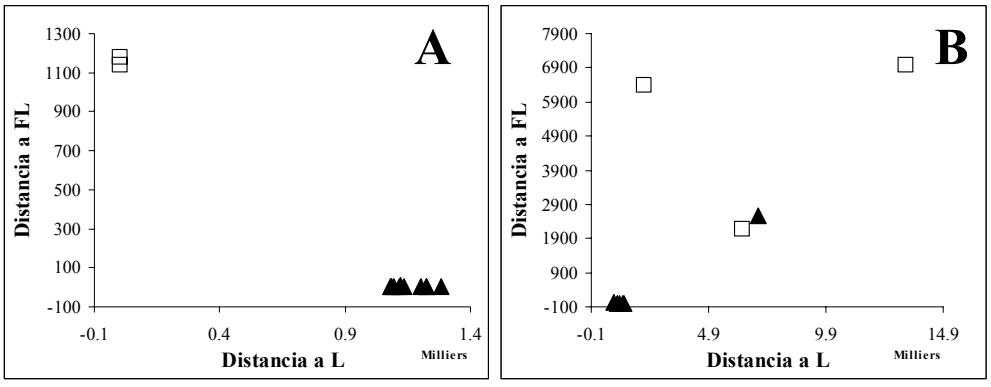


Figura 6.10. Gráfica de Cooman para la clasificación de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leche y productos similares en función de la etiqueta. A) Modelo de calibración y B) Modelo de validación. (▲ L y □ FL).

En la gráfica del modelo de calibración (Figura 6.10A) se muestran las muestras correspondientes a FL clasificadas en la esquina superior izquierda de la gráfica, mientras que las muestras L fueron clasificadas en la esquina inferior derecha. Para el modelo de validación cruzada, la gráfica de Cooman (Figura 6.10B) muestra una clasificación incorrecta para algunas de las muestras.

Los modelos de discriminación obtenidos para los grupos de calibración y validación cruzada confirman los resultados observados gráficamente (Tabla 6.6 y Tabla B.2 del Anexo B). El modelo de calibración permitió clasificar correctamente el 100 % de las muestras. El modelo de validación cruzada presentó un menor desempeño ya que permitió clasificar correctamente sólo 77,8 % de las muestras (Tabla 6.6 y Tabla B.2 del Anexo B). El modelo clasificó correctamente todas las muestras L, sin embargo, clasificó incorrectamente 2 muestras FL (66,7 %).

Tabla 6.6. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de las muestras de leche y productos similares según la etiqueta. Tabla de clasificación para los modelos de calibración y validación cruzada.

Real	Tipo predicho		% de clasificación correcta
	FL p= 0,1667	L p= 0,8333	
Calibración[a]			
FL	**2**	0	100
L	0	**10**	100
Validación Cruzada[b]			
FL	**1**	2	33,3
L	0	**6**	100

* Tipo predicho: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 100 % de las muestras. [b] Clasificación correcta del 77,8 % de las muestras.

NOM-155-SCFI-2003, análisis discriminante general

El análisis paso a paso descendente condujo a la selección de 9 ácidos grasos (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) que se muestran el la Tabla 6.7. De los compuestos seleccionados, 4 no

fueron correctamente identificados por lo que se presenta sólo el código asignado (Tabla B.1 del anexo B).

Tabla 6.7. Ácidos grasos (FAMES) seleccionados por el procedimiento paso a paso ascendente para el Análisis Discriminante (ADG) de los perfiles de FAMES según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003.

Ácido Graso	**GL**[#]	**F exclusión***	**P exclusión***
Decanoico	2	2,9207	0,382319
Hexanoico	2	15,6798	0,175792
Laurico	2	6,6151	0,265090
Linoelaidico	2	18,8912	0,160577
4-decnoico	2	0,2285	0,828447
P2	2	0,8530	0,607904
10-metil-dodecanoico	2	3,6485	0,347170
P4	2	0,6494	0,659558
Tetradecanoico	2	32,6217	0,122865

[#] GL: Grados de libertad
* F exclusión = 0,05; P exclusión = 0,05

Las distancias Mahalanobis calculadas para los modelos de calibración y validación cruzada (Tabla B.3 del Anexo B) no fueron significativas entre ninguno de los tipos de producto ($p > 0,05$). Las gráficas de Cooman de las distancias Mahalanobis al cuadrado a L y PLC, muestran los agrupamientos según el tipo de producto para los modelos de calibración y validación cruzada (Figura 6.11).

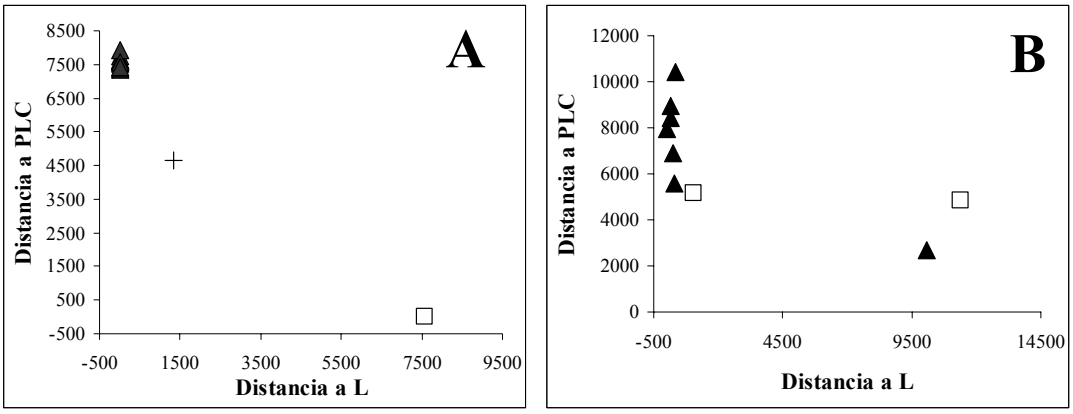


Figura 6.11. Gráfica de Cooman para la clasificación de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leche y productos similares según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003. A) Modelo de calibración y B) Modelo de validación. (▲ L , + FL, y □ PLC).

En la gráfica del modelo de calibración (Figura 6.11A) presenta la separación de tres grupos bien definidos. Las muestras correspondientes a L fueron clasificadas en la esquina superior izquierda de la gráfica, mientras que la muestra PLC fueron clasificada en la esquina inferior derecha. La muestra FL fue clasificada en una posición intermedia respecto a L y PLC. Para el modelo de validación cruzada, la gráfica de Cooman (Figura 6.11B) muestra una clasificación incorrecta para algunas de las muestras.

Los resultados observados gráficamente fueron confirmados por los modelos de discriminación obtenidos para los grupos de calibración y validación cruzada (Tabla 6.8 y Tabla B.3 del Anexo B). Mientras que el modelo de calibración permitió clasificar correctamente el 100 % de las muestras, el modelo de validación cruzada clasificó correctamente el 88,9 % de las muestras. Todas las muestras L y FL fueron clasificadas correctamente. De las muestras PLC el 33,3 % fue clasificado como FL.

Tabla 6.8. Análisis Discriminante General (ADG) de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de las muestras de leche y productos similares según los criterios de la NOM-155-SCFI-2003. Tabla de clasificación para los modelos de calibración y validación cruzada.

Real	Tipo predicho			% de clasificación correcta
	FL p= 0,0833	L p= 0,8333	PLC p= 0,0833	
Calibración[a]				
FL	**1**	0	0	100
L	0	**10**	0	100
PLC	0	0	**1**	100
Validación Cruzada[b]				
L	0	**6**	0	100
PLC	1	0	**2**	66,7

* Tipo predicho: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 100 % de las muestras. [b] Clasificación correcta del 88,9 % de las muestras.

6.1.4 Conclusiones parciales

Como se pudo observar, el Análisis Discriminante (ADG) de los espectros MIR obtenidos de las muestras de leche y productos similares presentó buenos resultados en la clasificación de las muestras para los dos criterios de clasificación utilizados. Respecto a la información declarada en la etiqueta, el modelo permitió clasificar correctamente el 95,15 % de las muestras, mientras que respecto a las denominaciones de la NOM-155-SCFI-2003, el modelo correspondiente permitió clasificar correctamente el 95,25 % de ellas.

Los modelos obtenidos para los espectros NIR y para los FAMES presentaron un desempeño inferior al del MIR. El NIR permitió clasificar correctamente el 75,24 % de las muestras en función de la denominación de la etiqueta y el 80 % según los criterios de la norma, mientras que para el perfil de FAMES la clasificación correcta fue de 77,8 % y el 88,9 % de respectivamente.

Por otro lado, el ACP de los perfiles de FAMES mostró una clasificación de las muestras en función del origen, vegetal o animal, de la grasa.

Finalmente, las tres técnicas analíticas presentaron un mejor desempeño en la discriminación en función de los criterios de la NOM-155-SCFI-2003 que bajo la denominación en la etiqueta.

Los resultados anteriores muestran que la espectroscopia de infrarrojo medio (MIR) tiene potencial como un método rápido y directo para diferenciar la leche de productos similares, por lo que, para la segunda etapa de trabajo sólo retubo ésta metodología. Adicionalmente se retubo el perfil de ácidos grasos (FAMES) por ser una técnica de referencia para la caracterización de la composición de grasas.

6.2 Leche adulterada con grasas exógenas

6.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo Medio (MIR), análisis discriminante

La aplicación del Análisis Discriminante (ADG) al grupo completo de espectros permitió extraer importante información espectral que describe las principales diferencias entre los grupos de muestras analizados en función de los niveles de adulteración con grasas exógenas.

Niveles de adulteración con grasas exógenas

Los espectros promedio para los 5 niveles (N0-N4) de adulteración con grasas exógenas evaluados (0 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % de la grasa total adulterada) se muestran en la Figura 6.12. Los resultados del Análisis Discriminante (ADG) permitieron identificar cambios en las bandas relacionados con las diferencias entre los productos.

Las principales diferencias se observan en la región 3000-2750 cm^{-1} asociada con la respuesta de las cadenas hidrocarbonadas de las grasas (Dufour *et al.*, 2000; Riaublanc *et al.*, 2000) y la banda ~1743 cm^{-1} (ν –C=O) asociada con el carbonilo. Adicionalmente, se observan ligeras diferencias en la región 1490-950 cm^{-1} relacionadas con enlaces C-H y C-O (Riaublanc *et al.*, 2000).

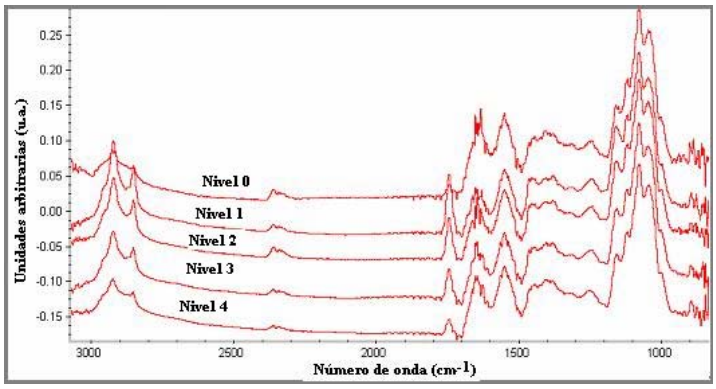


Figura 6.12 Espectros infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de muestras de leche con diferentes niveles de adulteración con grasas exógenas.

El mejor modelo discriminante se obtuvo en la región 3000-950 cm^{-1}. En el mapa factorial (Figura 6.13A) definido por el PC1 y PC2 (53,8 % y 36 % de la varianza explicada, respectivamente) no muestra una completa separación de los espectros en función del nivel de adulteración.

Los vectores propios correspondientes al PC1 y PC2 se muestran en la Figura 6.13 (C y D). El vector propio 1 sólo mostró un pico importante a ~1620 cm^{-1} correspondiente a la señal Amida I. Esta observación sugiere que este vector presenta poca relación con los cambios debidos a la adulteración con grasas exógenas. El vector propio 2 presentó picos importantes a 1743 cm^{-1} (éster –C=O), ~2923 cm^{-1} (CH_2) y ~2852 cm^{-1} (CH_2) así como la banda a 1160 cm^{-1} (-C-O, -CH_2-), relacionados con la respuesta característica de las grasas.

Ahmed y Helal (1977) y Anderson *et al.* (1974) relacionaron los cambios en la intensidad de la banda ~2830 cm^{-1} (3,3 μm) con cambios en el grado de instauración de las grasas.

El modelo de discriminación obtenido presentó un bajo desempeño ya que sólo permitió clasificar correctamente el 53,16 % de los espectros en función del nivel de adulteración (Tabla 6.9). El grupo de espectros mejor clasificado con el 88,9 % de clasificación correcta, fue el MGT (grasa nativa de leche) correspondiente al N0 de adulteración. El grupo de muestras adulteradas con grasa butírica (MGD) presentó un 50,6 % de clasificación correcta, a pesar de la similitud entre la grasa nativa y la grasa butírica utilizada para adulterarla.

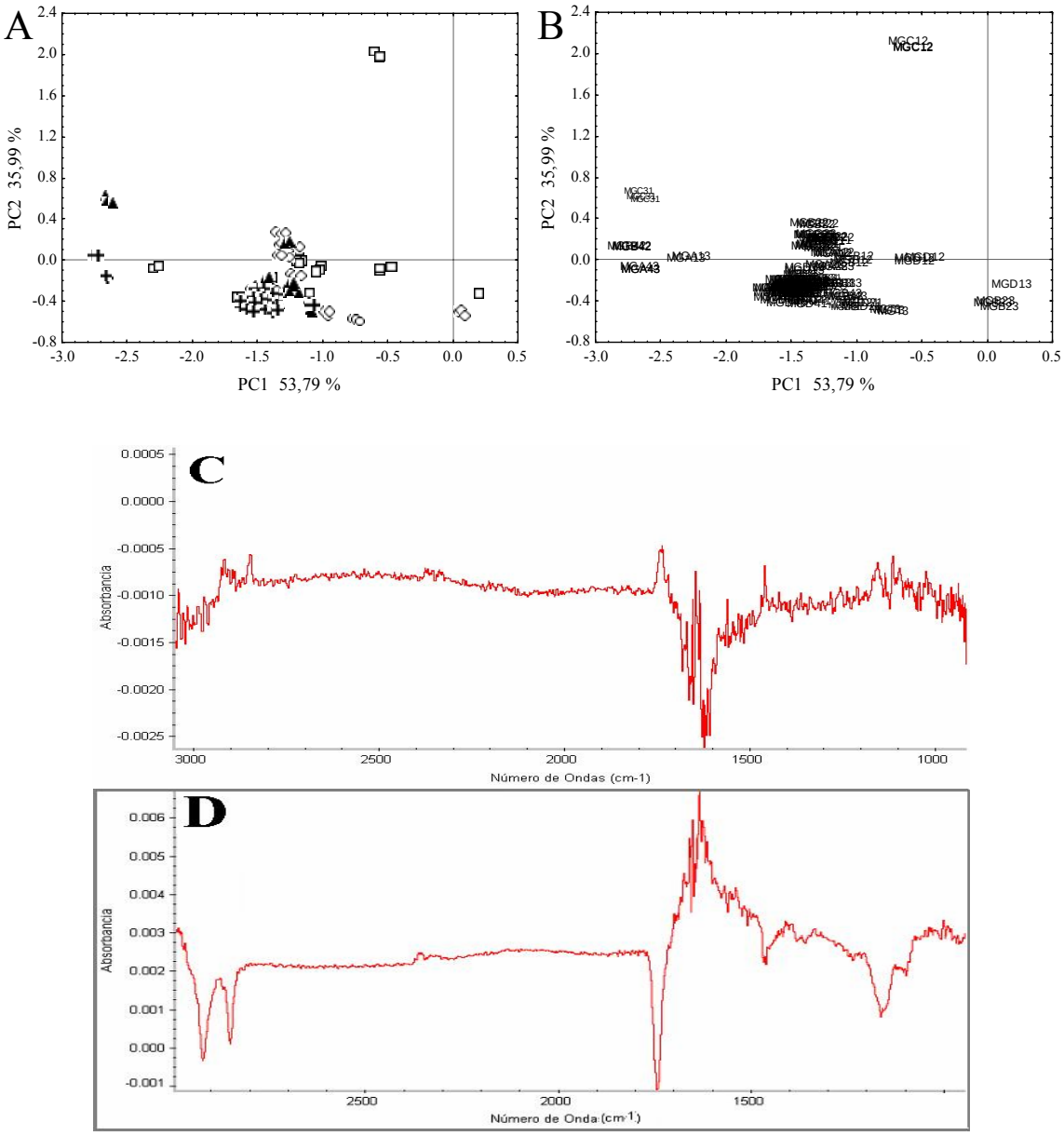


Figura 6.13 Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo medio de leche adulterada con grasas exógenas. A) Mapa Factorial en función del nivel de adulteración [● N0 (0 %), □ N1 (25 %), ◊ N2 (50 %), ▲ N3 (75 %) y + N4 (100 %)], B) Mapa factorial en función de las muestras, C) PC1 y D) PC2.

Tabla 6.9. Análisis Discriminante General (ADG) de los espectros de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de muestras de leche adicionada con diferentes niveles de grasas exógenas.

Muestra	Nivel Real	Nivel predicho					% Clasificación correcta
		N0	N1	N2	N3	N4	
MGA (aceite de coco)							
MGA1	N1	0	**4**	0	1	3	50
MGA2	N2	0	0	**9**	0	0	100,0
MGA3	N3	0	0	1	**7**	1	77,8
MGA4	N4	0	1	3	1	**4**	44,4
MGB (aceite de soya)							
MGB1	N1	0	**5**	1	1	2	55,6
MGB2	N2	0	5	**3**	1	0	33,3
MGB3	N3	0	0	5	**3**	**1**	33,3
MGB4	N4	0	0	0	3	**6**	66,7
MGC (aceite de canola)							
MGC1	N1	0	**5**	0	4	**0**	55,6
MGC2	N2	3	1	**3**	2	0	33,3
MGC3	N3	0	0	0	**0**	6	0,0
MGC4	N4	0	0	0	3	**5**	62,5
MGD (grasa butírica)							
MGD1	N1	2	**1**	3	3	0	11,1
MGD2	N2	0	3	**5**	1	**0**	55,6
MGD3	N3	0	3	0	**5**	1	55,6
MGD4	N4	0	1	1	0	**8**	80,0
MGT (gasa nativa de leche)							
MGT	N0	**8**	0	0	0	1	88,9

6.2.3 Perfil de ácidos grasos, análisis discriminante

La Figura 6.14 muestra los perfiles cromatográficos de las grasas puras. El perfil completo de los FAMES utilizado en el análisis discriminante, así como las concentraciones promedio, desviación estándar y Coeficiente de variación (CV) se muestran en la tabla B.11 del Anexo B. El ADG aplicado a cada grasa individual y al conjunto de perfiles permitió identificar los ácidos grasos que proporcionaron una mejor discriminación entre leches auténticas (AU) y adulteradas (AD), así como entre los 5 niveles de adulteración estudiados (N0: 0 %, N1: 25 %, N2: 50 %, N3:

75 % y N4: 100 % de grasa exógena adicionada). Los ácidos seleccionados se muestran en la Tabla 6.10.

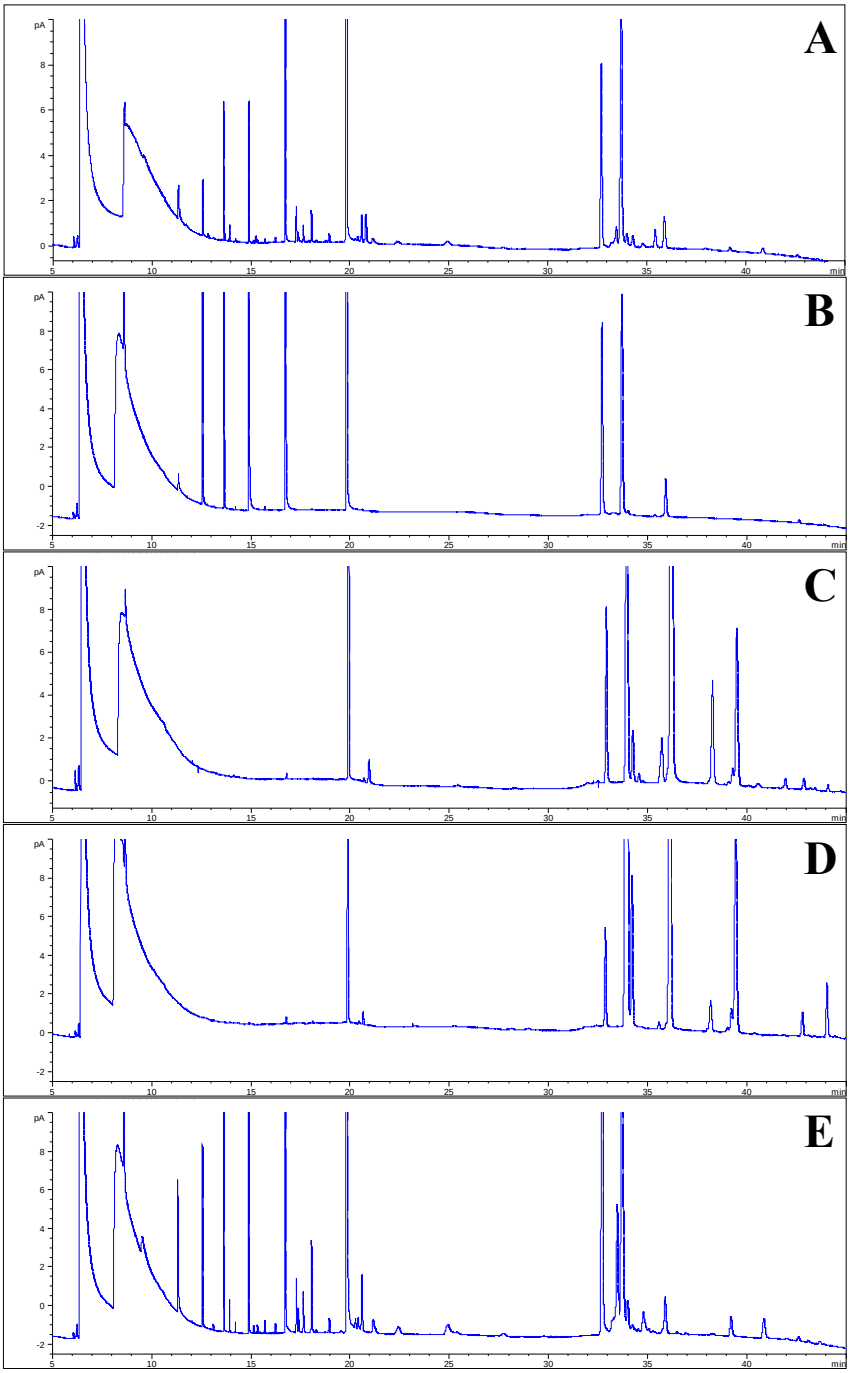


Figura 6.14 Perfil de ácidos grasos (FAMES) de las grasas puras. A) grasa nativa de leche (MGT), B) aceite de coc (MGA), C) aceite de soya (MGB), D) aceite de canola (MGC) y E) grasa butírica (MGD).

Tabla 6.10. Ácidos grasos seleccionadas por el procedimiento paso a paso para los Análisis Discriminantes (ADG) de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasas exógenas.

Discriminación Autenticidad				**Discriminación por Niveles**			
Ácido Graso	**GL[#]**	**F exclusión***	**P exclusión***	**Ácido Graso**	**GL[#]**	**F exclusión***	**P exclusión***
MGA (aceite de coco)							
P3	1	6202,54	0,000000	12-octadecenoico	2	8949	0,000112
Eicosenoico	1	9,76	0,026130	P3	2	300092	0,000003
				7-hexadecenoico	2	3	0,260564
				15-metil hexadecanoico	2	1968	0,000508
MGB (aceite de soya)							
P16	1	5783510	0,000000	P16	2	481969	0,000002
Butírico	1	789	0,001265	Butírico	2	46	0,021312
Docosanoico	1	28	0,033513				
MGC (aceite de canola)							
Octanoico	2	2,8803	0,384598	P3	3	2565,851	0,000390
Butírico	2	8,5568	0,234962	*cis*-docosahexaenoico	3	42,821	0,022906
Linoelaidico	2	0,4763	0,715639				
P2	2	165,8871	0,054818				
MGD (grasa butírica)							
P3	1	812307,3	0,000000	P3	2	3891459	0,000358
Heptadecanoico	1	549,9	0,000170	Miristoleico	2	1	0,553532
cis-vaccenico	1	111,7	0,001810	P12	2	114	0,066202
P32	1	38,2	0,008526	Laurico	2	11490	0,006597
				P14	2	4934	0,010067
Total de muestras							
P6	1	5692,905	0,000000	P6	4	296,6256	0,000000
Butírico	1	5,390	0,030925	Araquidonico	4	17,1108	0,000043
Heptadecanoico	1	9,373	0,006159	Butírico	4	9,3254	0,000882
15-metil hexadecanoico	1	7,030	0,015317	P14	4	9,9691	0,000646
				Palmitoleico	4	16,1833	0,000057
				Heptadecanoico	4	13,1975	0,000164
				12-octadecenoico	4	7,3904	0,002475
				11-metil-octadecanoico	4	3,1989	0,049128

[#] GL: Grados de libertad

* F exclusión = 0,05; P exclusión = 0,05

Tabla 6.11. Análisis Discriminante General (ADG) de los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasas exógenas. Tabla de clasificación para los modelos de calibración y validación cruzada.

Real	Grupo predicho AU	Grupo predicho AD	% clasificación correcta	Real	Grupo predicho AU	Grupo predicho AD	% clasificación correcta
MGA (aceite de coco)[a]							
Calibración				Validación cruzada			
AU	**2**	0	100	AU	**1**	0	100
AD	0	**6**	100	AD	0	**6**	100
MGC (aceite de canola)[c]							
Calibración				Validación cruzada			
AU	**2**	0	100	AU	**1**	0	100
AD	0	**5**	100	AD	0	**6**	100
Total de muestras							
Calibración				Validación cruzada			
AU	**2**	0	100	AU	**1**	0	100
AD	0	**23**	100	AD	0	**21**	100

Real	Grupo predicho AU	Grupo predicho AD	% clasificación correcta	Real	Grupo predicho AU	Grupo predicho AD	% clasificación correcta
MGB (aceite de soya)[b]							
Calibración				Validación cruzada			
AU	**2**	0	100	AU	**1**	0	100
AD	0	**4**	100	AD	0	**5**	100
MGD (grasa butírica)[d]							
Calibración				Validación cruzada			
AU	**2**	0	100	AU	**1**	0	100
AD	0	**6**	100	AD	0	**6**	100

Adulteración con aceite de coco (MGA)

Para la discriminación en función de la autenticidad, el ADG paso a paso ascendente permitió seleccionar 2 ácidos grasos (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) que se muestran en la Tabla 6.10. Los ácidos seleccionados fueron el Eicosenoico y el codificado como P3 (no identificado, Tabla B.4 del Anexo B). Las distancias Mahalanobis al cuadrado calculadas para los modelos de calibración y validación cruzada fueron significativas ($p< 0,05$) para las muestras AU y AD. Los modelos obtenidos tanto para el grupo de calibración y validación permitieron clasificar correctamente el 100 % de las muestras en función de su autenticidad (Tabla 6.11).

El ADG en función de los niveles de adulteración presentó un desempeño menor. El análisis paso a paso ascendente condujo a la selección de los 4 ácidos grasos (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) que se muestran en la Tabla 6.10.

Las distancias Mahalanobis calculadas para los modelos de calibración y validación cruzada fueron significativos ($p< 0,05$) para los 5 niveles de adulteración evaluados, con excepción de la distancia entre N1 y N2 ($p = 0,1826$) y la distancia entre N2 y N3 ($p = 0,0638$).

El modelo obtenido para el grupo de calibración permitió clasificar correctamente el 100 % de las muestras en función del nivel de adulteración (Tabla 6.12). Sin embargo, el modelo obtenido para el grupo de validación cruzada presentó un desempeño ligeramente menor con una clasificación correcta del 85,7 % de las muestras. Este porcentaje se vió afectado por la clasificación incorrecta del 50 % de las muestras N1 clasificadas como N2 (Tabla 6.12). El 100 % de las muestras auténticas fue clasificado correctamente. Ninguna de las muestras adulteradas fue clasificada como autentica.

Tabla 6.12. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con aceite de coco (MGA). Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada.

Nivel real	Nivel predicho*					% de clasificación correcta
	N0 p= 0,2500	N1 p= 0,1250	N2 p= 0,1250	N3 p= 0,1250	N4 p= 0,2500	
Calibración[a]						
N0	**2**	0	0	0	0	100
N1	0	**1**	0	0	0	100
N2	0	0	**2**	0	0	100
N3	0	0	0	**1**	0	100
N4	0	0	0	0	**2**	100
Validación Cruzada[b]						
N0	**1**	0	0	0	0	100
N1	0	**1**	1	0	0	50
N2	0	0	**1**	0	0	100
N3	0	0	0	**2**	0	100
N4	0	0	0	0	**1**	100

* Nivel de adulteración predicho: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 100 % de las muestras. [b] Clasificación correcta del 85,7 % de las muestras.

Adulteración con aceite de soya (MGB)

Los resultados ADG en función de la autenticidad fueron similares a los obtenidos para la MGA. El análisis paso a paso ascendente (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) permitó la selección de los ácidos butírico, docosanoico y el codificado como P16 (Tabla B.4 del Anexo B) como se muestra en la Tabla 6.10. Las distancias Mahalanobis al cuadrado fueron significativas ($p< 0,05$) entre los grupos AU y AD. Los modelos de los grupos de calibración y validación cruzada presentaron buenos resultados ya que en ambos casos permitieron clasificar correctamente el 100 % de las muestras en función de su autenticidad (Tabla 6.11).

El ADG en función de los niveles de adulteración presentó un pobre desempeño. El análisis paso a paso ascendente condujo a la selección sólo de 2 ácidos grasos (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) como se muestra en la Tabla 6.10. Las distancias Mahalanobis al cuadrado para los modelos de calibración y validación cruzada no fueron significativos ($p>0,05$) para ninguno de los 5 niveles de adulteración evaluados.

Este pobre desempeño se observa en el bajo porcentaje de clasificación correcta obtenidos tanto para el modelo de calibración como para el de validación cruzada ya que sólo permitieron clasificar correctamente 50 % y 33,3 % de las muestras respectivamente (Tabla 6.13). Pese a estos resultados, ambos modelos clasificaron correctamente el 100 % de las muestras auténticas. Para el modelo de calibración ninguna de las muestras adulteradas fue clasificada como auténtica, mientras que para el modelo de validación cruzada el 50 % de las muestras N1 (25 % de adulteración) fue clasificado como N0 (0 % de adulteración) (Tabla 6.13).

Adulteración con aceite de canola (MGC)

Los resultados ADG en función de la autenticidad fueron similares a los obtenidos para las MGA y MGB. El análisis paso a paso ascendente (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) permitó la selección de los ácidos butírico, octanoico linoelaídico y el codificado como P2 (Tabla B.4 del Anexo B) como se muestra en la Tabla 6.10. Las distancias Mahalanobis al cuadrado fueron significativas ($p< 0,05$) para los dos tipos de muestras, AU y AD. Los modelos de los grupos de calibración y validación cruzada presentaron buenos resultados ya que en ambos casos

permitieron clasificar correctamente el 100 % de las muestras en función de su autenticidad (Tabla 6.11).

Tabla 6.13. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con aceite de soya (MGB). Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada.

Nivel real	Nivel predicho*				% de clasificación correcta
	N0 p= 0,3333	N1 p= 0,1667	N2 p= 0,3333	N3 p= 0,1667	
Calibración[a]					
N0	**1**	0	1	0	50
N1	0	**0**	1	0	0
N2	0	0	**2**	0	100
N3	0	0	1	**0**	0
Validación Cruzada[b]					
N0	**1**	0	0	0	100
N1	1	**0**	1	0	0
N2	0	0	**1**	0	100
N3	0	0	2	**0**	0

***** Nivel de adulteración predicho: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 50 % de las muestras. [b] Clasificación correcta del 33,3 % de las muestras.

El ADG presentó un desempeño menor en la discriminción en función de los niveles de adulteración. El análisis paso a paso ascendente (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) llevó a la selección de los ácidos *cis*-docosahexaenoico y el codificado como P3 (Tabla B.4 del Anexo B) mostrados en la Tabla 6.10. Las distancias Mahalanobis al cuadrado entre los niveles fueron significativas ($p< 0,05$) para los diferentes niveles de adulteración, con excepción de la distancia de N2 con N3 y N4 ($p= 1,000$ en ambos casos).

El modelo de calibración permitó clasificar correctamente el 71,4 % de las muestras en función de su nivel de adulteración (Tabla 6.14). Éste porcentaje se vió afectado por la clasificación incorrecta del 100 % de las muestras N3 y N4 que fueron clasificadas como N2. El modelo de validación cruzada presentó un desempeño menor al de calibración, permitiendo clasificar correctamente sólo el 42,9 % de las muestras (Tabla 6.14). Al igual que en el modelo de

calibración, el 100 % de las muestras N3 y N4 fueron clasificadas como N2. Adicionalmente, el 50 % de las muestras N1 fue clasificado como N0 (0 % de adulteración).

Tabla 6.14. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con aceite de canola (MGC). Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada.

Nivel real	Nivel predicho*					% de clasificación correcta
	N0 p= 0,2857	N1 p= 0,1429	N2 p= 0,2857	N3 p= 0,1429	N4 p= 0,1429	
Calibración[a]						
N0	**2**	0	0	0	0	100
N1	0	**1**	0	0	0	100
N2	0	0	**2**	0	0	100
N3	0	0	1	**0**	0	0
N4	0	0	1	0	**0**	0
Validación Cruzada[b]						
N0	**1**	0	0	0	0	100
N1	1	**1**	1	0	0	50
N2	0	0	**1**	0	0	100
N3	0	0	2	**0**	0	0
N4	0	0	1	0	**0**	0

* Nivel de adulteración predicho: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 71,4 % de las muestras. [b] Clasificación correcta del 42,9 % de las muestras.

Adulteración con grasa butírica (MGD)

Para el ADG en función de la autenticidad, el análisis paso a paso ascendente (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) permitó la selección de 4 ácidos grasos (Tabla 6.10). Las distancias Mahalanobis al cuadrado entre AU y AD, fueron significativas ($p< 0,05$). Los modelos de los grupos de calibración y validación cruzada presentaron buenos resultados ya que en ambos casos permitieron clasificar correctamente el 100 % de las muestras en función de su autenticidad (Tabla 6.11). Estos resultados fueron similares a los obtenidos para las otras grasas adulterantes.

El modelo discrimínate por niveles presentó un desempeño menor al obtenido en función de la adulteración. El análisis paso a paso ascendente condujo a la selección de 5 ácidos grasos (Tabla 6.10).

Las distancias Mahalanobis al cuadrado entre los niveles fueron significativas ($p< 0,05$) para los diferentes niveles de adulteración, con excepción de las distancias N1-N3 ($p= 0,1314$) y N2-N4 ($p= 0,1855$).

El modelo obtenido para el grupo de calibración hizo posible clasificar correctamente el 100 % de las muestras en función del nivel de adulteración (Tabla 6.15). Sin embargo, el modelo calculado para el grupo de validación cruzada sólo permitió clasificar correctamente el 42,9 % de las muestras (Tabla 6.15). Este modelo clasificó correctamente el 100 % de las muestras auténticas (N0). Ninguna de las muestras adulteradas con la grasa butírica (MGD) fue clasificada como no adulterada (N0).

Tabla 6.15. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasa butírica (MGD). Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada.

Nivel real	Nivel predicho*					% de clasificación correcta
	N0 p= 0,2500	N1 p= 0,1250	N2 p= 0,1250	N3 p= 0,1250	N4 p= 0,2500	
Calibración[a]						
N0	**2**	0	0	0	0	100
N1	0	**1**	0	0	0	100
N2	0	0	**2**	0	0	100
N3	0	0	0	**1**	0	100
N4	0	0	0	0	**2**	100
Validación Cruzada[b]						
N0	**1**	0	0	0	0	100
N1	0	**1**	0	1	0	50
N2	0	0	**0**	1	0	0
N3	0	1	0	**0**	1	0
N4	0	0	0	0	**1**	100

* Nivel de adulteración predicho: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 100 % de las muestras. [b] Clasificación correcta del 42,9 % de las muestras.

Conjunto de perfiles

La aplicación del ADG al grupo completo de perfiles de FAMES de las muestra de leche adulterada con 4 tipos de grasas exógenas permitió extraer información importante que describe las diferencias entre las muestras AU y AD así como entre los diferentes niveles de adulteración.

El ADG en función de la autenticidad permitió obtener información que describe las diferencias entre leches adulteradas con grasas exógenas independientemente del origen de la grasa adulterante. El análisis paso a paso ascendente condujo a la selección de los 4 ácidos grasos (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) que se muestran en la Tabla 6.10. Las distancias Mahalanobis al cuadrado entre AU y AD, fueron significativas ($p< 0,05$). Los modelos para los grupos de calibración y validación cruzada permitieron clasificar correctamente el 100 % de las muestras como AU o AD según corresponde (Tabla 6.11). El modelo discriminante obtenido para el conjunto total de perfiles presentó el mismo desempeño en la discriminación que los modelos obtenidos para cada grasa de forma individual.

En la discriminación en función del nivel de adulteración, el análisis paso a paso ascendente (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) condujo a la selección de 6 ácidos grasos (Tabla 6.10).

Las distancias Mahalanobis al cuadrado calculados para los modelos de calibración y validación cruzada fueron significativas ($p< 0,05$) para los 5 niveles de adulteración. Las gráficas de Cooman construidas graficando la distancia Mahalanobis al cuadrado a N0 y a N4, muestran los agrupamientos según el nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada (Figura 6.15).

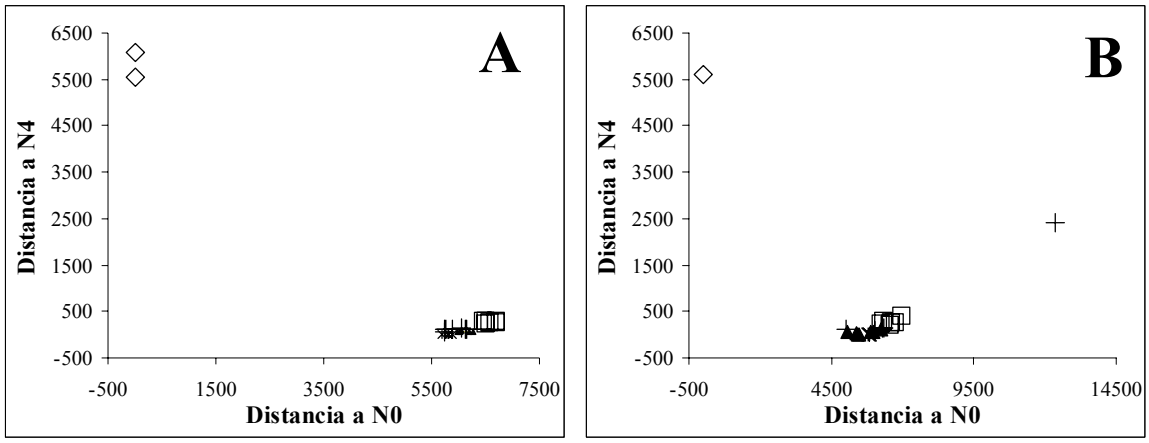


Figura 6.15 Gráfica de Cooman para la clasificación de los perfiles de ácidos grasos FAMES de leche adulterada con grasas exógenas. A) Modelo de calibración y B) Modelo de validación cruzada [◊ N0 (0 %), □ N1 (25 %), + N2 (50 %), ▲ N3 (75 %) y ✳ N4 (100 %)].

La gráfica correspondiente al modelo de calibración (Figura 6.14A) muestra las muestras N0 que corresponden a las muestras sin adulteración clasificadas en la esquina superior izquierda de la gráfica, mientras que las muestras adulteradas con diferentes niveles de grasa exógena fueron clasificadas en la esquina inferior derecha. La distancia entre los grupos N1 a N4 fueron relativamente pequeñas entre sí, por lo que no se observa una completa separación entre ellos. La gráfica correspondiente al modelo de validación cruzada (Figura 6.14B) presentó un perfil de clasificación similar al de la gráfica de calibración.

Los modelos obtenidos tanto para el grupo de calibración como para el de validación confirman los resultados observados gráficamente. El modelo de calibración permitió clasificar correctamente el 100 % de las muestras en función del nivel de adulteración (Tabla 6.16). Por otra parte, para el grupo de validación cruzada el modelo presentó un desempeño menor ya que permitió clasificar correctamente sólo el 72,7 % de las muestras (Tabla 6.16). El porcentaje se vió afectado por una clasificación incorrecta del 40 % de las muestras N2 que fueron clasificadas como N1, así como por la incorrecta clasificación del 57,1 % de las muestras N3 clasificadas como N4. El modelo clasificó correctamente el 100 % de las muestras autenticas (N0) y ninguna de las muestras adulteradas fue clasificada como autentica.

Tabla 6.16. Análisis Discriminante General (ADG) los perfiles de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con cuatro grasas exógenas. Tabla de clasificación en función del nivel de adulteración para los modelos de calibración y validación cruzada.

Nivel real	Nivel predicho*					% de clasificación correcta
	N0 p= 0,2500	N1 p= 0,1250	N2 p= 0,1250	N3 p= 0,1250	N4 p= 0,2500	
Calibración[a]						
N0	**2**	0	0	0	0	100
N1	0	**6**	0	0	0	100
N2	0	0	**7**	0	0	100
N3	0	0	0	**5**	0	100
N4	0	0	0	0	**5**	100
Validación Cruzada[b]						
N0	**1**	0	0	0	0	100
N1	0	**6**	0	0	0	100
N2	0	1	**3**	0	0	60
N3	0	0	0	**3**	4	42,9
N4	0	0	0	0	**3**	100

* Nivel de adulteración predicho: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 100 % de las muestras. [b] Clasificación correcta del 72,7 % de las muestras.

6.2.4 Conclusiones parciales

Como se pudo observar, el Análisis Discriminante (ADG) de los perfiles de FAMES presentaron mejores resultados en la discriminación de leches adulteradas con grasas exógenas que el modelo obtenido para los espectros MIR de las mismas muestras.

Los modelos discriminantes para los perfiles FAMES permitió clasificar correctamente el 100 % de las muestras como autenticas o adulteradas para cada grasa adulterante de forma individual y para el conjunto de perfiles.

Sin embargo, al tratar de discriminar en función del nivel de adulteración, los modelos presentaron un menor desempeño. Los mejores resultados se obtubieron para el aceite de coco (MGA) y el conjunto de perfiles ya que el modelo de validación cruzada permitió clasificar correctamente el 85,7 % y el 72,7 % de las muestras respectivamente. Mientras que, para el aceite de soya (MGB), el acete de canola (MGC) y la grasa butírica (MGD) los modelos de validación cruzada permitieron clasificar correctamente solo el 33,3 %, 42,9 y 42,9 %, respectivamente.

Por otro lado, el ADG los espectros MIR de las mismas muestras sólo permitió clasificar correctamente el 53,16 % de las muestras. El bajo desempeño observado para este modelo podría deberse a problemas en el emulsionamiento de las grasas durante la preparación de muestras.

Capítulo 7. Resultados Camembert

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la aplicación de las metodologías seleccionadas para la identificación de parámetros que permitan discriminar éste tipo de queso en función de su estado de maduración.

7.1 Evolución espectral y análisis de varianza

Los espectros obtenidos de las dos secciones de queso completo (corazón y subcorteza) así como aquellos de las diferentes fracciones resultantes de su fraccionamiento, mostraron diferentes evoluciones a lo largo de la maduración. Su evolución, así como su significancia dependió de la sección analizada. A continuación se muestran los resultados de cada una de las secciones.

7.1.1 Queso

En la Figura 7.1 se muestran las evoluciones a lo largo de la maduración de los espectros normalizados de las muestras de subcorteza (SC) y corazón (C) de queso Camembert. Los resultados del ANOVA y el análisis LSD de Fisher que permitieron identificar los cambios significativos en la absorbancia ($p \leq 0,05$) relacionados con el tiempo de maduración de ambas secciones, subcorteza y corazón se muestran en la Tabla 7.1. Para facilitar la lectura de las figuras y tablas solo se presentan algunos espectros y algunos resultados del ANOVA, el total de las evoluciones espectrales así como los resultados completos del ANOVA se muestran en el Anexo C (Tabla C.1)

La evolución de los espectros FTIR normalizados (3000-2800 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) a lo largo de la maduración difiere según la sección de queso analizada (Figura 7.1A-B). Los espectros de la subcorteza presentan modificaciones a lo largo de la maduración (Figura 7.1A) mientras que los espectros del corazón solo muestran una ligera progresión hasta el día 20 (escrito d20) y un fuerte cambio de d20 hasta d27 (Figura 7.1B) para la mayoría de las bandas correctamente asignadas. En estas regiones fueron observadas diferentes modificaciones espectrales.

La evolución de las bandas asociadas con los carbohidratos y los ácidos orgánicos es observada en la región 1490-950 cm^{-1} (Figura 7.1). Las bandas a ~1096 cm^{-1} (alcohol secundario ν C-O y δ O-H), ~1082 cm^{-1} (δ O-H) y ~1045 cm^{-1} (alcohol primario ν C-O) han sido asociadas a la lactosa (Lanher, 1991; Picque *et al.*, 1993; Cadet *et al.*, 2000; Coates, 2000; Grappin *et al.*, 2000). Estas tres bandas mostraron evoluciones y resultados de ANOVA similares por lo que solamente los resultados obtenidos alrededor de 1082 cm^{-1} son mostradas en la Tabla 7.1. En el corazón no se observaron cambios hasta d7, entonces la señal decreció hasta d27. En la subcorteza del queso las señales decrecieron significativamente entre d1 y d10 y después permaneció estable hasta d27 (Tabla 7.1).

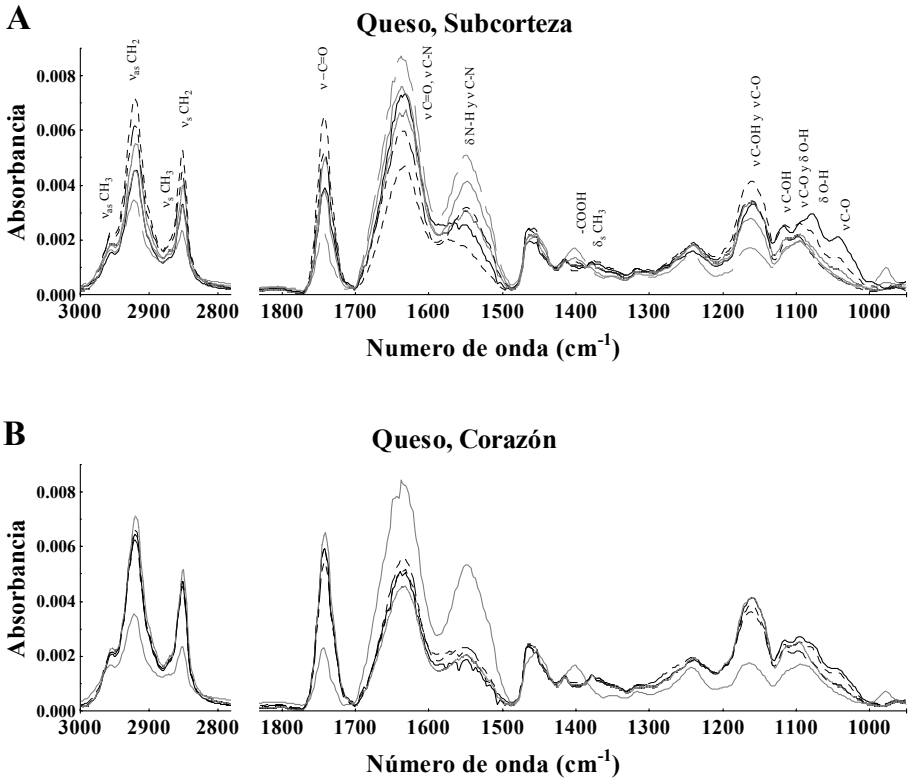


Figura 7.1 Evolución de espectros normalizados de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de queso Camembert. A) Subcorteza (SC) y B) Corazón (C) (—— d1, – – – d6, • • • • d10, – • • – d15, —— d20, — — d27).

Tabla 7.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de corazón (C) y subcorteza (SC) de queso y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) (p≤0,05)

BANDA	CS	P value	DÍAS DE MADURACIÓN					
			1	6	10	15	20	27
1082 cm^{-1} (Lactosa)	C	0,008*	0,0026 ^{e}	0,0023 ^{cde}	0,0019 ^{ab}	0,0019 ^{ab}	0,0018 ^{ab}	0,0016 ^{a}
	SC	0,005*	0,0028 ^{g}	0,0023 ^{cde}	0,0018 ^{ab}	0,0016 ^{a}	0,0018 ^{ab}	0,0018 ^{abc}
1115 cm^{-1} (Lactato)	C	0,001*	0,0024 ^{def}	0,0027 ^{cde}	0,0024 ^{def}	0,0022 ^{bcd}	0,0021 ^{b}	0,0014 ^{a}
	SC	0,000*	0,0024 ^{def}	0,0027 ^{f}	0,0021 ^{bc}	0,0019 ^{abc}	0,0018 ^{ab}	0,0016 ^{a}
1161 cm^{-1} (Lactosa + ms)	C	0,170	0,0036 ^{b}	0,0038 ^{b}	0,0042 ^{b}	0,0034 ^{b}	0,0037 ^{b}	0,0017 ^{a}
	SC	0,001*	0,0033 ^{bc}	0,0045 ^{e}	0,0036 ^{cd}	0,0031 ^{bc}	0,0028 ^{b}	0,0017 ^{a}
1377 cm^{-1} (ms)	C	0,154	0,00126 ^{b}	0,0013 ^{b}	0,0013 ^{b}	0,0012 ^{b}	0,0012 ^{b}	0,0008 ^{a}
	SC	0,013*	0,0012 ^{bc}	0,0014 ^{b}	0,0014 ^{b}	0,0011 ^{ab}	0,0010 ^{ab}	0,0009 ^{a}
1402 cm^{-1} (-COO-)	C	0,012*	0,0010 ^{a}	0,0010 ^{a}	0,0009 ^{a}	0,0010 ^{a}	0,0011 ^{a}	0,0017 ^{b}
	SC	0,002*	0,0011 ^{abcd}	0,0010 ^{a}	0,0011 ^{bcd}	0,0012 ^{d}	0,0015 ^{e}	0,0017 ^{e}
1549 cm^{-1} (Amida II)	C	0,019*	0,0024 ^{a}	0,0020 ^{a}	0,0017 ^{a}	0,0022 ^{a}	0,0025 ^{a}	0,0054 ^{b}
	SC	0,000*	0,0024 ^{bc}	0,0014 ^{a}	0,0030 ^{cde}	0,0036 ^{ef}	0,0043 ^{fg}	0,0051 ^{g}
1649 cm^{-1} (Amida I)	C	0,234	0,0052 ^{b}	0,0040 ^{ab}	0,0031 ^{a}	0,0043 ^{ab}	0,0042 ^{ab}	0,0078 ^{c}
	SC	0,013*	0,0057 ^{d}	0,0034 ^{a}	0,0052 ^{bcd}	0,0055 ^{cd}	0,0056 ^{d}	0,0078 ^{e}
1639 cm^{-1} /1549 cm^{-1} (AI/AII)	C	0,000*	2,5077 ^{h}	2,3576 ^{fgh}	2,0088 ^{bde}	2,1536 ^{def}	1,8804 ^{b}	1,5009 ^{a}
	SC	0,001*	2,7356 ^{e}	2,6284 ^{e}	1,9115 ^{b}	1,7074 ^{ab}	1,4025 ^{a}	1,6916 ^{ab}
1743 cm^{-1} (C=O)	C	0,461	0,0051 ^{ab}	0,0061 ^{b}	0,0070 ^{b}	0,0056 ^{b}	0,0055 ^{b}	0,0023 ^{a}
	SC	0,001*	0,0043 ^{bc}	0,0071 ^{g}	0,0054 ^{cd}	0,0047 ^{bc}	0,0039 ^{ab}	0,0023 ^{a}
2920 cm^{-1} (CH_2)	C	0,470	0,0058 ^{ab}	0,0071 ^{b}	0,0078 ^{b}	0,0070 ^{b}	0,0064 ^{ab}	0,0035 ^{a}
	SC	0,003*	0,0052 ^{bc}	0,0077 ^{f}	0,0062 ^{cde}	0,0056 ^{bcd}	0,0045 ^{ab}	0,0034 ^{a}
2954 cm^{-1} (CH_3)	C	0,605	0,0019 ^{ab}	0,0023 ^{ab}	0,0026 ^{b}	0,0024 ^{ab}	0,0023 ^{ab}	0,0017 ^{a}
	SC	0,029*	0,0017 ^{ab}	0,0024 ^{ef}	0,0021 ^{bcdef}	0,0021 ^{abcde}	0,0019 ^{abc}	0,0016 ^{a}
2954 cm^{-1} /2920 cm^{-1} (CH_3/ CH_2)	C	0,000*	0,3283 ^{ab}	0,3232 ^{ab}	0,3324 ^{abc}	0,3373 ^{abc}	0,3573 ^{c}	0,4747 ^{d}
	SC	0,000*	0,3353 ^{ab}	0,3162 ^{a}	0,3432 ^{abc}	0,3717 ^{c}	0,4167 ^{d}	0,4720 ^{e}

ms: monosacáridos. CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza. AI/AII: Coeficiente de las señales Amida.
* Significativo a p≤0,05.
$^{a-h}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes (p≤0,05)

Esta evolución espectral es consistente con el metabolismo de lactosa en quesos Camembert descrito por Engel *et al.* (2001a), Leclercq-Perlat *et al.* (2004) y McSweeney (2004). En la subcorteza del queso, un rápido decremento en la concentración de lactosa fue observado durante los primeros 8 días de maduración. En el corazón, la lactosa decrece lentamente hasta d6 y entonces rápidamente hasta d15. Después de 15 días de maduración la lactosa ha desaparecido completamente (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004). Este consumo de lactosa es más rápido en la

superficie que en el corazón debido al crecimiento inicial de *Kluyveromyces lactis* que consume la lactosa superficial (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004).

Los picos localizados alrededor de 1377 cm^{-1} (δ_s CH_3) asignados a las señales de la glucosa y galactosa, y alrededor de 1161 cm^{-1} relacionado con la suma de lactosa (alcohol terciario ν C–OH) y monosacáridos (oxigeno endocíclico ν C-O) (Lanher, 1991; Cadet *et al.*, 2000) mostraron una evolución similar en dos fases (Figura 7.1A y Tabla 7.1). En la subcorteza, la absorbancia a 1160 cm^{-1} se incrementa durante los seis primeros días y entonces decrece hasta el final de la maduración (Tabla 7.1). Esta evolución comparada con el continuo decremento de los picos atribuidos a la lactosa sola, puede ser explicada por la presencia de monosacáridos (glucosa y galactosa) provenientes de la degradación de la lactosa.

El cambio en la banda ~1115 cm^{-1} asociada a la suma del lactato y monosacáridos (ν C–OH) (Petibois *et al.*, 2000) fue significativa tanto para el corazón como para la subcorteza (Tabla 7.1). En el corazón, la señal permaneció estable hasta d20, descendiendo entonces rápidamente hasta d27. La absorbancia de la subcorteza se incrementó ligeramente de d1 hasta d6, descendiendo entonces moderadamente hasta d27. Estos cambios son similares a los descritos para el metabolismo del lactato por Engel *et al.* (2001b) y Leclercq-Perlat *et al.* (2004). Durante los 6 primeros días se observa un incremento en la concentración de lactato es observado ligado a al metabolismo de las bacterias ácido-lácticas, es seguido por un decremento de la concentración el cual fue más rápido en la subcorteza que en el corazón.

El pico a ~1402 cm^{-1} asociado con los iones carboxilato (-COOH) (Coates, 2000) aparece más temprano en la subcorteza que en el corazón. En la subcorteza, la absorbancia se incrementa desde d7 hasta d27 mientras que en el corazón se incrementa solamente al final de la maduración (Figura 7.1A-B). Estos cambios fueron significativos para ambas secciones del queso (Tabla 7.1). La producción de ácidos orgánicos a partir del lactato ha sido descrita anteriormente. McSweeney (2004) hizo una revisión de diferentes mecanismos bioquímicos que producen propionato, acetato, formato, piruvato, etc. en relación con los microorganismos involucrados.

La región entre 1700 cm^{-1} y 1490 cm^{-1} muestra dos picos importantes, el Amida I a ~1640 cm^{-1} (ν C=O, ν C-N) y el Amida II a ~1550 cm^{-1} (δ N-H y ν C-N) asociados con la respuesta proteica (Dufour y Robert, 2000; Grappin *et al.*, 2000; Robert y Dufour, 2000). Se observaron

cambios significativos para las bandas Amida I y II en la subcorteza, y sólo para la Amida II en el corazón (Tabla 7.1). En los espectros de la subcorteza, la señal de las bandas Amida inicialmente permaneció estable hasta d8, incrementándose de d8 hasta d27 (Figura 7.1A). Este incremento es más importante en la banda Amida II como se demuestra por el ANOVA (Tabla 7.1). En los espectros de corazón, la banda Amida II no muestra cambios hasta d20. Entonces, de d20 hasta d27, se observa un incremento en la señal (Figura 7.1B). La relación de las Absorbancias Amida I/Amida II (A.amida I/A.amida II) muestra un cambio significativo a través de la maduración para ambas secciones del queso (Tabla 7.1). Ésta permanece estable hasta d8 y d6 en el corazón y la subcorteza respectivamente, decreciendo entonces significativamente hasta el final de la maduración para ambas secciones.

La evolución de las bandas amida ha sido descrita para diferentes tipos de quesos (Guerzoni *et al.*, 1999; Mazerolles *et al.*, 2001; Vannini *et al.*, 2001). Las modificaciones en la intensidad y posición de las diferentes bandas en el pico Amida I han sido asociadas con cambios en la estructura secundaria de la caseína, agregación de proteínas e interacción proteína-agua (Mazerolles *et al.*, 2001; Vannini *et al.*, 2001; Kulmyrzaev *et al.*, 2005). Se observó un continuo decremento en la banda 1625 cm^{-1} así como un continuo incremento en la banda 1550 cm^{-1} para quesos semiduros (Mazerolles *et al.*, 2001) y quesos bovinos experimentales inoculados con diferentes cepas de *Y. lipolytica* (Vannini *et al.*, 2001; Lanciotti *et al.*, 2005). Estos cambios han sido asociados con el tiempo de maduración así como con la cepa inoculada. Guerzoni *et al.* (1999) reportaron un incremento continuo para ambas bandas amida en quesos de cabra producidos por diferentes procesos.

En la región 3000-2750 cm^{-1} relacionada con las cadenas hidrocarbonadas (Dufour *et al.*, 2000; Riaublanc *et al.*, 2000) se observan dos picos a ~2920 cm^{-1} (ν_{as} CH_2) y ~2851 cm^{-1} (ν_s CH_2) así como dos hombros a ~2954 cm^{-1} (ν_{as} CH_3) y ~2871 cm^{-1} (ν_s CH_3). Los cambios de señal en los espectros de corazón no fueron significativos ni para los metilos ni para los metilenos (Tabla 7.1). En contraste, estos cambios fueron significativos para ambos grupos funcionales en los espectros de la subcorteza (Tabla 7.1), donde la señal se incrementó rápidamente hasta alcanzar un máximo en d8 antes de sufrir un rápido decremento. La evolución del coeficiente entre $A\nu_{as}\,CH_2/A\nu_{as}\,CH_3$ fue significativo para ambas secciones solamente después de d15.

Un cambio en las bandas metilo y metileno ha sido descrita para quesos semiduros (Dufour *et al.*, 2000), blandos (Kulmyrzaev *et al.*, 2005) y quesos bovinos experimentales (Lanciotti *et al.*, 2005). Dufour *et al.* (2000) describieron cambios en la forma de los picos metilo y metileno, así como un incremento en el cociente $A\nu_{as}\,CH_2/A\nu_{as}\,CH_3$ a lo largo de la maduración, mientras que Lanciotti *et al.* (2005) observaron la influencia de las cepas inoculadas en el incremento de la absorbancia de éstas bandas.

La señal alrededor de 1743 cm^{-1} (ν –C=O) asociada con el carbonilo de ésteres y ácidos orgánicos se incrementó considerablemente en la subcorteza hasta d8, entonces cayó hasta d27. El ANOVA confirma estas observaciones (Tabla 7.1). Un comportamiento similar ha sido descrito para quesos de cabra (Guerzoni *et al.*, 1999) y quesos experimentales (Lanciotti *et al.*, 2005), y ha sido asociada con el metabolismo del ácido láctico. La evolución en dos fases es similar a la descrita por Leclercq-Perlat *et al.* (2004) para el ácido láctico determinado por HPLC durante la maduración de Camembert.

7.1.2 Suspensión Desgrasada de Queso (DCS)

En la Figura 7.2 se muestran las evoluciones espectrales a lo largo de la maduración de las muestras de Suspensión Desgrasada de Queso (DCS) obtenidas a partir de la subcorteza y del corazón. Estas evoluciones espectrales son similares a las observadas para las muestras de queso. Los resultados del ANOVA y el análisis LSD de Fisher ($p \leq 0.05$) correspondientes se muestran en la Tabla 7.2. Al igual que con el queso solo se presentan algunos espectros y un extracto de los resultados del ANOVA, los resultados completos se muestran en el Anexo C (Tabla C.2).

Las señales de las bandas de lactosa a ~1096 cm^{-1}, ~1082 cm^{-1} y ~1045 cm^{-1} no mostraron cambios significativos hasta d13 en el corazón, y hasta d9 en la subcorteza (Figura 7.2). Más allá de esta edad la señal decrece. El ANOVA mostró cambios significativos para las tres bandas en el corazón, mientras que en la subcorteza solo la banda 1082 cm^{-1} fue significativa (Tabla 7.2).

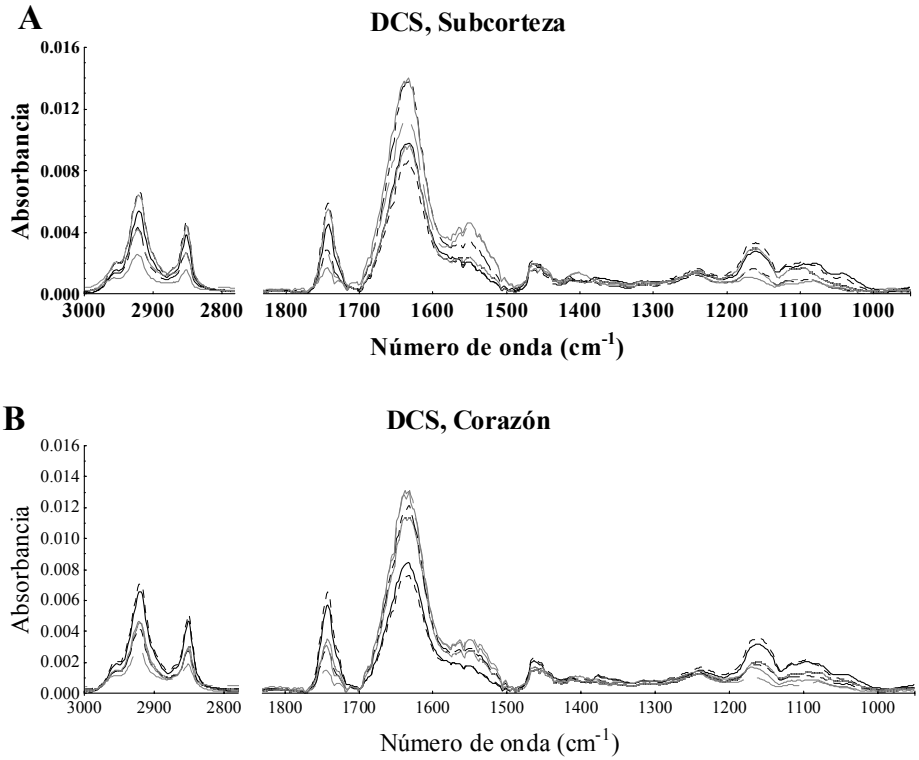


Figura 7.2 Evolución de espectros normalizados de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de la Suspensión Desgrasada de Queso Camembert (DCS). A) Subcorteza y B) Corazón. (—— d1, – – – d6, • • • • d10, – • • – d15, —— d20, — — d27).

La banda a 1115 cm^{-1} asociada con la suma del lactato con monosacáridos, permaneció estable en la sección de corazón hasta d13 entonces decreció hasta d27, mientras que en la subcorteza, la señal se incrementó ligeramente hasta d4 y entonces decreció substancialmente hasta d15. El ANOVA mostró que sólo los cambios en las suspensiones de corazón fueron significativos (Tabla 7.2). La banda de los ácidos orgánicos a 1406 cm^{-1} apareció hasta d10 en el corazón y d9 en la subcorteza y su señal se incrementó considerablemente hasta d20. Esta evolución fue significativa tanto para las suspensiones de corazón como de subcorteza (Tabla 7.2). Estos resultados son próximos a aquellos previamente descritos para el queso completo.

Tabla 7.2. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros Suspensión Desgrasada de Queso (DCS) y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) (p≤0,05)

BANDA	CS	P value	DÍAS DE MADURACIÓN					
			1	6	10	15	20	27
1082 cm^{-1} (Lactosa)	C	0,002*	0,0018 ^{ef}	0,0017 ^{ef}	0,00144 ^{bde}	0,0010 ^{ac}	0,0010 ^{ac}	0,0009 ^{a}
	SC	0,032*	0,0019 ^{cd}	0,0018 ^{cd}	0,00126 ^{abc}	0,0010 ^{ab}	0,0010 ^{a}	0,0008 ^{a}
1115 cm^{-1} (Lactato)	C	0,014*	0,0017 ^{de}	0,0017 ^{cde}	0,0012 ^{abcde}	0,0007 ^{a}	0,0007 ^{a}	0,0009 ^{ab}
	SC	0,171	0,0015 ^{bcd}	0,0017 ^{cd}	0,0012 ^{abcd}	0,0008 ^{ab}	0,0008 ^{a}	0,0008 ^{abc}
1161 cm^{-1} (Lactosa + ms)	C	0,014*	0,0027 ^{c}	0,0025 ^{bc}	0,00151 ^{ab}	0,0010 ^{a}	0,00103 ^{a}	0,0016 ^{abc}
	SC	0,171	0,0022 ^{ab}	0,00257 ^{b}	0,0019 ^{ab}	0,0013 ^{ab}	0,0010 ^{a}	0,0010 ^{ab}
1377 cm^{-1} (ms)	C	0,081	0,00105 ^{e}	0,00098 ^{de}	0,00072 ^{abc}	0,00067 ^{ab}	0,00065 ^{a}	0,001 ^{abcde}
	SC	0,297	0,00101 ^{c}	0,00098 ^{bc}	0,00079 ^{abc}	0,00065 ^{a}	0,00071 ^{ab}	0,0007 ^{abc}
1406 cm^{-1} (-COO-)	C	0,008*	0,0009 ^{abc}	0,0009 ^{abc}	0,0009 ^{abcd}	0,0010 ^{cde}	0,0011 ^{ef}	0,0012 ^{f}
	SC	0,020*	0,0009 ^{a}	0,0009 ^{a}	0,0009 ^{a}	0,0011 ^{ab}	0,0014 ^{c}	0,0011 ^{abc}
1551 cm^{-1} (Amide II)	C	0,006*	0,0021 ^{ac}	0,0020 ^{a}	0,0029 ^{bde}	0,0032 ^{def}	0,0037 ^{ef}	0,0042 ^{f}
	SC	0,038*	0,0024 ^{ab}	0,0023 ^{ab}	0,0027 ^{abc}	0,0037 ^{cde}	0,0044 ^{e}	0,004 ^{bcde}
1651 cm^{-1} (Amide I)	C	0,479	0,0075 ^{abc}	0,0059 ^{a}	0,0081 ^{abc}	0,0092 ^{c}	0,0085 ^{abc}	0,0086 ^{abc}
	SC	0,844	0,0089 ^{a}	0,0076 ^{a}	0,0082 ^{a}	0,0092 ^{a}	0,0077 ^{a}	0,0095 ^{a}
1651 cm^{-1} /1551 cm^{-1} (AI/AII)	C	0,000*	3,5593 ^{h}	2,908 ^{defg}	2,4668 ^{bc}	2,7934 ^{cde}	2,3315 ^{ab}	2,0407 ^{a}
	SC	0,000*	3,6782 ^{g}	2,9961 ^{de}	2,4954 ^{bcd}	2,3637 ^{bc}	1,7771 ^{a}	2,1391 ^{ab}
1741 cm^{-1} (C=O)	C	0,151	0,00454 ^{b}	0,00407 ^{b}	0,00192 ^{ab}	0,00120 ^{a}	0,00111 ^{a}	0,00302 ^{ab}
	SC	0,415	0,00358 ^{ab}	0,00414 ^{b}	0,00287 ^{ab}	0,00189 ^{ab}	0,00124 ^{a}	0,00212 ^{ab}
2850 cm^{-1} (CH_2)	C	0,240	0,00381 ^{c}	0,00365 ^{bc}	0,00225 ^{abc}	0,00177 ^{a}	0,00186 ^{ab}	0,0030 ^{abc}
	SC	0,465	0,00313 ^{ab}	0,00378 ^{b}	0,0029 ^{ab}	0,00228 ^{ab}	0,00189 ^{a}	0,00228 ^{ab}
2954 cm^{-1} (CH_3)	C	0,555	0,00162 ^{ab}	0,00173 ^{ab}	0,001307 ^{ab}	0,00113 ^{a}	0,00125 ^{ab}	0,00181 ^{ab}
	SC	0,802	0,00137 ^{a}	0,00175 ^{a}	0,001617 ^{a}	0,00144 ^{a}	0,00151 ^{a}	0,00154 ^{a}
2954 cm^{-1}/ 2850 cm^{-1} (CH_3/ CH_2)	C	0,037*	0,42952 ^{a}	0,5175 ^{abc}	0,6248 ^{cdef}	0,70142 ^{e}	0,6696 ^{def}	0,60 ^{abcdef}
	SC	0,026*	0,44625 ^{ab}	0,47731 ^{ab}	0,6416 ^{bc}	0,6344 ^{abc}	0,8910 ^{d}	0,677 ^{abcd}

ms: monosacáridos. CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza. AI/AII: Coeficiente de las señales Amida.

* Significativo a p≤0,05.

$^{a-g}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes (p≤0,05)

En la región 1700-1490 cm^{-1}, la absorbancia de las bandas Amida I y Amida II y su coeficiente mostró evoluciones similares a aquellas del queso para las dos secciones estudiadas (Figura 7.2). Mientras que la señal Amida I presentó un ligero incremento para ambos corazón y subcorteza, la señal Amida II se incrementó substancialmente. Sin embargo, las modificaciones en la absorbancia en función del tiempo de maduración fue menos importante que aquellas medidas en queso (Tabla 7.2).

Las DCS mostraron las mismas bandas en la región 3000-2800 cm^{-1} que mostró el queso (Figura 7.2) pero sus evoluciones a lo largo de la maduración fueron diferentes: Los cambios en la absorbancia en el corazón y en la subcorteza no fueron significativos para estas bandas. La relación $A\nu_{as}\ CH_2/A\nu_{as}\ CH_3$, sin embargo, presentó una evolución significativa como la observada en los análisis de queso.

La información espectral de los espectros de DCS es muy cercana a la obtenida para el queso. Sin embargo, existen diferencias, notablemente en la evolución de las zonas espectrales vinculadas con la lactosa. Los vínculos entre los espectros de infrarrojo y las evoluciones conocidas de los diferentes compuestos son menos fácil a establecer a partir de los espectros de DSC que a partir de los espectros de los quesos completos. Consecuentemente, éste análisis espectral no habría dado ninguna información suplementaria.

7.1.3 Grasa purificada

Las evoluciones de los espectros de infrarrojo de la Grasa Purificada (PF) son muy limitadas (Figura 7.3). Las bandas a 2920 cm^{-1} ($\nu_{as}\ CH_2$), 2850 cm^{-1} ($\nu_s\ CH_2$), 1741 cm^{-1} (ν C=O), 1163 cm^{-1} (ν C–O y δ –CH_2-) y 1119 cm^{-1} (ν C=O) asignadas a las diferentes funciones lipídicas (Cadet *et al.*, 2000; Riaublanc *et al.*, 2000) no mostraron una evolución obvia. El ANOVA no mostró diferencias significativas para la PF de corazón ni para la de subcorteza (Tabla 7.3 y C.3 del Anexo C) por lo que solo se muestra una de ellas.

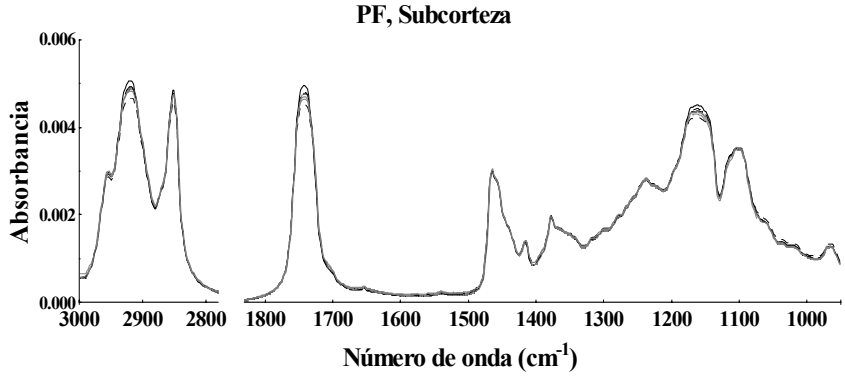


Figura 7.3 Evolución de espectros normalizados de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de las muestras de Grasa Purificada (PF) de la subcorteza (—— d1, – – – d6, • • • • d10, – • • – d15, —— d20, — — d27).

7.1.4 Fracciones nitrogenadas

En la Figura 7.3 (A-D) se muestran los espectros de infrarrojo en la región 1700-1490 cm^{-1} para las cuatro fracciones nitrogenadas de subcorteza. Todas ellas muestran los picos Amida I y Amida II con la absorbancia en la Amida I siempre superior a la Amida II. El ANOVA (Tabla 7.3) mostró las modificaciones significativas en las absorbancias ($p \leq 0.05$) para el corazón y la subcorteza, así como para el coeficiente A.amida I/A.amida II.

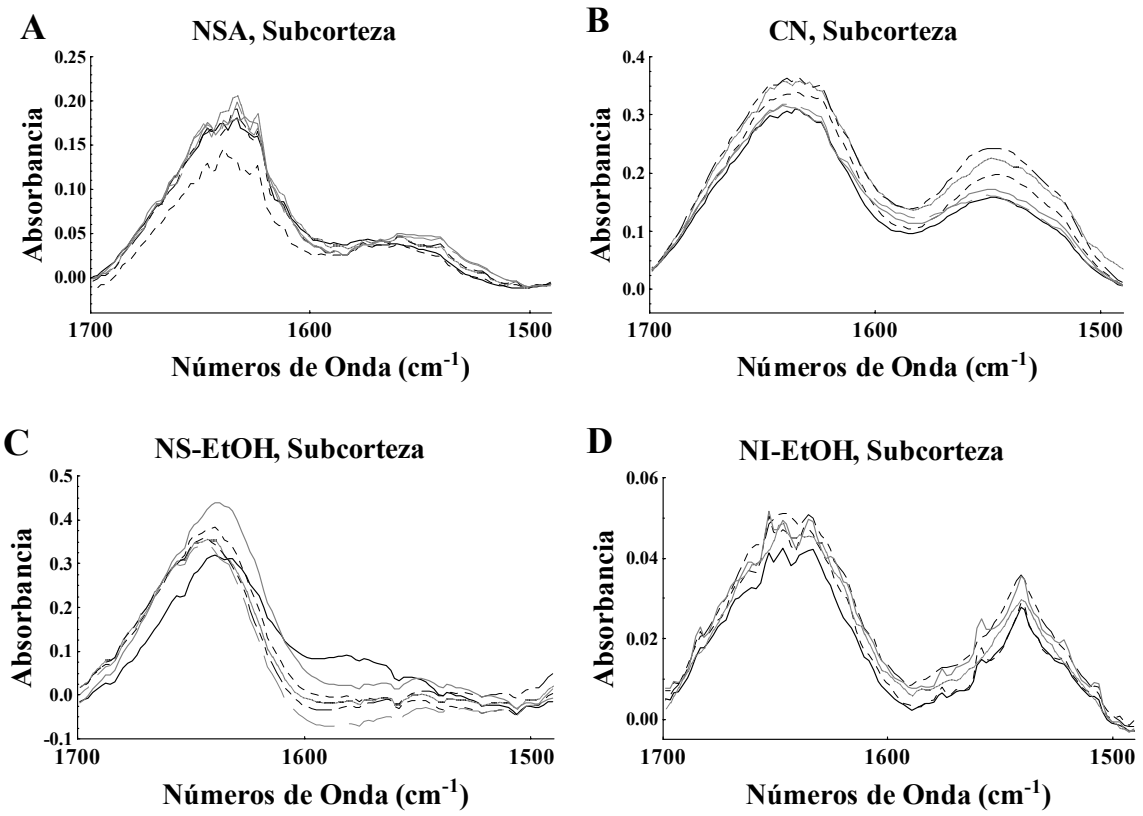


Figura 7.4 Evolución de espectros de infrarrojo medio en subcorteza durante la maduración. A) Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), B) Caseína (CN), C) Nitrógeno Soluble en Etanol (NS-EtOH) y D) Nitrógeno Insoluble en Etanol (NI-EtOH) (—— d1, – – – d6, • • • • d10, – • • – d15, —— d20, — — d27).

Los espectros del Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA) muestra una evolución significativa solo para el pico Amida II que permanece estable hasta d13 y d15 en la subcorteza y el corazón respectivamente, y luego se incrementa (Figura 7.4A, Tabla 7.3, Tabla C.3 del Anexo C). Estas evoluciones fueron diferentes a las descritas para el contenido de nitrógeno en fracciones NSA de quesos Camembert (Schlesser *et al.*, 1992; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004). Estos autores describen un incremento en el índice de NSA desde d3 hasta d10, permaneciendo entonces constante hasta el final de la maduración. Diferencias en la concentración de NSA entre el corazón y la subcorteza han sido reportadas por Leclercq-Perlat *et al.* (2004). Las diferencias observadas en este trabajo pueden ser explicadas por el hecho de que el índice de NSA mide el contenido total de nitrógeno en esta fracción (péptidos y aminoácidos) (Christensen *et al.*, 1991) mientras que la espectroscopia de infrarrojo mide las vibraciones causadas por los enlaces amida de los péptidos (Dufour y Robert, 2000).

En los espectros de caseína (CN), la señal Amida II se incrementa ligeramente hasta d13 en ambas secciones y entonces decrece (Figura 7.4B). Los resultados del ANOVA, sin embargo, no mostraron ningún cambio significativo para los picos Amida I o la Amida II. Solo su relación en la subcorteza mostró un incremento significativo después de d13 (Tabla 7.3 y Tabla C.3 del Anexo C). Las mediciones de absorbancia de los picos Amida en estos precipitados no fue lo suficientemente discriminante para destacar la hidrólisis de las caseínas. De hecho, la fracción CN (no soluble a pH 4,6) contiene caseínas y péptidos de alto peso molecular. Estas modificaciones pueden ser estudiadas por medio de tratamiento de datos más sofisticados usando, por ejemplo, algoritmos de deconvolución que permitirían destacar la estructura secundaria de las proteínas (Fontecha *et al.*, 1996; Wi *et al.*, 1998).

Los mismos resultados estadísticos fueron obtenidos para la evolución espectral del Nitrógeno Soluble en Etanol (NS-EtOH) (Figura 7.4C, Tabla 7.3 y Tabla C.3 del Anexo C). Esta fracción contiene pequeños péptidos y aminoácidos libres a concentración baja, y la espectroscopia de infrarrojo no fue lo suficientemente sensible para distinguir las débiles variaciones de concentración.

Tabla 7.3. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de Grasa purificada (PF), Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), Caseína (CN) y Nitrógeno soluble (NS-EtOH) e Insoluble (NI-EtOH) en Etanol y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) (p≤0,05)

	BANDA	CS	P value	DÍAS DE MADURACIÓN					
				1	6	9	15	20	27
PF	1119 cm^{-1}	C	0,5637	0,00310 ^{ab}	0,00308 ^{ab}	0,00314 ^{ab}	0,00310 ^{ab}	0,00311 ^{ab}	0,00312 ^{ab}
		SC	0,0853	0,00319 ^{c}	0,00312 ^{bc}	0,00319 ^{bc}	0,00301 ^{ab}	0,00293 ^{a}	0,00312 ^{bc}
	1163 cm^{-1}	C	0,5732	0,00451 ^{a}	0,00436 ^{a}	0,00431 ^{a}	0,00437 ^{a}	0,00429 ^{a}	0,00430 ^{a}
		SC	0,0902	0,00447 ^{bc}	0,00431 ^{ab}	0,00436 ^{ab}	0,00427 ^{a}	0,00424 ^{a}	0,00430 ^{ab}
	1416 cm^{-1}	C	0,6516	0,00134 ^{ab}	0,00138 ^{ab}	0,00137 ^{ab}	0,00138 ^{ab}	0,00141 ^{b}	0,00137 ^{ab}
		SC	0,0461*	0,00135 ^{abc}	0,00138 ^{bcd}	0,00135 ^{abc}	0,00142 ^{d}	0,00141 ^{d}	0,00137 ^{abcd}
	2954 cm^{-1}/2872 cm^{-1}	C	0,0554	1,16347 ^{cd}	1,15207 ^{abc}	1,14724 ^{abc}	1,15147 ^{abc}	1,14922 ^{ab}	1,14962 ^{abc}
		SC	0,5504	1,15556 ^{ab}	1,14765 ^{a}	1,14507 ^{a}	1,14553 ^{a}	1,14515 ^{a}	1,14952 ^{ab}
NSA	1554 cm^{-1}	C	0,0053*	0,0376 ^{ab}	0,0385 ^{ab}	0,0365 ^{ab}	0,0431 ^{bcd}	0,0489 ^{d}	0,0507 ^{d}
		SC	0,0135*	0,0409 ^{abcd}	0,0374 ^{abc}	0,0462 ^{abcd}	0,0518 ^{de}	0,0617 ^{e}	0,0559 ^{de}
	1633 cm^{-1}	C	0,3759	0,1064 ^{abc}	0,0735 ^{a}	0,0679 ^{ab}	0,1228 ^{abc}	0,1329 ^{bc}	0,1468 ^{bc}
		SC	0,8844	0,1547 ^{ab}	0,1330 ^{ab}	0,1316 ^{ab}	0,1268 ^{ab}	0,1552 ^{ab}	0,2045 ^{b}
	1633 cm^{-1} /1554 cm^{-1}	C	0,9115	2,7778 ^{a}	1,9365 ^{a}	1,8581 ^{a}	2,8673 ^{a}	2,7465 ^{a}	2,8977 ^{a}
		SC	0,3459	3,9502 ^{abc}	3,5997 ^{abc}	2,8459 ^{abc}	2,4784 ^{a}	2,8842 ^{ab}	3,6617 ^{abc}
CN	1548 cm^{-1}	C	0,0815	0,1356 ^{a}	0,1665 ^{ab}	0,1582 ^{ab}	0,1986 ^{bc}	0,2165 ^{c}	0,1467 ^{ab}
		SC	0,0958	0,1430 ^{abcd}	0,1830 ^{bcde}	0,169 ^{abcde}	0,1347 ^{abc}	0,1256 ^{ab}	0,0992 ^{a}
	1633 cm^{-1}	C	0,4009	0,2766 ^{ab}	0,3211 ^{abc}	0,3120 ^{abc}	0,2392 ^{a}	0,2740 ^{ab}	0,2542 ^{ab}
		SC	0,2490	0,2867 ^{ab}	0,3151 ^{abc}	0,3066 ^{abc}	0,2731 ^{a}	0,3613 ^{c}	0,2897 ^{abc}
	1633 cm^{-1} /1548 cm^{-1}	C	0,3456	2,1178 ^{b}	1,8952 ^{b}	1,9388 ^{b}	1,3663 ^{a}	1,6934 ^{ab}	1,9748 ^{b}
		SC	0,0362*	1,9344 ^{ab}	1,7576 ^{a}	1,8431 ^{ab}	1,8154 ^{a}	2,2770 ^{bc}	2,5627 ^{c}
NS-EtOH	1579 cm^{-1}	C	0,2246	0,0314 ^{c}	-0,0198 ^{abc}	-0,0591 ^{abc}	-0,0638 ^{a}	-0,0069 ^{abc}	-0,0543 ^{abc}
		SC	0,5313	0,0341 ^{b}	-0,0253 ^{ab}	-0,0467 ^{ab}	-0,0605 ^{a}	-0,0445 ^{a}	-0,0663 ^{a}
	1648 cm^{-1}	C	0,7818	0,3494 ^{a}	0,2684 ^{a}	0,1500 ^{a}	0,2039 ^{a}	0,2055 ^{a}	0,3420 ^{a}
		SC	0,9721	0,3115 ^{b}	0,2330 ^{ab}	0,1240 ^{a}	0,2149 ^{ab}	0,1989 ^{ab}	0,3368 ^{b}
	1648 cm^{-1} /1579 cm^{-1}	C	0,6082	-5,5735 ^{ab}	9,3885 ^{b}	-2,5369 ^{ab}	-3,0095 ^{ab}	-29,2286 ^{a}	-6,2983 ^{ab}
		SC	0,7148	-6,7253 ^{ab}	-57,2104 ^{a}	-2,6523 ^{ab}	-3,4903 ^{ab}	-3,8709 ^{ab}	-5,0788 ^{ab}
NI-EtOH	1542 cm^{-1}	C	0,0220*	0,0310 ^{de}	0,0192 ^{ab}	0,025 ^{abcde}	0,025 ^{abcde}	0,0286 ^{cde}	0,0321 ^{de}
		SC	0,0340*	0,0299 ^{bcd}	0,0249 ^{ab}	0,0348 ^{cd}	0,0330 ^{cd}	0,0342 ^{cd}	0,0321 ^{cd}
	1648 cm^{-1}	C	0,0559	0,0473 ^{b}	0,0098 ^{a}	0,0173 ^{ab}	0,0176 ^{a}	0,0196 ^{a}	0,0330 ^{ab}
		SC	0,0002*	0,0242 ^{a}	0,0407 ^{bc}	0,0426 ^{bcd}	0,0449 ^{cde}	0,0482 ^{e}	0,0471 ^{de}
	1648 cm^{-1} /1542 cm^{-1}	C	0,2758	1,6539 ^{c}	0,4932 ^{a}	0,6951 ^{abc}	0,7862 ^{abc}	0,7117 ^{abc}	1,0297 ^{abc}
		SC	0,0566	0,8093 ^{ab}	1,6961 ^{de}	1,2241 ^{bc}	1,4013 ^{cd}	1,4302 ^{cd}	1,4665 ^{cd}

ms: monosacáridos. CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza. AI/AII: Coeficiente de las señales Amida.

* Significativo a p≤0,05.

$^{a-e}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes (p≤0,05)

Se observaron evoluciones significativas para los espectros del Nitrógeno Insoluble en Etanol (NI-EtOH) pero los cambios en absorbancia fueron limitados en el tiempo y débiles (Figura 7.4D, Tabla 7.3, Tabla C.3 del Anexo C). De d2 a d8, la señal Amida I presentó una evolución opuesta entre las secciones subcorteza y el corazón, incrementándose en la subcorteza pero decreciendo en el corazón. Después de d8, permanecieron estables. La absorbancia de la Amida II evolucionó significativamente a lo largo de la maduración. Ésta decreció hasta d6 en el corazón, pero permaneció estable en la subcorteza a lo largo de la maduración. El coeficiente A.amida I/A.amida II en la subcorteza se incrementó fuertemente entre d1 y d6. El valor permaneció entonces estable hasta el final de la maduración. La evolución observada para la banda Amida I en la subcorteza es similar a la evolución del índice NNP en la corteza descrita por Leclercq-Perlat *et al.* (2004). Estos autores mencionan un rápido incremento desde d3 hasta d8 seguida por un lento incremento. En el corazón, sin embargo, la evolución fue diferente. Mientras que un incremento constante a partir del d4 en el índice NNP es reportado por Leclercq-Perlat *et al.* (2004), en el presente trabajo, la señal de la banda Amida I del corazón decreció. Parece difícil explicar la evolución espectral de las bandas amida en las fracciones NI-EtOH solamente sobre la base del índice de NNP.

Los cambios espectrales observados para NSA parecen estar más correlacionados con la evolución de péptidos de tamaño grande y mediano que con péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos libres, ya que solo la fracción NI-EtOH mostró evoluciones significativas para ambas bandas.

7.2 Parámetros Fisicoquímicos, correlación y análisis de componentes principales

Las correlaciones observadas entre los parámetros fisicoquímicos evaluados son mostrados en la Tabla 7.4. La mayoría de los parámetros mostraron correlaciones significativas ($p<0,05$) entre ellos, con excepción de la Materia Seca (MS) que muestra correlaciones sólo con la lactosa ($R = -0,53$) y el NNP ($R = 0,52$). Como se esperaba, la lactosa y el ácido láctico mostraron correlaciones positivas entre ellos y una correlación negativa con el pH, pero además con NSA, NNP y NH_4^+. Por su parte, las fracciones nitrogenadas mostraron una alta correlación entre ellas ($R>0,87$). el pH mostró altas correlaciones con todos los parámetros con excepción de la MS ($R =$

0.34). Estos resultados fueron consistentes con aquellos reportados por Fallico *et al.* (2004) para el pH y las fracciones nitrogenadas durante la maduración de queso Ragusano.

Tabla 7.4. Coeficientes de correlación para las variables fisicoquímicas analizadas en los quesos tipo Camembert durante la maduración [a].

Correlación	pH	Lactosa	LA	NSA	NNP	NH_4^+	MS
pH	1,00						
Lactosa	**-0,84***	1,00					
Ácido Láctico (LA)	**-0,96***	**0,77***	1,00				
NSA	**0,97***	**-0,88***	**-0,94***	1,00			
NNP	**0,96***	**-0,87***	**-0,95***	**0,96***	1,00		
NH_4^+	**0,88***	**-0,71***	**-0,93***	**0,87***	**0,87***	1,00	
MS	0,34	**-0,53***	-0,34	0,34	**0,52***	0,23	1,00

[a] Abreviaciones: NSA (nitrógeno soluble en ácido), NNP (nitrógeno no proteico) y MS (materia seca).
***** Significativo a $p \leq 0,05$.

El mapa factorial del Análisis de Componentes Principales (PCA) y la gráfica de las cargas de los factores para los parámetros fisicoquímicos, definidos por los PC1 y PC3 (Componentes Principales 1 y 3), se muestran el la Figura 7.5 (A y B). Estos componentes explicaron respectivamente, el 80,58 % y 3,56 % del total de la varianza. En el mapa factorial (Figura 7.5A) se observó una evolución en 2 fases. En el primer eje, el valor de las coordenadas factoriales de las variables (día de maduración) decrece continuamente de acuerdo con el tiempo de maduración. En el tercer eje, ellos decrecen entre d1 y d7, y entonces se incrementan de d8 hasta d20.

Como se muestra en la gráfica de cargas (Figura 7.5B), todas las variables estudiadas con excepción de la MS (R = -0,486), están fuertemente correlacionadas (R>0,89) con el PC1. La lactosa y el ácido láctico (LA) mostraron correlaciones positivas (R = 0,893 y 0,962, respectivamente) mientras que el pH (R = -0,973) y las fracciones nitrogenadas NSA (R = -0,976), NNP (R = -0,989), NH_4^+ (R = -0,895) mostraron correlaciones negativas. Estas observaciones sugieren que el PC1 describe simultáneamente la glucólisis revelada por el

decremento de las concentraciones de lactosa y LA y el incremento en el pH, y la proteólisis revelada por el incremento de las fracciones nitrogenadas.

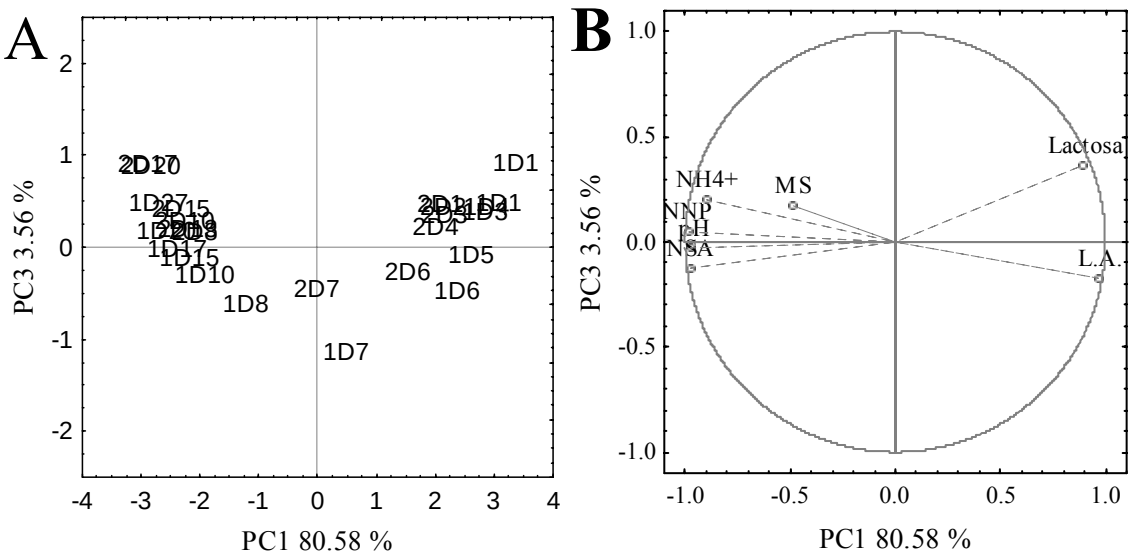


Figura 7.5. Gráficas de los Componentes Principales 1 y 3 (PC1 y PC3) del Análisis de Componentes Principales (ACP) de los parámetros fisicoquímicos. A: Mapa factorial de resultados y B: Cargas de los factores. xDz: códigos de las muestras, donde x= lote y z = día de maduración, MS: materia seca, NSA: nitrógeno soluble en ácido, NNP: nitrógeno no proteico, L.A.: ácido láctico.

7.3 Espectros de infrarrojo, análisis de componentes principales

La aplicación del ACP al grupo completo de espectros de cada fracción analizada permitió extraer importante información espectral que describe los cambios a lo largo de la maduración y asociarlos con las reacciones bioquímicas correspondientes.

7.3.1 Queso

El mapa factorial del ACP de los espectros de queso, definido por el PC1 y el PC2, son presentados en mapas separados para una mejor lectura, sin embargo, las nuevas coordenadas de los espectros para las secciones de subcorteza y corazón fueron calculadas a partir del mismo

ACP (Figura 7.6A-B). Estos componentes describieron respectivamente el 81,2 % y 10,8 % del total de la varianza.

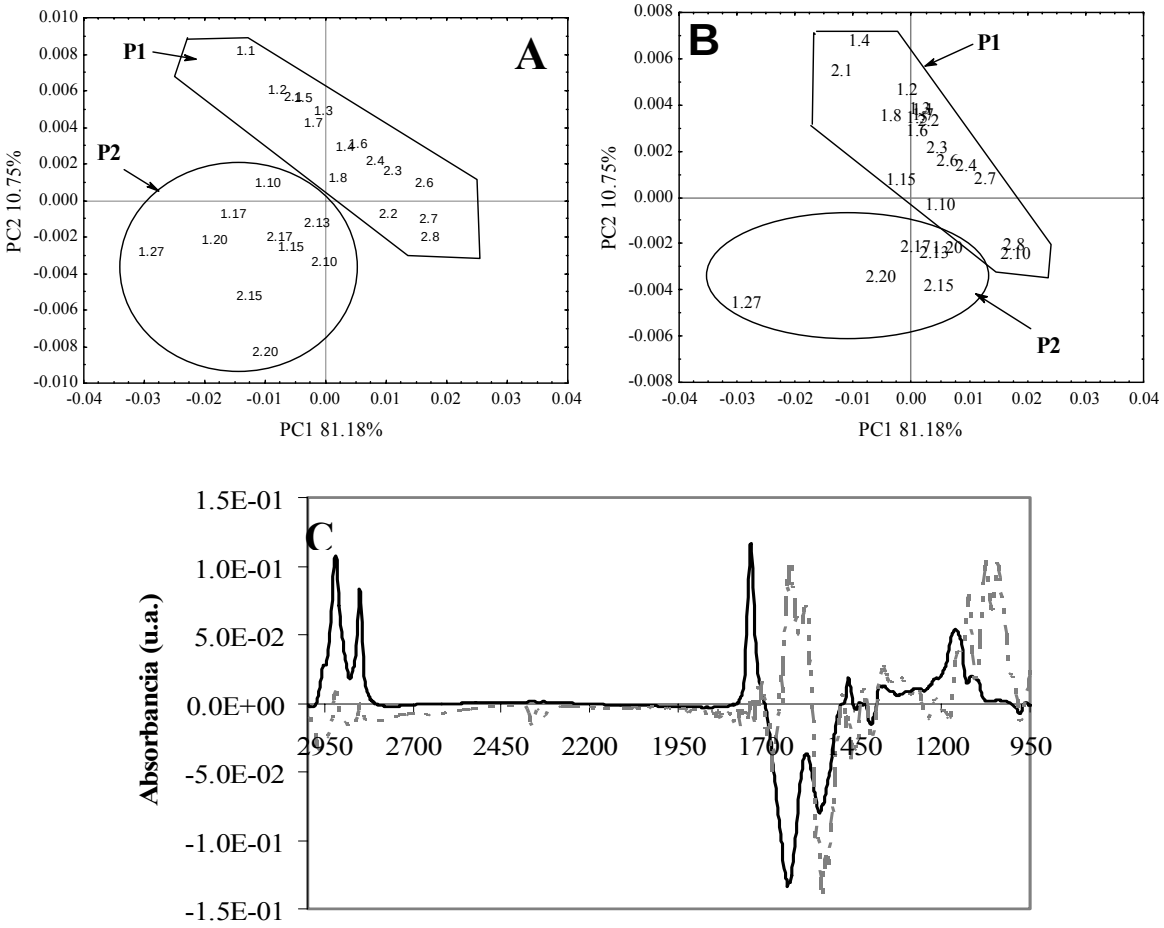


Figura 7.6. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros de queso. Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial de Subcorteza (SC), B) Mapa factorial de Corazón (C) y C) Vectores propios (—— PC1 y — — — PC2). Códigos de las muestras: x.y donde x= lote y y= día de maduración.

Los mapas espectrales mostraron una evolución en dos fases dependiendo del tiempo de maduración. En la primera fase (P1), una combinación de PC1 y PC2 hizo posible describir una evolución continua desde d1 hasta d8 o cerca de d15, en la subcorteza y el corazón respectivamente. En la segunda fase (P2), fue posible describir la evolución espectral hasta d27 en relación con el tiempo de maduración, principalmente de acuerdo con el eje 1.

Los vectores propios correspondientes al PC1 y PC2 (Figura 7.6C) proveen información importante acerca de las vibraciones que describen la evolución espectral a lo largo de la maduración del queso, así como de las reacciones bioquímicas involucradas. El vector propio 2 mostró dos regiones importantes, la región 1490-950 cm^{-1} asignada a los carbohidratos (lactosa y monosacáridos), y la región amida (1700-1490 cm^{-1}) asignada a las proteínas. Esta última mostró la oposición entre los picos a 1632 cm^{-1} (Amida I) y 1543 cm^{-1} (Amida II). A 1589 cm^{-1} apareció un pico correspondiente al lactato. Estas observaciones sugieren que el PC2 describe la hidrólisis de la lactosa y el fenómeno de la proteólisis a lo largo de la maduración durante la primer fase. El vector propio 1 mostró dos picos negativos a 1639 cm^{-1} (Amida I) y 1552 cm^{-1} (Amida II) opuestos a los picos a 2923 cm^{-1} (CH_2), 2852 cm^{-1} (CH_2) y 1743 cm^{-1} (lactato –C=O) así como a 1169 cm^{-1} (suma de lactosa y monosacáridos). Los picos más importantes vinculado con el PC1 son aquellos de las proteínas sugiriendo que la proteólisis y el consumo del ácido láctico son los principales fenómenos descritos por este vector.

La evolución espectral en la zona 1700-1500 cm^{-1} ha sido estudiada para quesos semiduros (Mazerolles *et al.*, 2001) y quesos blandos (Kulmyrzaev *et al.*, 2005). Bandas similares fueron observadas en los patrones espectrales del ACP por estos autores. Los cambios en esta región hicieron posible clasificar estos quesos de acuerdo con su tiempo de maduración. La oposición entre la Amida I y la Amida II también fue observada, pero estos autores no proporcionan una explicación para este resultado.

La banda de lactato a 1743 cm^{-1} fue observada para quesos experimentales (Guerzoni *et al.*, 1999; Lanciotti *et al.*, 2005) y aquella a 1589 cm^{-1} para quesos blandos (Kulmyrzaev *et al.*, 2005). En el presente trabajo, esta última está presente en el PC2 que está correlacionado con la evolución espectral del queso de d1 hasta d8, periodo durante el cual la concentración del ácido láctico se incrementa desde d1 hasta d4 antes de decrecer a partir de d5 (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004).

El ACP de los parámetros fisicoquímicos (Figura 7.5A) del queso mostró resultados similares a los observados para el ACP de los espectros de infrarrojo. Esta similitud sugiere que los datos espectrales pueden ser correlacionados con los valores fisicoquímicos.

7.3.2 Suspensiones Desgrasadas de Queso (DCS)

El mapa factorial del ACP de las Suspensiones Desgrasadas de queso (DCS) mostradas en la Figura 7.7A, están definidos por el PC1 y PC2. Estos componentes, que explican el 85,6 % y 7,2% de la varianza total respectivamente, muestran una evolución en dos fases, dependiendo del tiempo de maduración, similar a la descrita para los quesos completos. Para mayor claridad solo se muestra uno de los lotes de maduración. La primera fase (P1), descrita principalmente por PC1, hizo posible describir la evolución de d1 hasta d13 y d15 en la subcorteza y el corazón respectivamente. La segunda fase (P2) descrita principalmente por el PC2, hace posible describir la evolución hasta d27. Algunas muestras no estuvieron correctamente localizadas en el mapa factorial. Las muestras de DCS fueron más inestables que el queso durante las mediciones por ATR. Parece que algunas partículas pudieron asentarse en el cristal del ATR y perturbaron la adquisición espectral.

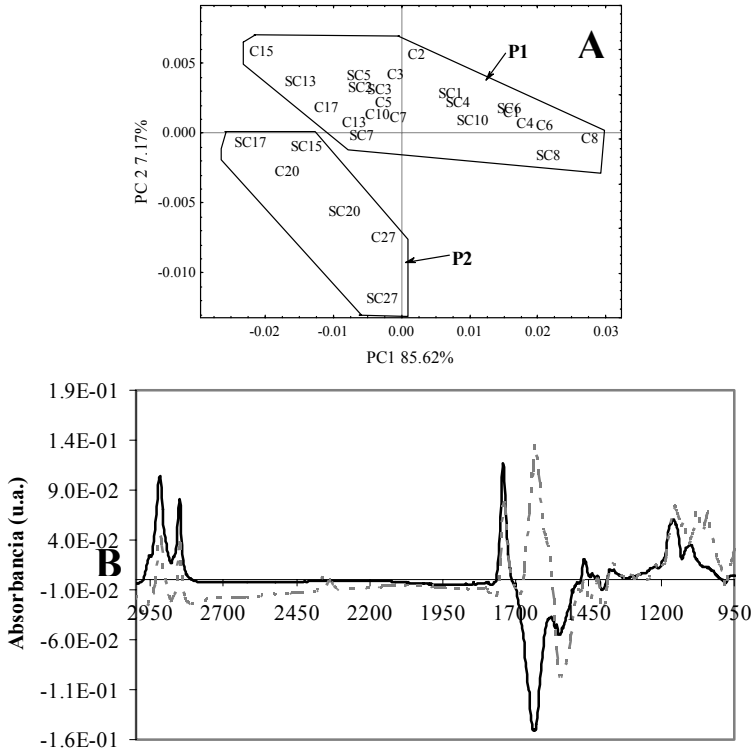


Figura 7.7. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros de Suspensión Desgrasada de queso (DCS). Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial de Subcorteza (SC) y Corazón (C) y B) Vectores propios (———— PC1 y — — — PC2). Código de las muestras SCy y Cy, donde y= días de maduración.

Los vectores propios correspondientes al PC1 y PC2 (Figura 7.7B) presentan el mismo perfil que los calculados para el queso entero.

7.3.3 Grasa purificada

El mapa factorial del ACP de las Grasas purificadas (PF) definido por PC1 y PC2 (72,8 % y 14,4 % de la varianza total, respectivamente) no permitió describir una clara evolución de la maduración (Figura 7.8A). Este resultado está de acuerdo con los resultados del ANOVA que mostraron que no existía diferencia significativa en la evolución espectral en esta zona. Las banda a 2921 cm^{-1} (CH_2), 2852 cm^{-1} (CH_2) y 1743 cm^{-1} (éster -C=O) de los espectros de PF están altamente correlacionadas con el primer vector propio (Figura 7.8B). No fue posible describir la evolución de la maduración sobre la base de estos datos. Las mismas correlaciones fueron encontradas entre estas bandas y el primer vector propio del ACP del queso (Figura 7.6C). En este caso, sin embargo, la evolución de la maduración fue visible en el mapa factorial. Estos resultados sugieren que en el queso, las modificaciones espectrales en la zona 3000–2780 cm^{-1} están relacionadas con la grasa pero también con otros compuestos como son los grupos metilo y metileno encontrados en las cadenas laterales de las proteínas.

Dufour *et al.* (2000) y Kulmyrzaev *et al.* (2005) usaron el análisis ACP de la región 3000-2780 cm^{-1} de espectros de infrarrojo para clasificar quesos semiduros y blandos de acuerdo con su tiempo de maduración. Estos autores sugieren que las modificaciones del ambiente de los grupos metilo, es resultado de una cristalización de grasas, lo que altera la estructura de las cadenas acilo de los triglicéridos. El ACP llevó a una discriminación parcial de las muestras. Para mejorar los resultados, datos de otras zonas espectrales (1500-900 cm^{-1}, 1700-1500 cm^{-1}) u otras mediciones como la espectroscopia de fluorescencia (270-350 nm) fueron combinadas con los datos espectrales de grasa.

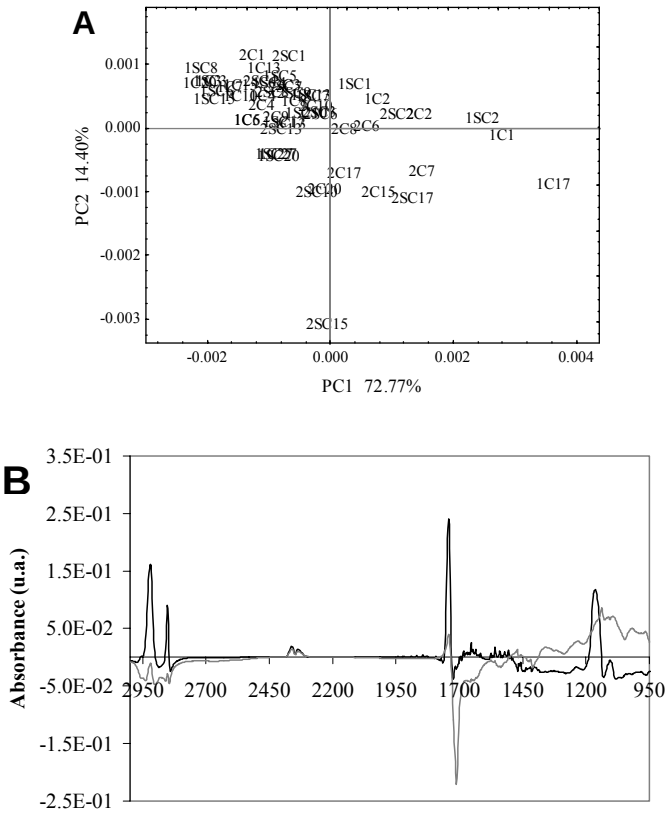


Figura 7.8. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros de la Grasa Purificada (PF). Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial y B) Vectores propios (——— PC1 y ———— PC2). Código de las muestras xSCy y xCy, donde x= lote y y= días de maduración.

7.3.4 Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA)

El mapa factorial del ACP de los espectros de NSA (Figura 7.9A) definido por el PC1, PC2 y PC3 explican respectivamente, el 57,0 %, 28,7 % y 5,5 % de la varianza total. Este mapa tridimensional permite describir la evolución de los espectros de NSA a lo largo de la maduración. La combinación de PC1 y PC3 mostraron una evolución espectral continua desde d8 hasta d27 para el corazón (P_{c2}) y una evolución en etapas para la sección de subcorteza (P_{ur1} y P_{ur2}). El PC2 permitió separar las muestras de acuerdo con la sección de queso de procedencia.

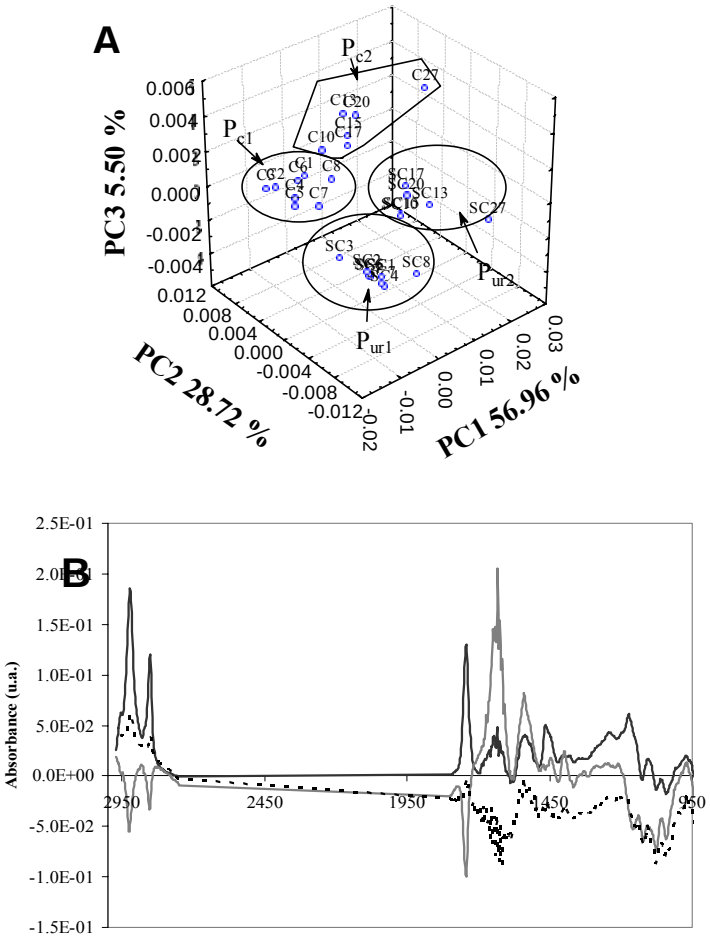


Figura 7.9. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros del Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA). Gráficas de los tres primeros componentes, PC1 PC2 y PC3: A) Mapa factorial (SC: Subcorteza y C: Corazón) y B) Vectores propios (——— PC1, ——— PC2 y — — — PC3). Código de las muestras SCy y Cy, donde y= días de maduración.

Para el PC1, los valores más altos en el vector propio fueron encontrados en las regiones 3000-2850 cm^{-1} y 1800-1700 cm^{-1} relacionadas con los grupos C-H y C=O de las cadenas acilo (Figura 7.9B). Bandas menores fueron también encontradas en la región 1700-1550 cm^{-1} (zona amida) y alrededor de 1350-1130 cm^{-1} (zona de monosacáridos). El vector propio 3 mostró sus valores más altos en las regiones de carbohidratos y Amida I. Estas observaciones sugieren que el PC1 describe sobretodo la hidrólisis de la lactosa y, en un menor nivel, el fenómeno de la proteólisis mientras que el PC3 describe ambos fenómenos. Para el PC2, los valores más altos del

vector propio fueron encontrados a 1550 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones amida, a 1745 cm^{-1} correspondiente al ácido láctico, y en la región 1200–950 cm^{-1} asignada a los carbohidratos. Estas observaciones sugieren que el PC2 describe en su mayor parte el fenómeno de la proteólisis y el consumo del ácido láctico.

Las diferencias a lo largo de la maduración en el índice de NSA, la hidrólisis de lactosa y el metabolismo del ácido láctico, entre el corazón y la subcorteza (Engel *et al.*, 2001a; Leclercq-Perlat *et al.*, 2004) fueron mostradas en la sección 7.1.1.

7.3.5 Nitrógeno Insoluble en Etanol (NI-EtOH)

Los resultados del ANOVA para el NI-EtOH mostró limitadas modificaciones en los espectros a lo largo de la maduración. Estos resultados fueron confirmados por ACP. En los mapas factoriales, no fue posible describir claramente las evoluciones espectrales de acuerdo con el tiempo. Sorprendentemente, solo los últimos espectros (d10 a d27) de las muestras de la sección de corazón pueden ser distinguidos de los otros en relación con el eje 1. Los valores más altos en el vector propio 1 estuvieron localizados a ~1650 cm^{-1} (Amida I).

7.3.6 Caseínas y Nitrógeno Soluble en Etanol (NS-EtOH)

Tal como se esperaba después de los resultados del ANOVA, el ACP de los espectros de CN y NS-EtOH no permitieron dilucidar vínculos claros entre los datos espectrales y el tiempo de maduración.

7.4 Regresión de mínimos cuadrados parciales

La regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) se aplicó primeramente, a los grupos espectrales de las dos secciones de queso (corazón y subcorteza) con la finalidad de predecir el tiempo de maduración. En un segundo análisis, la PLS fue aplicada con el objetivo de evaluar la relación entre los valores fisicoquímicos y las respuestas de los espectros de infrarrojo a lo largo de la maduración.

7.4.1 Predicción del tiempo de maduración

Los resultados de los modelos PLS se muestran en la Tabla 7.5 junto con los valores del coeficiente de determinación (R^2) y el Error Estándar de Calibración (SEC) para la serie de calibración, así como R^2 y la Raíz de la Media Cuadrada del Error de la Validación Cruzada (RMSECV) para la serie de validación. Se obtuvieron buenas correlaciones entre los tiempos de maduración observados y calculados ($R^2 > 0,96$) con un error cercano a un día para las series de calibración de las muestras tanto de subcorteza como de corazón. Estos resultados fueron confirmados por las buenas correlaciones entre los valores observados y predichos de las series de validación ($R^2 > 0,97$). El RMSECV fue también cercano a un día para las dos secciones de queso analizadas. La Figura 7.10 (A y B) representan las correlaciones entre el tiempo de maduración real y el tiempo predicho y muestra su buen ajuste.

Tabla 7.5. Resultados de la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) para el tiempo de maduración de queso usando los espectros de infrarrojo de queso entero*

Sección	Serie de Calibración					Serie de Validación		
	n	PRESS	Componentes	SEC	R^2	n	RMSECV	R^2
Subcorteza	17	0,22	7	0,88	0,99	8	1,16	0,97
Corazón	17	0,18	5	1,00	0,96	7	1,00	0,98

* Abreviaciones: n: Numero de muestras; PRESS: Suma de Cuadrados del Error Residual de Predicción; SEC: Error Estándar de Calibración en días; RMSECV: Raíz de la Media Cuadrada del Error de la Validación Cruzada en días.

En la subcorteza, la principal característica de la carga específica 1 (loading 1) de PLS (Figura 7.10C), representando el 73 % de la varianza total, son las regiones entre 1150-950 cm^{-1} asociada con la respuesta de los carbohidratos, alrededor de 1750 cm^{-1} asignada al lactato y 1380-1220 cm^{-1} la cual es difícil correlacionar con vibraciones conocidas. La carga específica 2 (loading 2) de PLS (Figura 7.10E) cuenta por el 18 % de la varianza total. Sus regiones más importantes son 1150-950 cm^{-1} y 1700-1490 cm^{-1} relacionadas principalmente con la respuesta de las proteínas.

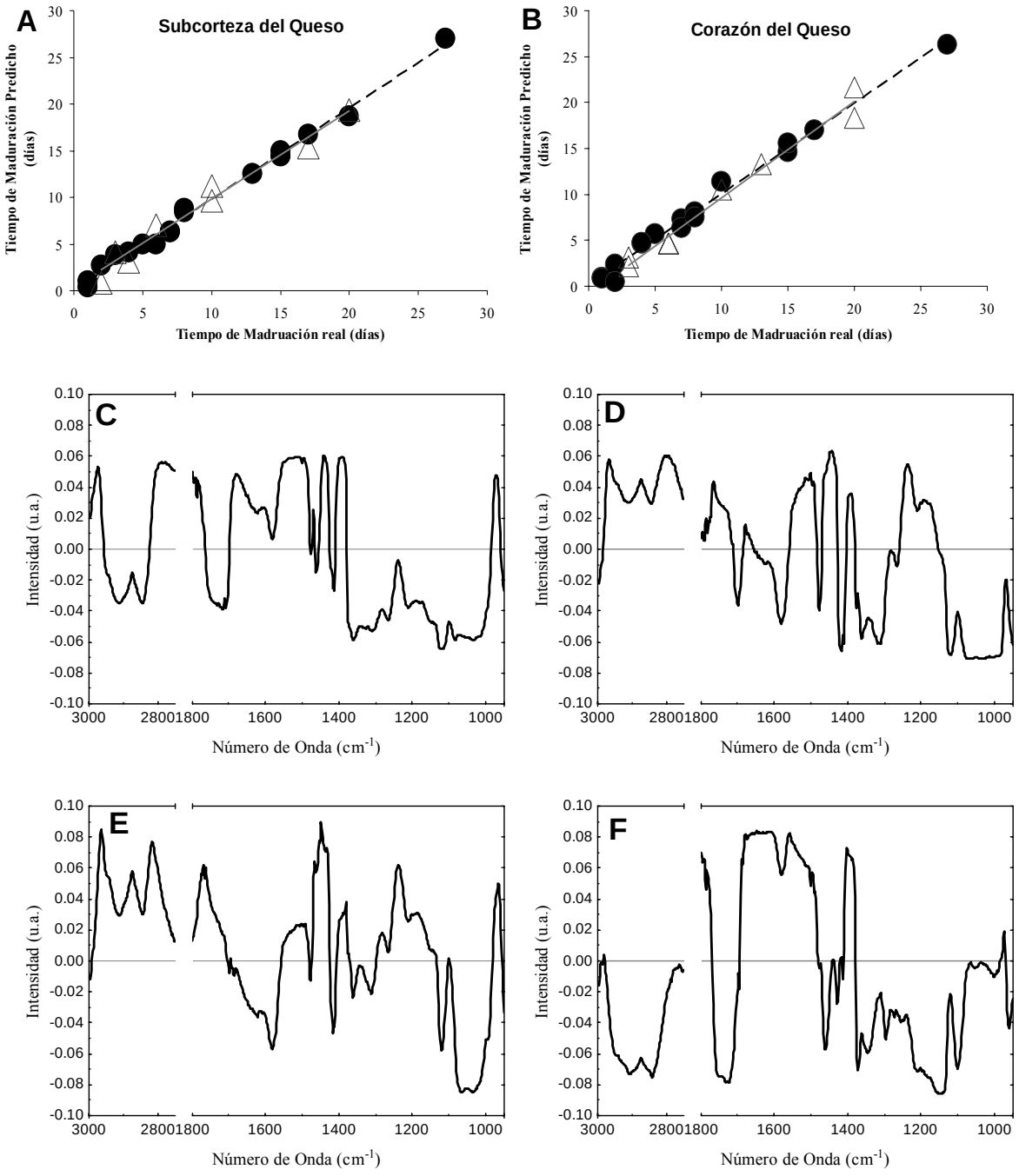


Figura 7.10. Gráficos de la Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) a partir de los espectros de queso. Gráficos de regresión lineal establecidos entre el tiempo de maduración real y el predicho: A) Subcorteza y B) Corazón; (– – – y ●) datos de calibración; (—— y △) datos de validación. Gráficos de cargas PLS: Cargas 1 C) subcorteza y D) corazón; Cargas 2 E) subcorteza y F) corazón.

Por otro lado, en el corazón del queso, la carga 1 (loading 1) del PLS (Figura 7.10D) que es la más importante ya que cuenta por el 85 % de la varianza total, la intensidad principal se observa en la región 1150-950 cm^{-1} y en la banda Amida II. La carga 2 (loading 2) del PLS (Figura 7.10F) tiene solo un efecto menor ya que cuenta solo por el 2 % de la varianza total.

7.4.2 Predicción de los parámetros fisicoquímicos

En la Tabla 7.6 se muestran, para series de calibración y validación, los valores mínimos y máximos, así como las medias y desviaciones estándar de las variables fisicoquímicas analizadas. La evaluación del desempeño de los modelos de PLS está basada en los coeficientes de determinación (R^2), el Error Estándar de Calibración (SEC), la Raíz de la Media Cuadrada del Error de la Validación Cruzada (RMSECV) y cociente de la Desviación Estándar de Predicción (RPD) para las series de validación y calibración (Tabla 7.7).

Tabla 7.6. Valores de los parámetros fisicoquímicos usados en las series de calibración y validación para la regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).

Parámetro	Calibración					Validación				
	n	Máx.	Min.	$\overline{X}$	SD	n	Máx.	Min.	$\overline{X}$	SD
pH	17	7,86	4,57	6,17	1,37	8	7,80	4,66	6,15	1,43
MS[a]	17	46,72	32,64	39,61	3,69	8	45,70	37,08	40,62	3,20
NSA [b]	17	104,13	15,82	62,53	37,27	8	99,87	16,22	60,12	39,23
NNP [b]	17	50,00	3,13	25,30	18,33	8	41,48	2,69	25,66	19,64
NH_4^+ [c]	17	16,31	0,46	6,03	5,41	8	15,00	1,00	6,28	5,20
Lactosa [d]	33	166,05	0,00	50,04	52,54	16	105,46	0,00	41,28	39,43
Ácido Láctico [d]	33	517,84	0,00	299,05	188,61	16	508,63	0,00	303,84	191,15

n: Número de muestras, Máx.: valor máximo, Min.: valor mínimo, $\overline{X}$ **:** media, SD: desviación estándar. [a] MS: Materia seca expresada como g•100 g^{-1} de Queso. [b] NSA: Nitrógeno soluble en ácido y NNP: Nitrógeno no proteico expresados como g•100 g^{-1} de NT. [c] Expresado como g•kg^{-1} MS. [d] Expresado como mmol•kg^{-1} de MS.

Tabla 7.7. Resultados de la regresión PLS usando los valores fisicoquímicos y los espectros de infrarrojo medio de queso.

Parámetro	Calibración					Validación			
	n	Com*	R^2	SEC	RPD	n	R^2	RMSECV	RPD
pH	17	7	0,94	0,39	3,51	8	0,84	0,38	3,71
MS[a]	17	11	0,99	0,53	6,95	8	0,91	1,07	2,99
NSA [b]	17	3	0,73	18,5	2,01	8	0,84	13,3	2,95
NNP [b]	17	8	0,98	3,7	4,96	8	0,92	6,0	3,27
NH_4^+ [c]	17	2	0,91	1,80	3,01	8	0,99	1,29	4,03
Lactosa [d]	33	3	0,83	20	2,63	16	0,70	23	1,71
Ácido Láctico [d]	33	4	0,90	65	2,90	16	0,79	88	2,17

n: Número de muestras; * Com: Componentes; R^2: Coeficiente de determinación; SEC: Error Estándar de Calibración; RMSECV: Raíz de la Media Cuadrada del Error de la Validación Cruzada; RPD: cociente de la Desviación Estándar de Predicción.
Expresado como: [a] g•100 g^{-1} de Queso; [b] g•100 g^{-1} of NT; [c] g•kg^{-1} de MS; [d] mmol•kg^{-1} de MS

Para la serie de calibración se obtuvieron buenas correlaciones entre los valores fisicoquímicos y los espectros de infrarrojo para el pH, MS, NNP, NH_4^+, lactosa y AL. Para estos parámetros, el coeficiente de determinación R^2 y el RPD son superiores a 0,80 y 2 respectivamente. En comparación, la predicción de NSA puede ser considerada como un poco menos buena en la serie de calibración (R^2 = 0,73, RPD = 2,01). Los resultados que conciernen al pH, MS y NNP deben ser tomados con precaución ya que el número de componentes PLS es alto, 7, 11 y 8 respectivamente. Entre más alta es la dimensionalidad del modelo, más alto es el probabilidad de sobre ajustar (Defernez y Kemsley, 1997). Sin embargo, la diferencia entre el SEC y el RMSECV obtenidos para las series de validación y calibración no son elevadas (Tabla 7.7) y permiten pensar que los modelos son razonablemente robustos. Para la predicción del pH, un SEC de 0,39 y un RMSECV de 0,38 debe ser considerado como demasiado elevado para una buena predicción.

Para la serie de validación, la predicción de la lactosa no es completamente satisfactoria. Los valores de R^2 y RMSEC son muy bajos. La predicción de la MS, NSA, NNP, AL y NH_4^+ presentan valores satisfactorios (R^2>0,81, RPD>2 y RMSEC cercano al SEC). Las correlaciones entre los valores medidos y predichos de los cuatro parámetros fisicoquímicos se muestran en la Figura 7.11 (A-E). Se observó un buen ajuste entre los valores medidos y predichos para los conjuntos de calibración y validación.

La precisión obtenida para la MS y el pH estuvieron de acuerdo con lo reportado por Karoui *et al.* (2006b) para quesos blandos comerciales. Ellos mencionan que los modelos PLS basados en los datos espectrales permiten buenas predicciones para estros parámetros a pesar de un RMSEP de 0,16 en la determinación del pH. Con el mismo tipo de accesorio ATR usado en el presente trabajo, Rodriguez-Saona *et al.* (2006) predijeron la humedad en quesos Suizos con un RMSECV de 0,5, dos veces inferior al calculado en el presente estudio. Para el índice del nitrógeno soluble en agua (WSN/NT), sin embargo, estos autores reportan una precisión menor a la obtenida en el presente trabajo para el NSA. Ellos mencionan que las mediciones de este parámetro por MIR fue útil solo para discriminar entre concentraciones altas y bajas.

Los resultados obtenidos para el índice de NNP fue similar a los reportados por Karoui *et al.* (2006a) en quesos Emmental madurados con diferentes edades y orígenes geográficos. Ellos reportan una buena calibración (R^2 = 0,83 y RPD = 2,34 contra 0,92 y 3,27 respectivamente, obtenidos en este estudio,) para el contenido de NNP.

Los coeficientes de regresión estándar de la MS, NSA, NNP, LA y NH_4^+ se muestran en la Figura 7.12 (A-E). La distribución del coeficiente de regresión para la MS muestra que las bandas espectrales 1320-1220 cm^{-1}, 1500-1400 cm^{-1}, 1730-1680 cm^{-1} y 3000-2900 cm^{-1} son las regiones más eficientes (Figura 7.12A). La interpretación es difícil para las dos primeras regiones. Las otras regiones pueden ser atribuidas a los grupos carboxilo ($-COO^-$) así como a los grupos metilo (CH_3) y metileno (CH_3).

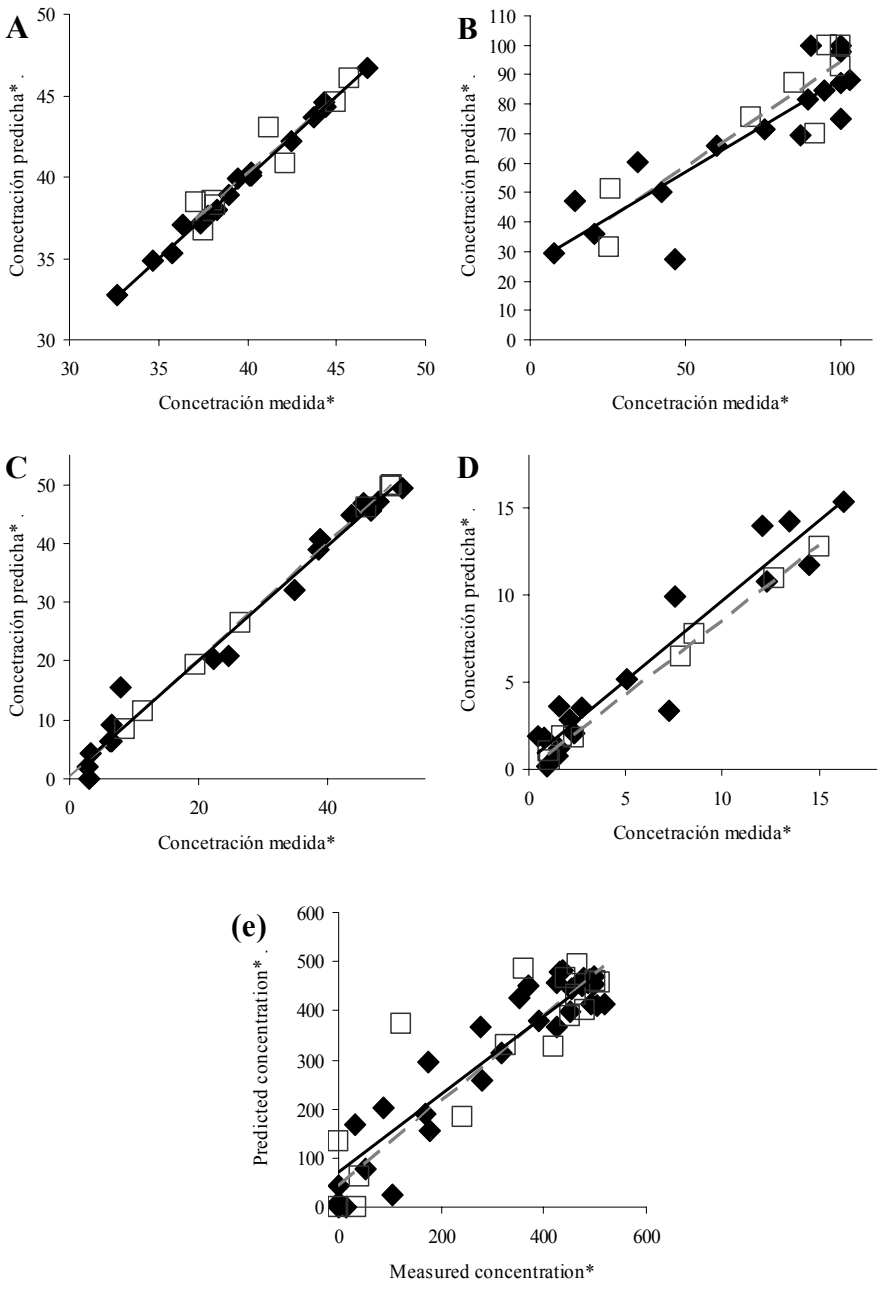


Figura 7.11. Gráficas de regresión lineal para la regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), establecidas entre los valores medidos y predichos. A) Materia seca (MS) en g•100 g-1 de Queso, B: Nitrógeno soluble en ácido (NSA) en g•100 g-1 de NT, C: Nitrógeno no proteico (NNP) en g•100 g-1 de NT, D: Amoniaco (NH4+) en mmol•kg-1 de MS y E) Ácido Láctico mmol•kg-1 de MS; (—— y ♦) datos de calibración; (– – –y □) datos de validación.

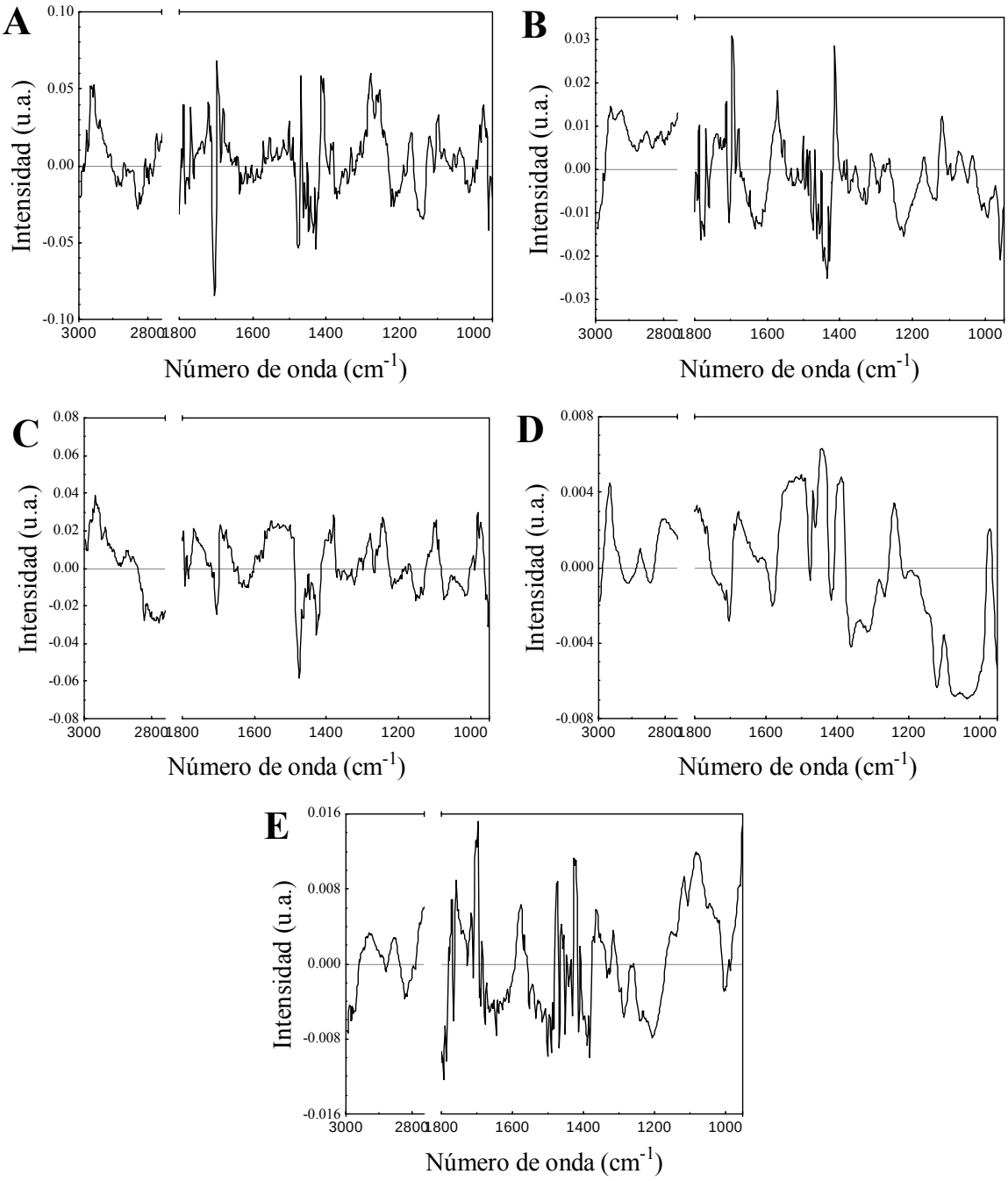


Figura 7.12. Coeficientes de la regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) a lo largo de las regiones espectrales (3000-2800 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1} números de onda). A: Materia seca (MS), B: Nitrógeno soluble en ácido (NSA), C: Nitrógeno no proteico (NNP), D: Amoniaco (NH_4^+), E: Ácido Láctico (LA).

La región 1500-1400 cm^{-1} es también una zona importante para la determinación de NSA, NNP y NH_4^+. Estudios de la determinación de parámetros químicos en quesos Emmental por espectroscopia de infrarrojo han demostrado la importancia de las mismas regiones espectrales (Karoui *et al.*, 2006c). Ninguna asignación se ha hecho para esta zona. La región Amida II (cerca a 1550 cm^{-1}) es una característica de la distribución de los coeficientes de regresión del NSA. Sin embargo, es sorprendente que ni esta región ni la región Amida I (cerca de 1650 cm^{-1}) tengan una importancia principal en el modelo de predicción del NNP.

7.5 Conclusiones parciales

Como muestran los resultados anteriores, el ANOVA y el ACP de los datos espectrales del queso completo pusieron en evidencia las bandas espectrales que presentaron cambios significativos a lo largo de la maduración. Estos cambios pudieron ser asociados a los cambios bioquímicos en los compuestos más importantes que han sido descritos para este tipo de quesos. Los ANOVAS y los ACP de los espectros de las fracciones obtenidas por precipitación selectiva fueron menos claros en la descripción de los cambios a lo largo de la maduración y no aportaron mayor información a la obtenida para los espectros del queso completo.

El hecho de que el ACP de los datos fisicoquímicos presentó una evolución a lo largo de la maduración similar a la de los espectros de queso, permite pensar que la evolución espectral refleja los cambios bioquímicos del queso durante la maduración.

Los modelos obtenidos por regresión PLS mostraron que el FTIR es un buen método para la predicción de la edad del queso y de los valores fisicoquímicos a lo largo de la maduración a partir de los espectros de los quesos completos. En función de la edad del queso, los modelos obtenidos para las dos secciones permitieron predecir ésta con un error cercano a 1 día.

Mientras que, los modelos obtenidos entre los datos fisicoquímicos y espectrales mostraron que éste es un buen método para predecir los valores de la materia seca (MS), del ácido láctico, del nitrógeno soluble en ácido (NSA), del nitrógeno no proteico (NNP) y del amoniaco (NH_4^+) a lo largo de la maduración ya que en todos los casos el RPD fue superior a 2. Sin embargo, los modelos obtenidos para el contenido de lactosa y el pH fueron menos precisos .

Estos resultados muestran que la espectroscopia de infrarrojo puede ser un método interesante para discriminar quesos en función del estado de maduración de una forma rápida y confiable por medio del impacto de los cambios bioquímicos sobre bandas espectrales específicas.

Capítulo 8. Resultados Emmental

Debido a que el trabajo realizado en los quesos Camembert (Capítulo 7) mostró que las fracciones obtenidas a partir del queso no aportaron mayor información a la proporcionada por los espectros directos del queso, para esta sección del estudio solo se evaluaron los espectros obtenidos por lectura directa de las muestras de queso. A continuación se presentan los resultados obtenidos de los diferentes análisis estadísticos realizados al grupo de espectros de infrarrojo.

8.1 Evolución espectral

La evolución a lo largo de la maduración de los espectros de infrarrojo normalizados (3000-2800 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) de queso Emmental presentó ligeras diferencias según las asociaciones de cepas utilizadas. En la Figura 8.1 (A y B)se muestran las evoluciones a lo largo de la maduración de dos asociaciones de cepas. En la Tabla 8.1 se muestra un resumen de los resultados del ANOVA y el análisis LSD de Fisher que permitieron identificar las bandas que presentaron cambios significativos ($p \leq 0,05$) de absorbancia a lo largo de la maduración de los quesos. Los resultados completos se muestran en la Tabla D.1 (Anexo D).

En la región 1490-950 cm^{-1} (Figura 8.1) asociada con los carbohidratos y los ácidos orgánicos, se observa que la evolución de la banda a ~1099 cm^{-1} (alcohol secundario ν C-O y δ O-H) asociada con la lactosa (Lanher, 1991; Cadet *et al.*, 2000; Coates, 2000; Grappin *et al.*, 2000), con aminas primarias (ν C-N) (Coates, 2000) y con iones fosfato (PO_4) (Casal y Mantsch, 1984; Coates, 2000), no mostró cambios significativos hasta el día 34 (escrito d34), de d34 hasta d58 decreció significativamente, incrementándose posteriormente hasta la apertura de los moldes (AM) al final de la maduración (Tabla 8.1).

Durante el proceso de elaboración de los quesos Emmental, la hidrólisis de la lactosa residual y de los monosacáridos resultantes, se realiza en las primeras 24 h de fabricación, antes del salado, por lo que su concentración es prácticamente nula al inicio de la maduración (Choisy *et al.*, 1997). Debido a lo anterior, los cambios en esta banda no pueden ser atribuidos a la glucólisis. La liberación del fósforo coloidal en forma de fosfopéptidos, ion fosfato o como $Ca_3(PO_4)_2$ ha sido reportada anteriormente (Rychlik *et al.*, 1997; Gagnaire *et al.*, 2001a; Gagnaire

et al., 2001b). Rychlik *et al.* (1997) atribuyen el incremento en la concentración de fosfato libre en quesos Emmental a la proteólisis, mediante la liberación de aminoácidos y péptidos solubles que transportan el ion.

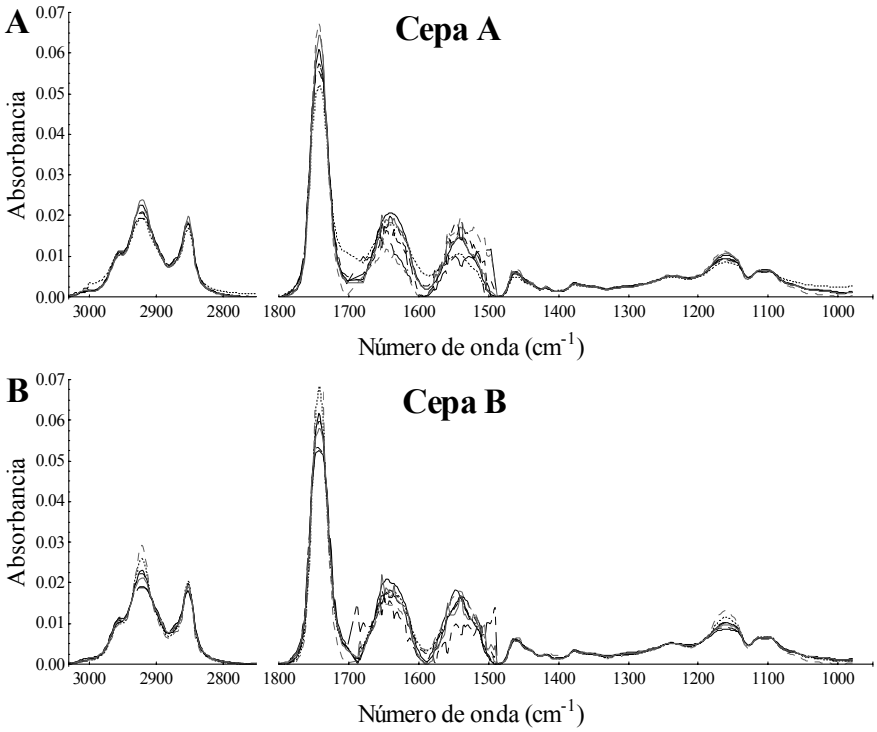


Figura 8.1 Evolución de espectros normalizados de infrarrojo medio (3000-950 cm^{-1}) de queso Emmental con dos asociaciones bacterianas (A y B). (—— d20, – – – d27, — — d34, • • • d51, – • • – d58, —— d65, — — FIN).

La absorbancia del pico ~1161 cm^{-1} relacionado con la suma de lactosa (alcohol terciario ν C–OH) y monosacáridos (oxigeno endocíclico ν C-O) (Lanher, 1991; Cadet *et al.*, 2000) así como a los enlaces éster de las grasas (ν C-O) (Casal y Mantsch, 1984; Chen *et al.*, 1998), permaneció estable hasta la entrada en la cava caliente (d34), decreciendo entonces hasta d65 para incrementarse hacia el final de la maduración. En cambio, el pico a ~1379 cm^{-1} relacionado con las señales de glucosa y galactosa (δ_s CH_3) (Lanher, 1991; Cadet *et al.*, 2000) así como a los

iones carboxilato (Coates, 2000), presentó un incremento significativo a partir de d27 hasta d58, decreciendo posteriormente (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de queso Emmental y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$)

Banda	P value	d20	d27	d34	d51	d58	d65	AM
1099 cm^{-1} (Lactosa)	**0,0000***	$0,006587^{a}$	$0,006632^{a}$	$0,006622^{a}$	$0,006427^{b}$	$0,006315^{b}$	$0,006404^{b}$	$0,006680^{a}$
1115 cm^{-1} (Lactato)	**0,0000***	$0,006366^{a}$	$0,006504^{c}$	$0,00650^{bc}$	$0,006381^{a}$	$0,006340^{a}$	$0,00641^{ab}$	$0,006612^{d}$
1161 cm^{-1} (Lactosa + ms)	**0,0000***	$0,00999^{bc}$	$0,00976^{bc}$	$0,010179^{b}$	$0,00929^{ac}$	$0,008855^{a}$	$0,009027^{a}$	$0,012926^{d}$
1379 cm^{-1} (ms)	**0,0001***	$0,003185^{c}$	$0,003391^{a}$	$0,00333^{ac}$	$0,00346^{ab}$	$0,003617^{b}$	$0,003573^{b}$	$0,003373^{a}$
1541 cm^{-1} (Amida II)	**0,0000***	$0,01624^{ab}$	$0,016849^{b}$	$0,01591^{ab}$	$0,013084^{c}$	$0,01409^{ac}$	$0,01629^{ab}$	$0,019678^{d}$
1647 cm^{-1} (Amida I)	**0,0000***	$0,019608^{c}$	$0,017351^{b}$	$0,017849^{b}$	$0,014852^{a}$	$0,015160^{a}$	$0,016646^{b}$	$0,013881^{a}$
1647 cm^{-1}/1541 cm^{-1} (Amida I/ Amida II)	**0,0186***	$1,213525^{a}$	$1,03217^{ab}$	$1,144025^{a}$	$1,357387^{a}$	$1,153822^{a}$	$1,03417^{ab}$	$0,708156^{b}$
1743 cm^{-1} (C=O)	**0,0000***	$0,06016^{bc}$	$0,05859^{bc}$	$0,060978^{c}$	$0,05646^{ab}$	$0,052419^{a}$	$0,053959^{a}$	$0,079408^{d}$
2852 cm^{-1} (CH_2)	**0,0032***	$0,018502^{a}$	$0,019306^{a}$	$0,019271^{a}$	$0,018541^{a}$	$0,018472^{a}$	$0,018988^{a}$	$0,020224^{b}$
2872 cm^{-1} (CH_3)	**0,0000***	$0,008648^{b}$	$0,00911^{cd}$	$0,00889^{bc}$	$0,00942^{ad}$	$0,009656^{a}$	$0,009498^{a}$	$0,008046^{e}$
2922 cm^{-1} (CH_2)	**0,0000***	$0,022403^{b}$	$0,02157^{bc}$	$0,022698^{b}$	$0,02022^{ac}$	$0,018935^{a}$	$0,019801^{a}$	$0,028161^{d}$
2956 cm^{-1} (CH_3)	**0,0000***	$0,010341^{a}$	$0,01063^{bc}$	$0,01049^{ab}$	$0,01080^{cd}$	$0,011133^{e}$	$0,01090^{de}$	$0,009842^{f}$
2956 cm^{-1}/2922 cm^{-1} (CH_3/ CH_2)	**0,0000***	$0,463504^{a}$	$0,493563^{a}$	$0,467744^{a}$	$0,539444^{b}$	$0,588198^{c}$	$0,55501^{bc}$	$0,352521^{d}$

ms: monosacáridos. AI/AII: Coeficiente de las señales Amida.
* Significativo a $p \leq 0.05$.
$^{a-f}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

La evolución de éstas bandas no puede ser atribuida a los cambios de concentración de los carbohidratos, ya que como se mencionó anteriormente, al inicio de la maduración éstos han sido consumidos completamente (Choisy *et al.*, 1997). Sin embargo, estas evoluciones son congruentes con los cambios debidos a la lipólisis y con la generación de ácidos orgánicos reportadas en queso Emmental (McSweeney y Sousa, 2000; McSweeney, 2004). Durante la maduración en la cava caliente se reproducen las bacterias propiónicas que metabolizan el L-

lactato formando propionato, acetato y CO_2 (McSweeney y Sousa, 2000; McSweeney, 2004). Adicionalmente, estas bacterias poseen una lipasa que es la que contribuye a la lipólisis en este tipo de quesos (McSweeney y Sousa, 2000; Collins *et al.*, 2003).

La banda ~1115 cm^{-1} asociada a la suma del lactato y monosacáridos (ν C–OH) (Petibois *et al.*, 2000) fue significativa (Tabla 8.1). La señal presentó una evolución en dos fases, en la primera la señal se incrementó significativamente durante la maduración en la cava temperada, presentando un máximo a d27. Posteriormente, la señal decreció durante la maduración en la cava caliente, hasta un mínimo en d51. Esta evolución es congruente con la evolución del lactato mostrada por Choisy *et al.* (1997) para quesos Emmental. Estos autores muestran que, en este tipo de quesos, después de alcanzar el máximo, la concentración de lactato desciende gradualmente durante todo el periodo de maduración, siendo este decremento más fuerte durante la maduración en la cava caliente (20-24 ºC).

En la región 1700-1490 cm^{-1} se observan los picos Amida I ~1647 cm^{-1} (ν C=O, ν C-N) y el Amida II a ~1541 cm^{-1} (δ N-H y ν C-N) (Figura 8.1) que se asocian con la respuesta proteica (Dufour y Robert, 2000; Grappin *et al.*, 2000; Robert y Dufour, 2000). El cambio en la absorbancia a lo largo de la maduración fue significativo para ambas bandas como lo muestra el ANOVA (Tabla 8.1). Estas bandas presentaron comportamientos diferentes. La banda Amida I presentó un decremento significativo de d20 a d27 (cava temperada), del d27 hasta el final de la maduración presentó un decremento continuo (cava caliente a apertura de moldes). La banda Amida II presentó una evolución en dos fases, en la primera fase la señal disminuyó significativamente hasta d51 (cava caliente), incrementándose significativamente entre d51 y el final de la maduración (Tabla 8.1). Por su parte, la relación de las Absorbancias entre las bandas Amida (A.amida I/A.amida II) también presenta cambios significativos a lo largo de la maduración (Tabla 8.1). Ésta permanece estable hasta d65, decreciendo entonces significativamente entre d65 y el final de la maduración.

Este evolución espectral es consistente con el fenómeno de proteólisis reportado para quesos tipo Suizo en general y para Emmental en particular (Rohm *et al.*, 1996; McSweeney y Sousa, 2000; Gagnaire *et al.*, 2001a). Una proteólisis lenta se presenta al inicio de la maduración debido a la inactivación de la plasmina durante el cocimiento a alta temperatura de éstos quesos

(Gagnaire *et al.*, 2001b). En la cava caliente se presenta el mayor incremento en la proteólisis debido al crecimiento de las bacterias propiónicas (Gagnaire *et al.*, 2001b). Como ya se mencionó en la sección 7.1, los cambios en estas bandas a lo largo de la maduración han sido asociados con cambios en la estructura secundaria de la caseína, a la agregación de proteínas y a la interacción proteína agua (Mazerolles *et al.*, 2001; Vannini *et al.*, 2001; Kulmyrzaev *et al.*, 2005).

La región 3000-2750 cm^{-1} presentó bandas características de las cadenas hidrocarbonadas (Dufour y Robert, 2000; Riaublanc *et al.*, 2000). Se observan dos bandas importantes correspondientes a los grupos metileno ~2920 cm^{-1} (ν_{as} CH_2) y ~2851 cm^{-1} (ν_s CH_2), así como dos bandas menores correspondientes a los grupos metilos a ~2956 cm^{-1} (ν_{as} CH_3) y ~2872 cm^{-1} (ν_s CH_3). Los cambios de absorbancia fueron significativos para los dos grupos funcionales (Tabla 8.1). En ambos casos la señales permanecieron estables hasta d65, a partir de d65 y hasta el final de la maduración, la señal de los metilos decreció significativamente mientras que la de los metilenos se incrementó. Por su parte, la evolución del coeficiente entre $A\nu_{as}$ CH_3/$A\nu_{as}$ CH_2 presentó cambios significativos a partir de d51 hasta el final de la maduración.

Cambios en las bandas metilo y metileno han sido descritas con anterioridad (Dufour *et al.*, 2000; Kulmyrzaev *et al.*, 2005; Lanciotti *et al.*, 2005). Dufour *et al.* (2000) reportan cambios en estos picos a lo largo de la maduración de quesos semiduros, así como un incremento en la relación $A\nu_{as}$ CH_3/$A\nu_{as}$ CH_2 madurados a 13 ºC, atribuyéndolo a un cambio en el estado físico de los triglicéridos del queso.

El pico a ~1743cm^{-1} (ν –C=O) asociado con los ésteres y ácidos orgánicos permaneció estable hasta d65, incrementándose entonces significativamente hasta el final de la maduración (Tabla 8.1).

El decremento en la señal de ésta banda ha sido asociado al consumo del lactato (Guerzoni *et al.*, 1999; Lanciotti *et al.*, 2005), mientras que su incremento ha sido asociado al incremento en los grupos carbonilo provenientes de la lipólisis y la proteólisis (Chen *et al.*, 1998). En los quesos tipo Suizo como el Emmental, la taza más importante de consumo de lactato y de lipólisis han sido reportada durante el periodo de maduración en la cava caliente (Choisy *et al.*, 1997; McSweeney y Sousa, 2000; Chamba y Perreard, 2002; Collins *et al.*, 2003) debido al crecimiento de las bacterias propiónicas. El comportamiento observado en este estudio podría deberse a que el

decremento de la señal por consumo de lactato y el incremento causado por la proteólisis y la lipólisis fueran igualmente significativos hasta d65 y que posteriormente la proteólisis y la lipólisis fueran más importantes que el consumo de lactato.

8.2 Análisis de componentes principales de los espectros de infrarrojo

La aplicación del ACP al grupo completo de espectros normalizados de queso Emmental permitió extraer información importante que describe los cambios espectrales a lo largo de la maduración y asociar éstos con las reacciones bioquímicas correspondientes.

El mapa factorial del ACP de los espectros de queso Emmental mostrado en la Figura 8.2A está definido por el PC1 y el PC2 que describieron respectivamente el 44,9 % y el 26,0 % del total de la varianza. Estos componentes describen una maduración en dos etapas. La primera, descrita por una combinación de PC1 y PC2, permite describir una evolución desde d20 (0CT) hasta d58 (24CC), observándose la separación de dos grupos de muestras, el primero de ellos (G1) separó las muestras desde d20 (0CT) hasta los primeros días de maduración en la cava caliente a d51 (17CC), mientras que el G2 correspondió a las muestras d58 (24CC) (Figura 8.2A). La segunda etapa de la maduración, descrita principalmente por el PC1, hace posible describir la evolución desde d58 (24CC) hasta AM, separando claramente las muestras de 24CC (G2), 30CC (G3) y AM (G4) (Figura 8.2A).

Los vectores propios correspondientes al PC1 y PC2 se muestran en la Figura 8.2B. El vector propio 1 mostró dos zonas importantes, la región de 1800-1710 cm^{-1} y la región amida (1700-1490 cm^{-1}) asignada a las proteínas. En la primer región se observa un pico importante a ~1743 cm^{-1} (–C=O) y un pico menor a ~1749 cm^{-1} (C=O) (Karoui *et al.*, 2003). En la segunda región, sólo se presenta el pico Amida II (1552 cm^{-1}). A 2921 cm^{-1} apareció el pico correspondiente a los metilenos (CH_2) y a 1169 cm^{-1} asociado con los enlaces éster de las grasas (ν C-O). El vector propio 2 presentó también los picos a 1743 cm^{-1} y 1169 cm^{-1} pero con una menor intensidad y en oposición al vector 1. En la región amida (1700-1490 cm^{-1}), sólo presentó el pico Amida I (1631 cm^{-1}), siendo éste la señal más importante de este vector. Estas observaciones sugieren que ambos vectores describen los fenómenos relacionados con el

consumo de lactato, con la proteólisis y la lipólisis. La mayor intensidad presentada por las señales en el vector propio 2 permite pensar que este vector muestra el incremento en las tazas de evolución debidas al crecimiento de las bacterias propiónicas en la cava caliente.

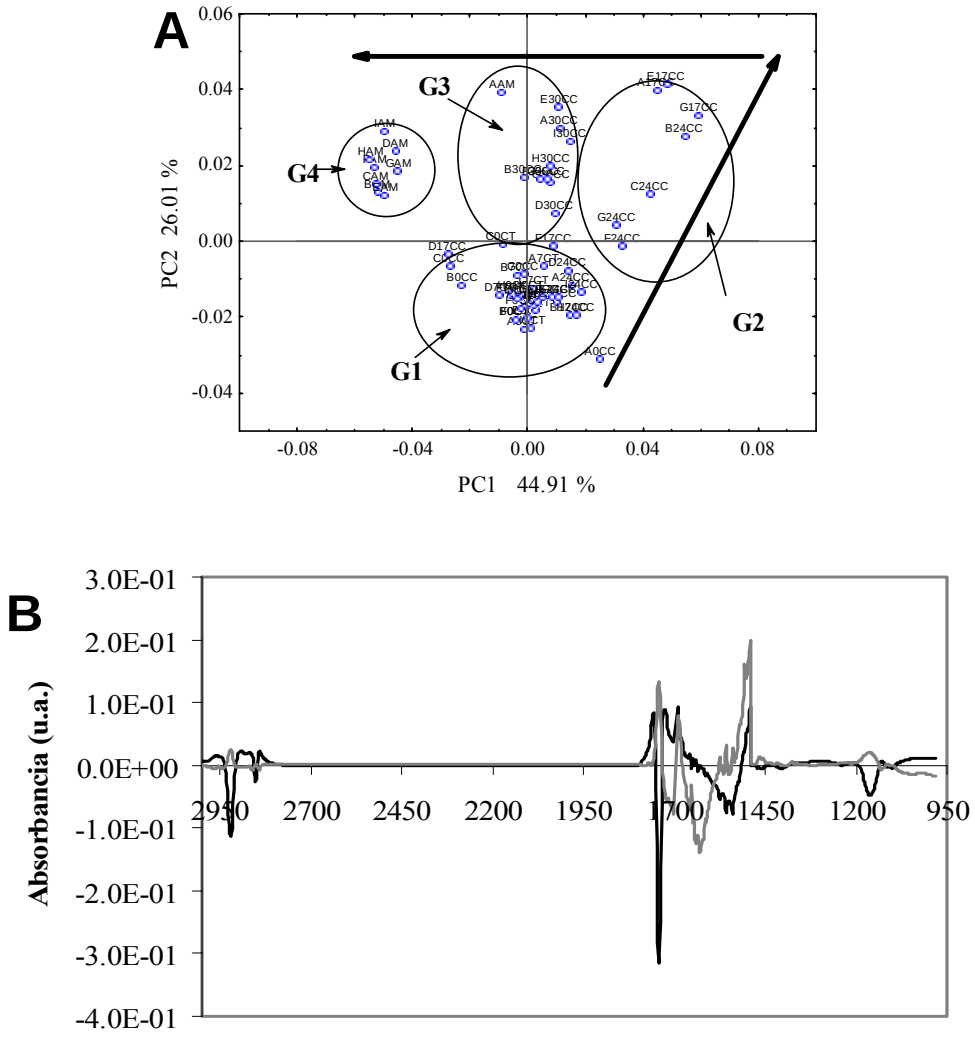


Figura 8.2. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los espectros de queso Emmental. Gráficas de los dos primeros componentes, PC1 y PC2: A) Mapa factorial y B) Vectores propios (——— PC1 y — — — PC2).

La evolución espectral en la zona Amida (1700-1500 cm^{-1}) ha sido estudiada para quesos semiduros madurados a 13 ºC (Mazerolles *et al.*, 2001; Mazerolles *et al.*, 2002) y quesos blandos (Kulmyrzaev *et al.*, 2005). Estos autores observaron bandas similares en los vectores propios para bandas similares que permitieron obtener buenas separaciones de los quesos en función de su edad. Vannini *et al.* (2001) mencionan diferentes comportamientos en las bandas Amida en función de la edad del queso y de la cepa utilizada.

La banda a ~1743 cm^{-1} asociada con el lactato y los ácidos grasos libres, fue observada para quesos experimentales (Guerzoni *et al.*, 1999; Lanciotti *et al.*, 2005). En el presente trabajo, esta banda está presente en ambos vectores propios, pero es más importante en el PC1 que está correlacionado con la evolución espectral desde 24CC (d58) hasta la apertura de moldes (AM) al final de la maduración, periodo durante el cual se presenta una mayor actividad lipolítica (McSweeney y Sousa, 2000; Chamba y Perreard, 2002).

8.3 Análisis discriminante de los espectros de infrarrojo

El análisis paso a paso ascendente condujo a la selección de 24 números de onda (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05) que se muestran el la Figura 8.3 y en la Tabla D.2 (Anexo D). En la zona 1490-950 cm^{-1} asociada con los carbohidratos fueron seleccionadas las bandas a 1122 cm^{-1} del pico asociado con lactosa, aminas primarias e ion fosfato; a 1138 cm^{-1} del pico correspondiente a la lactosa, monosacáridos y grasas; a 1335 cm^{-1} y 1350 cm^{-1} relacionadas con la respuesta de aminas primarias; a 1460 cm^{-1}, 1462 cm^{-1}, 1475 cm^{-1} y 1483 cm^{-1} relacionados con la respuesta de grupos metilos y metilenos. En la región de 1700-1490 cm^{-1} relacionada con la respuesta proteica se seleccionaron las bandas a 1632 cm^{-1} y 1678 cm^{-1} en el pico Amida I y a 1512 cm^{-1} en el pico de la Amida II.

Bandas correspondientes a estos grupos funcionales han sido reportadas previamente para la discriminación de 3 tipos de quesos Emmental (Picque *et al.*, 2002). Estos autores mencionan que bandas seleccionadas en la región 1800-900 cm^{-1} permitieron obtener una discriminación promedio del 78 % en función del tipo de queso utilizando la medición por ATR y de un 89 % por medio de transmisión.

Por su parte, la zona entre 1800-1700 cm^{-1} asociada a la respuesta de los grupos carbonilo se seleccionaron las bandas a 1724 cm^{-1}, 1734 cm^{-1}, 1763 cm^{-1}, 1792 cm^{-1}, 1794 cm^{-1}. Mientras que la región de las cadenas hidrocarbonadas entre 3000-2750 cm^{-1} presentó las bandas a 2835 cm^{-1}, 2839 cm^{-1} y 2858 cm^{-1} (ν_s) así como a 2887 cm^{-1} y 2895 cm^{-1} (ν_{as}) correspondientes a la respuesta de los grupos metileno; a 2875 cm^{-1} (ν_s) y a 2981 cm^{-1} y 2997 cm^{-1}(ν_{as}) de los grupos metilo.

Cambios a lo largo de la maduración en las bandas espectrales correspondientes a los grupos metilo y metileno en la región 3000-2800 cm^{-1} han sido reportados para quesos semiduros (Dufour *et al.*, 2000). Estos autores obtuvieron una discriminación parcial entre quesos con 1, 21, 51 y 81 días de maduración, utilizando ACP y Análisis de Correlación Canónica (ACC).

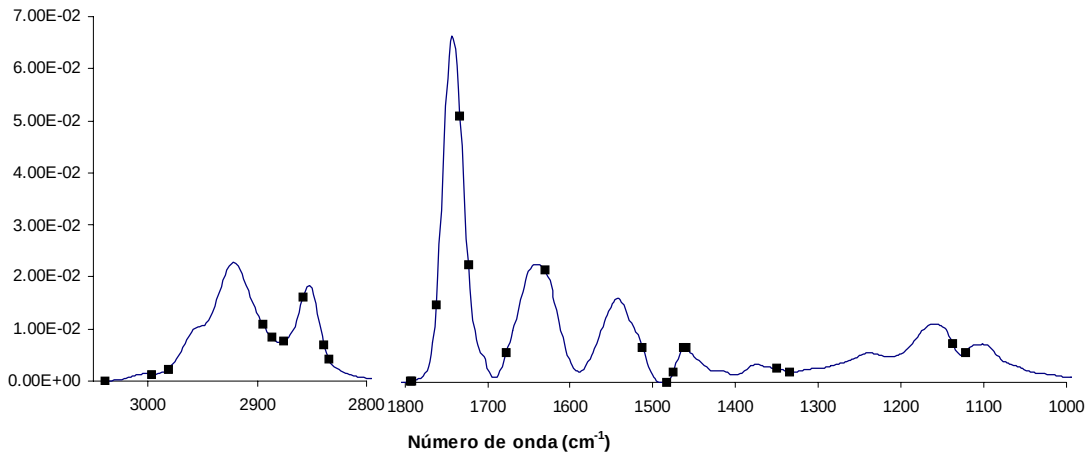


Figura 8.3 Bandas seleccionadas por el Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de infrarrojo normalizados (3000-950 cm^{-1}) de queso Emmental. Selección por el proceso de inclusión paso a paso (P inclusión 0,05, P exclusión 0,05). (—— Espectro completo, ■ bandas seleccionadas).

Las distancias Mahalanobis calculadas para los modelos de calibración y validación cruzada (Tablas D.3 y D.7 del Anexo D) fueron significativas ($p< 0,05$) para los 7 estados de

madurez evaluados (Tabla D.4 del Anexo D). Las gráficas de Cooman construidas graficando la distancia Mahalanobis al cuadrado a d20 y a AM, muestran los agrupamientos según el estado de maduración para los modelos de calibración y validación cruzada (Figuras 8.4 y 8.5).

La gráfica correspondiente al modelo de calibración (Figura 8.4A) muestra a los espectros d20 que corresponden a los quesos más tiernos clasificados en la esquina superior izquierda de la gráfica, mientras que los espectros a AM correspondientes a los quesos más maduros fueron clasificados en la esquina inferior derecha. Los grupos correspondientes a los otros estados de madurez presentaron distancias relativamente pequeñas entre sí, pero sin sobreponerse. Mientras que, para el modelo de validación cruzada, la gráfica de Cooman (Figura 8.4B) muestra una clasificación incorrecta para algunas de las muestras a d20 y d51. Al igual que con el grupo de calibración, los grupos correspondientes a los otros estados de madurez fueron presentaron distancias relativamente pequeñas, sin traslaparse.

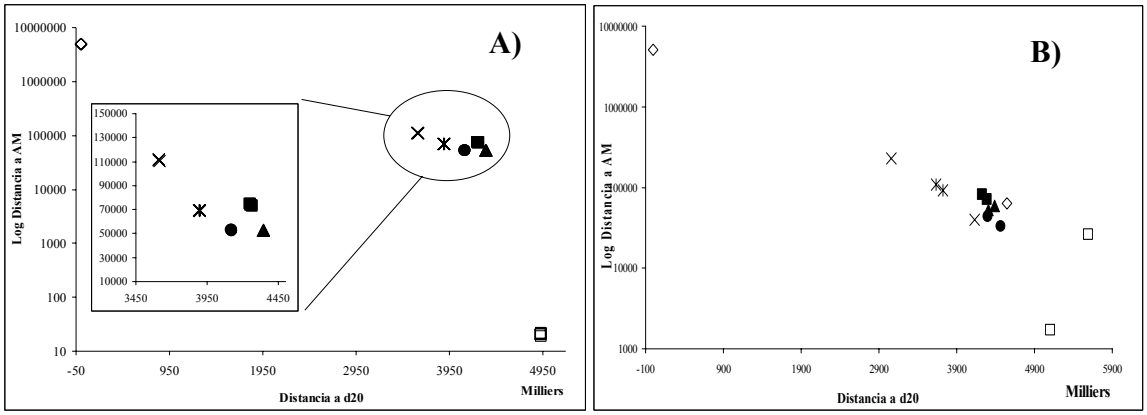


Figura 8.4. Gráfica de Cooman para la clasificación de los espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) de queso Emmental. A) Modelo de calibración y B) Modelo de validación. (◊ d20, ■ d27, ▲ d34, × d51, ✳ d58, ♦ d65, □ AM).

Los modelos obtenido tanto para el grupo de calibración como para el de validación confirman los resultados observados gráficamente. El resumen de los resultados de clasificación se muestran en la Tabla 8.2. El modelo de calibración permitió clasificar correctamente el 100 % de los espectros en función de la edad del queso (Tabla 8.2 y Tabla D.5 del Anexo D). Por otro

lado, para el grupo de validación cruzada, el modelo presentó un desempeño menor ya que permitió clasificar correctamente solo el 85,7 % de los espectros (Tabla 8.2 y Tabla D.7 del Anexo D). Este porcentaje se vio afectado por la clasificación incorrecta del 50 % de las muestras de d20 como d34 y de d51 como d58 (Tabla 8.2).

La gráfica de Cooman de la Figura 8.5 muestra la clasificación en función de las distancias Mahalanobis al cuadrado a d20 y AM de los espectros del grupo de predicción. Solo los grupos d27 y AM presentaron grupos claramente definidos. Los otros grupos presentan una clasificación incorrecta para al menos una de sus muestras.

Tabla 8.2. Análisis Discriminante General (ADG) de los espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) del queso Emmental. Tabla de clasificación en función de la edad para los modelos de calibración y validación cruzada.

Edad real	Edad predicha*							% de clasificación correcta
	d20 p= 0,1471	d27 p= 0,1471	d34 p= 0,1471	d51 p= 0,1471	d58 p= 0,1471	d65 p= 0,1471	AM p= 0,1471	
Calibración[a]								
d20	**5**	0	0	0	0	0	0	100
d27	0	**5**	0	0	0	0	0	100
d34	0	0	**5**	0	0	0	0	100
d51	0	0	0	**4**	0	0	0	100
d58	0	0	0	0	**5**	0	0	100
d65	0	0	0	0	0	**5**	0	100
AM	0	0	0	0	0	0	**5**	100
Validación Cruzada[b]								
d20	**1**	0	1	0	0	0	0	50
d27	0	**2**	0	0	0	0	0	100
d34	0	0	**2**	0	0	0	0	100
d51	0	0	0	**1**	1	0	0	50
d58	0	0	0	0	**2**	0	0	100
d65	0	0	0	0	0	**2**	0	100
AM	0	0	0	0	0	0	**2**	100

* Edad predicha: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 100 % de las muestras. [b] Clasificación correcta del 85,7 % de las muestras.

La clasificación de las muestras en base a la probabilidad de pertenecer a un determinado grupo (Tabla D.9 del Anexo C) se muestran en la Tabla 8.3. El grupo de predicción presentó un 57,1 % de clasificación correcta. Solo las muestras a d27 y AM presentaron un 100% de clasificación correcta. Los errores en la clasificación de las muestras podría deberse a un efecto de la combinación de cepas utilizadas en la manufactura del queso ya que éstas tienen una gran influencia en los patrones de proteólisis, lipólisis y glicólisis a lo largo de la maduración.

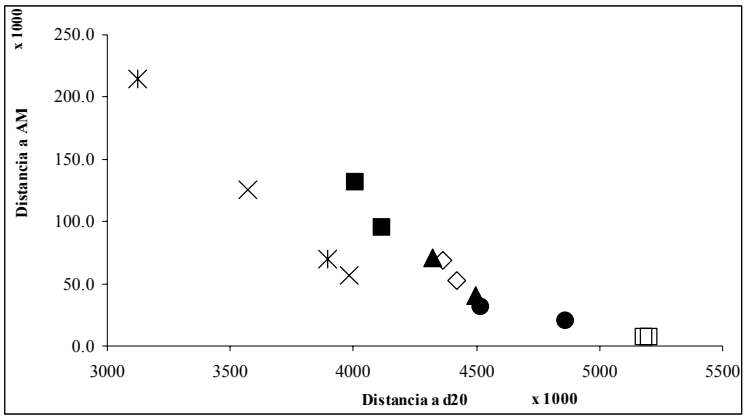


Figura 8.5. Gráfica de Cooman para la clasificación de los espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) de las muestras de predicción de queso Emmental. (◊ d20, ■ d27, ▲ d34, × d51, ✳ d58, ♦ d65, □ AM).

Tabla 8.3. Análisis Discriminante General (ADG) los espectros de infrarrojo (3030-2750 cm^{-1} y 1800-950 cm^{-1}) del queso Emmental. Probabilidad de clasificación de las muestras de predicción.

Edad real	Edad predicha							% de clasificación correcta
	d20 p= 0,1471	d27 p= 0,1471	d34 p= 0,1471	d51 p= 0,1471	d58 p= 0,1471	d65 p= 0,1471	AM p= 0,1471	
	Predicción[a]							
d20	0	1	1	0	0	0	0	0
d27	0	**2**	0	0	0	0	0	100
d34	0	1	**1**	0	0	0	0	50
d51	0	0	0	**1**	1	0	0	50
d58	0	0	0	1	**1**	0	0	50
d65	0	0	0	0	0	**1**	1	50
AM	0	0	0	0	0	0	**2**	100

* Edad predicha: probabilidad p. [a] Clasificación correcta del 57,1 % de las muestras.

En función de la clasificación de los espectros de predicción (Tabla 8.3) se distinguen 3 conjuntos globales, el primero de d20 hasta d34 formado por los quesos más jóvenes desde el inicio de la maduración hasta la entrada en la cava caliente; el segundo de d51 hasta d58 formado por quesos con la mitad de la maduración; y el tercero desde d65 hasta el final de la maduración (AM) formado por los quesos más maduros. Ninguna de las muestras pertenecientes a estos conjuntos fue clasificada fuera de ellos (Tabla 8.3).

Pocos son los reportes encontrados en la literatura sobre la discriminación de quesos en función de la maduración por medio de la espectroscopia de infrarrojo. Esta metodología ha sido usada para discriminar quesos tipo Suizo en función del tipo de queso (Picque *et al.*, 2002) o de la región de producción (Pillonel *et al.*, 2003b; Karoui *et al.*, 2005a; Karoui *et al.*, 2005b). Karoui *et al.* (2005b) obtuvieron diferentes porcentajes de clasificación correcta en función de la región de producción de quesos Emmental, según la región de infrarrojo utilizada para el ADG. El mejor modelo de clasificación fue obtenido con los espectros de la zona 1500-900 cm^{-1}.

8.4 Conclusiones parciales

Los resultados anteriores muestran que el ANOVA y el ACP de los espectros del queso Emmental permitieron identificar las bandas espectrales que presentaron cambios significativos a lo largo de la maduración. El ACP permitió describir una evolución de la maduración en dos etapas, de d20 a d58 y de d58 hasta la apertura de moldes. Estos cambios pudieron ser asociados a los cambios a lo largo de la maduración de los compuestos más importantes que han sido descritos para este tipo de quesos.

Por otro lado, el ADG de los perfiles espectrales permitió obtener buenos modelos para la calibración y validación cruzada. La predicción de la edad del queso con éstos modelos permitió clasificar las muestras en tres grupos correspondientes a quesos jóvenes, intermedios y maduros.

Los resultados obtenidos muestran que el FTIR es un buen método para separar las muestras de queso Emmental entre quesos jóvenes, a la mitad de la maduración y quesos maduros, independientemente de la combinación de cepas utilizadas.

Conclusión

Conclusión

Los Análisis Discriminantes Generales (ADG) de los datos espectrales de infrarrojo medio (MIR) dieron buenos resultados en la discriminación de las muestras de leche y productos similares bajo los dos criterios de clasificación utilizados (95,15 % según la denominación del producto en la etiqueta y 95,25 % según la clasificación por la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003). Los ADG de los perfiles espectrales por infrarrojo cercano (NIR) y perfiles de ácidos grasos (FAMES) presentaron resultados similares en la discriminación del mismo grupo de muestras (75,24 % y 77,8 % en función de la etiqueta, respectivamente; 80 % y 88,9 % en función de la norma, respectivamente). En ambos casos, los resultados obtenidos fueron inferiores a los del MIR. Las tres técnicas analíticas presentaron un mejor desempeño en la discriminación en función de los criterios de la NOM-155-SCFI-2003 que bajo la denominación en la etiqueta.

El ADG de los datos espectrales de infrarrojo medio (MIR) de leches adulteradas con grasas exógenas presentó un bajo desempeño (53,16 % de clasificación correcta). Esto podría deberse a problemas en el emulsionamiento de las grasas durante la preparación de muestras. Los ADG de los perfiles de FAMES presentaron un buen desempeño en la separación de muestras auténticas de muestras adulteradas para cada grasa individual y para el global de los perfiles (100 % de clasificación correcta en todos los casos). Los ADG en función del nivel de adulteración presentaron buenos resultados para el aceite de coco (MGA) y el global de perfiles (85,7 % y 72,7 % en el modelo de validación cruzada, respectivamente). Un desempeño inferior se presentó para el aceite de soya (MGB), el aceite de canola (MGC) y la grasa butírica (MGD) (33,3 %, 42,9 % y 42,9 % en el modelo de validación cruzada, respectivamente).

El ANOVA y el Análisis de Componentes Principales (ACP) de los datos espectrales del queso Camembert completo mostraron evoluciones contra el tiempo de maduración y entre las secciones de corazón y subcorteza. Éstas pueden ser explicadas por los cambios bioquímicos en los compuestos más importantes como se ha descrito previamente para quesos Camembert. El análisis de otras fracciones del queso no provee mayor información o mejor discriminación que los espectros del queso completo.

Los modelos predictivos obtenidos por regresión PLS para los espectros de queso tanto de la subcorteza como del corazón dieron buenos resultados para la predicción del tiempo de maduración (tiempo de muestreo): a todo lo largo del proceso, el error fue cercano a un día.

La regresión PLS entre los datos fisicoquímicos y espectrales mostraron que el FTIR es un buen método para predecir los valores a lo largo de la maduración (de d1 a d27) de la materia seca (MS), del ácido láctico, del nitrógeno soluble en ácido (NSA), del nitrógeno no proteico (NNP) y del amoniaco (NH_4^+) (RPD superior a 2). Sin embargo, los modelos obtenidos para el contenido de lactosa y para el pH son menos precisos.

El ANOVA y el ACP de los datos espectrales del queso Emmental completo mostraron evoluciones en función el tiempo de maduración. Éstas pueden ser explicadas por los cambios bioquímicos en los compuestos más importantes como se ha descrito previamente para quesos Emmental. El ADG mostró que el FTIR es un buen método para separar las muestras de queso entre jóvenes, a la mitad de maduración y quesos maduros.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la espectroscopia de infrarrojo medio (MIR) tiene posibilidades como un método rápido y económico para clasificar la leche y productos similares en función de los criterios de la legislación vigente en México, para predecir el tiempo de maduración de quesos Camembert y Emmental de forma directa, así como para predecir el estado de la proteólisis y para hacer estimaciones aproximadas para el fenómeno de la glucólisis durante la maduración de quesos Camembert.

A pesar de que éste parece ser un método interesante, de fácil aplicación en un tiempo corto para estimar la identidad de una muestra de leche o el estado de maduración del queso, será necesario realizar investigaciones más profundas para ampliar su utilización a otras adulteraciones u otros quesos.

Para mejorar el desempeño de los modelos discriminantes para leche y productos similares, sería conveniente aplicar diferentes correcciones a los espectros de infrarrojo similares a las aplicadas a los espectros de queso. Asimismo, para mejorar el modelo de discriminación con grasas exógenas, sería conveniente utilizar un método para emulsionar las grasas que presente un mejor desempeño con la finalidad de evaluar la adulteración de forma directa o bien, construir el modelo de discriminación con los espectros de infrarrojo de sus grasas purificadas.

Finalmente, sería conveniente extender la metodología a otros tipos de quesos no sólo para evaluar su edad o los cambios en proceso, sino también para identificar los parámetros que

permitan diferenciarlos en función de su origen geográfico, los tratamientos térmicos a los que fue sometida la leche, entre otros.

Bibliografía

Acuña, P., Pagano, T., Grompone, M. A. & Bermúdez, J. (2001). Ácidos grasos libres en quesos, como parámetros vinculados a su maduración. Tecnología Láctea Latinoamericana, 25: 55-60.

Ahmed, N. S. & Helal, F. R. (1977). The infared absorption spectra for measuring the unsaturation in milk fat and oils. Milchwissenschaft, 32: 272-273.

Anderson, B. A., Miller, R. & Pallansch, M. J. (1974). Measuring unsaturation in milkfat and other oils by differential infrared spectroscopy. Journal of Dairy Sciencies, 57: 156-159.

Anema, S. G. & Klostermeyer, H. (1997). Heat-induced, pH-dependent dissociation of casein micelles on heating reconstituted skim milk at temperatures below 100 deg c. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 1108-1115.

Anema, S. G. & McKenna, A. B. (1996). Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 422-428.

Ardö, Y. & Polychroniadou, A. (1999). Eur18890-cost95-laboratory manual for chemical analysis of cheese. (pp. 123). Luxembourg, Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities,

Barcenas, P., Perez Elortondo, F. J. & Albisu, M. (2005). Sensory comparison of several cheese varieties manufactured from different milk sources. Journal of Sensory Studies, 20: 62–74.

Benfeldt, C., Sorensen, J., Ellegard, K. H. & Petersen, T. E. (1997). Heat treatment of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal, 7: 723-731.

Bertoni, G., Calamari, L. & Maianti, M. G. (2001). Producing specific milks for speciality cheeses. Proceedings of the Nutrition Society, 60: 231-246.

Bertrand, D. (2000). Prétraitement des données spectrales. In Bertrand, D. & Dufour, E. (Eds.), La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, (1er Edition) (pp. 351-370). Paris, France, Tec & Doc.

Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S. & Duboz, G. (1997). Ripening and quality of swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. International Dairy Journal, 7: 311-323.

Bugaud, C., Buchin, S., Noel, Y., Tessier, L., Pochet, S., Martin, B. & Chamba, J. F. (2001). Relationships between abondance cheese texture, its composition and that of milk produced by cows grazing different types of pastures. Lait, 81: 593-607.

C-9-1967 (1967). Norme codex internationale individuelle pour l'Emmental. CODEX STAN C-9-1967. Codex Alimentarius. pp 2.

C-33-1973 (1973). Norme codex internationale individuelle pour le Camembert. CODEX STAN C-33-1973. pp 3.

Cadet, F., Safar, M. & Dufour, E. (2000). Glucides. In Bertrand, D. & Dufour, E. (Eds.), La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, (1er Edition) (pp. 172-195). Paris, France, Tec & Doc.

Caridi, A., Micari, P., Foti, F., Ramondino, D. & Sarullo, V. (2003). Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese caprino d'aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. Food Microbiology, 20: 201-209.

Casal, H. L. & Mantsch, H. H. (1984). Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta, 777: 381-401.

Chamba, J. F. & Perreard, E. (2002). Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. Lait, 82: 33-44.

Chen, M., Irudayaraj, J. & McMahon, D. J. (1998). Examination of full fat and reduced fat cheddar cheese during ripening by fourier transform infrared spectroscopy. Journal of Dairy Science, 81: 2791-2797.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J. C., Lamberet, G. & Lenoir, J. (1997). La biochimie de l'affinage. In Eck, A. & Gillis, J. C. (Eds.), Le fromage, (3th Edition) (pp. 86-161). Paris, France, Lavoisier Tec & Doc.

Christensen, T. M. I. E., Bech, A. M. & Werner, H. (1991). Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. Bulletin of the IDF, 261: 4-9.

Coates, J. (2000). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In Meyers, R. A. (Eds.), Encyclopedia of analytical chemistry, (pp. 10815-10837). Chichester, John Wiley & Sons Ltd.

Codex-Stan-206-1999 (1999). Norme générale codex pour l'utilisation de termes de laiterie. CODEX STAN 206-1999. pp 3.

Coker, C. J., Crawford, R. A., Johnston, K. A., Singh, H. & Creamer, L. K. (2005). Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data - a review. International Dairy Journal, 15: 631-643.

Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. & Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. International Dairy Journal, 13: 841–866.

Collomb, M., Butikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B. & Bosset, J. O. (2002). Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography. International Dairy Journal, 12: 649-659.

Coulon, L. B., Delacroix-Buchet, A., Martin, B. & Pirisi, A. (2004). Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: A review. Lait, 84: 221-241.

Creamer, L. K. & MacGibbon, A. K. H. (1996). Some recent advances in the basic chemistry of milk proteins and lipids. International Dairy Journal, 6: 539-568.

Defernez, M. & Kemsley, E. K. (1997). The use and misuse of chemometrics for treating classification problems. Trends in analytical chemistry, 16: 216-221.

Dennis, M. J. (1997). Establishing food authenticity. Chemistry and Industry, 997-1000.

Destaillats, F., Wispelaere, M. D., Joffre, F., Golay, P. A., Huga, B., Giuffrida, F., Fauconnot, L. & Dionisi, F. (in press). Authenticity of milk fat by fast analysis of triacylglycerols application to the detection of partially hydrogenated vegetable oils. Journal of Chromatography A,

DGCCRF (2006). Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes. 21 de octubre. http://www.minefi.gouv.fr/DGCCRF/index.html?ru=00

Dousseau, F., Therrien, M. & Pézolet, M. (1989). On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. Applied Spectroscopy, 43: 538-542.

Downey, G. (1996). Authentication of food and food ingredients by near infrared spectroscopy. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 4: 47-61.

Dufour, E., Mazerolles, G., Devaux, M. F., Duboz, G., Duployer, M. H. & Riou, N. M. (2000). Phase transition of triglycerides during semi-hard cheese ripening. International Dairy Journal, 10: 81-93.

Dufour, E. & Robert, P. (2000). Protéines. In Bertrand, D. & Dufour, E. (Eds.), La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, (1er Edition) (pp. 107-137). Paris, France, Tec & Doc.

Engel, E., Nicklaus, S., Septier, C., Salles, C. & Le Quere, J. L. (2001a). Evolution of the taste of a bitter Camembert cheese during ripening: Characterization of a matrix effect. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 2930-2939.

Engel, E., Tournier, C., Salles, C. & Le Quere, J. L. (2001b). Evolution of the composition of a selected bitter Camembert cheese during ripening: Release and migration of taste-active compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 2940-2947.

Evers, J. M. (2003). Determination of free fatty acids in milk using the BDI method - some practical and theoretical aspects. International Dairy Journal, 13: 111-121.

Fallico, V., McSweeney, P. L. H., Siebert, K. J., Horne, J., Carpino, S. & Licitra, G. (2004). Chemometric analysis of proteolysis during ripening of Ragusano cheese. Journal of Dairy Science, 87: 3138-3152.

FAO (2003). Base de datos FAOSTAT. 10 marzo. www.fao.org

FAO (2006a). Base de datos PRODSTAT. 21 octubre. www.fao.org

FAO (2006b). Base de datos TRADESTAT. 21 octubre. www.fao.org

FIL IDF No. 20b (1993). Milk determination of nitrogen content. (pp. Brussels, Belgium, International Dairy Federation,

Folch, J., Lees, M. & Stanley Sloane, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry, 226: 497-509.

Fontecha, J., Bellanato, J. & Juarez, M. (1996). Infrared and raman spectroscopic study of casein in cheese: Effect of freezing and frozen storage. Journal of Dairy Science, 76: 3303-3309.

Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. Food Reviews International, 12: 457-509.

Gagnaire, V., Boutrou, R. & Léonil, J. (2001a). How can the peptides produced from Emmental cheese give some insights on the structural features of the paracasein matrix? International Dairy Journal, 11: 449-454.

Gagnaire, V., Mollé, D., Herrouin, M. & Léonil, J. (2001b). Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49: 4402-4413.

García Ruiz, A. G., Cabezas, L., Martin-Alvarez, P. J. & Cabezudo, D. (1998). Prediction of the ripening times of Manchego cheese using multivariate statistical analyse: A preliminary study. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology, 206: 382-386.

Gorostiza, A., Cichoscki, A. J., Valduga, A. T., Valduga, E., Bernardo, A. & Fresno, J. M. (2004). Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. Food Chemistry, 85: 407-414.

Grappin, R., Lefier, D. & Mazerolles, G. (2000). Analyse du lait et des produits laitiers. In Bertrand, D. & Dufour, E. (Eds.), La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, (1er Edition) (pp. 497-540). Paris, France, Tec & Doc.

Guerzoni, M. E., Vannini, L., Chaves-Lopez, C., Lanciotti, R., Suzzi, G. & Gianotti, A. (1999). Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses. Journal of Dairy Science, 82: 851-862.

Hasouna, M., Nafti, A. & Ghrir, R. (1996). Ripening of a Camembert-type cheese made with raw ewe's milk: Microbiological and physico-chemical aspects. Sciences des Aliments, 16: 187-203.

Hynes, E. R., Bergamini, C. V., Suarez, V. B. & Zalazar, C. A. (2003). Proteolysis on Reggianito argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. Journal of Dairy Science, 86:

Jaubert, A. & Martin, P. (1992). Reverse-phase hplc analysis of goat caseins. Identification of α_{s1} and α_{s2} genetic variants. Lait, 72: 235-247.

Karoui, R., Bosset, J. O., Mazerolles, G., Kulmyrzaev, A. & Dufour, E. (2005a). Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and l'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: A preliminary investigation. International Dairy Journal, 15: 275-286.

Karoui, R., Dufour, E., Pillonel, L., Schaller, E., Picque, D., Cattenoz, T. & Bosset, J. O. (2005b). The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. International Dairy Journal, 15: 287-298.

Karoui, R., Mazerolles, G. & Dufour, E. (2003). Spectroscopic techniques coupled with chemometric tools for structure and texture determinations in dairy products. International Dairy Journal, 13: 607–620.

Karoui, R., Mouazen, A., Dufour, E., Pillonel, L., Schaller, E., Picque, D., Baerdemaeker, J. & Bosset, J. (2006a). A comparison and joint use of NIR and MIR spectroscopic methods for the

determination of some parameters in European Emmental cheese. European Food Research and Technology, 223: 44-50.

Karoui, R., Mouazen, A., Dufour, E., Schoonheydt, R. & Baerdemaeker, J. (2006b). A comparison and joint use of VIS-NIR and MIR spectroscopic methods for the determination of some chemical parameters in soft cheeses at external and central zones: A preliminary study. European Food Research and Technology, 223: 363-371.

Karoui, R., Mouazen, A. M., Dufour, E., Pillonel, L., Picque, D., Baerdemaeker, J. D. & Bosset, J. O. (2006c). Application of the MIR for the determination of some chemical parameters in European Emmental cheeses produced during summer. European Food Research and Technology, 222: 165-170.

Karoui, R., Mouazen, A. M., Dufour, E., Pillonel, L., Picque, D., Bosset, J. O. & De Baerdemaeker, J. (2006d). Mid-infrared spectrometry: A tool for the determination of chemical parameters in Emmental cheeses produced during winter. Lait, 86: 83-97.

Karoui, R., Mouazen, A. M., Ramon, H., Schoonheydt, R. & De Baerdemaeker, J. (2006e). Feasibility study of discriminating the manufacturing process and sampling zone in ripened soft cheeses using attenuated total reflectance MIR and fiber optic diffuse reflectance VIS-NIR spectroscopy. Food Research International, 39: 588-597.

Kuchroo, C. N. & Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft, 37: 331-335.

Kulmyrzaev, A., Dufour, E., Noel, Y., Hanafi, M., Karoui, R., Qannari, E. M. & Mazerolles, G. (2005). Investigation at the molecular level of soft cheese quality and ripening by infrared and fluorescence spectroscopies and chemometrics - relationships with rheology properties. International Dairy Journal, 15: 669-678.

Lanciotti, R., Vannini, L., Lopez, C. C., Gobbetti, M. & Guerzoni, M. E. (2005). Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. International Journal of Dairy Technology, 58: 89-99.

Lanher, B. (1991). Spectrometrie infra-rouge a transformée de Fourier et analyse multidimensionelle de donnees spectrales. Application à la quantification et au controle de procedes dans le domaine des produits laitiers. Doctorat, Université de Bourgogne, Bourgogne, 296.

Leclercq-Perlat, M. N., Buono, F., Lambert, D., Latrille, E., Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (2004). Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. Journal of Dairy Research, 346-354.

Leclercq-Perlat, M. N., Oumer, A., Bergère, J. L., Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (1999). Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. Journal of Dairy Research, 66: 271-281.

Leclercq-Perlat, M. N., Oumer, A., Buono, F., Bergère, J. L., Spinnler, H. E. & Corrieu, G. (2000). Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of soft smear cheese from reconstituted milk: Protein degradation. Journal of Dairy Science, 83: 1674-1683.

Lees, M., Ed. (1999). Food authenticity. Issues and methodologies. F.A.I.M. Concerted action n°air3-ct94-2452. (pp. 311). Nantes, Eurofins Scientific.

Legifrance (2006). Code de la consommation. 21 de octubre. http://www.legifrance.gouv.fr/html/index.html

Luinge, H. J., Hop, E., Lutz, E. T. G., Van Hemert, J. A. & De Jong, E. A. M. (1993). Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry. Analytica Chimica Acta, 284: 410-433.

Mallatou, H., Pappa, E. & Massouras, T. (2003). Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. International Dairy Journal, 13: 211–219.

Mazerolles, G., Devaux, M. F., Duboz, G., Duployer, M. H., Riou, N. M. & Dufour, E. (2001). Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. Le Lait, 81: 509–527.

Mazerolles, G., Devaux, M. F., Dufour, E., Qannari, E. M. & Courcoux, P. (2002). Chemometric methods for the coupling of spectroscopic techniques and for the extraction of the relevant information contained in the spectral data tables. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 63: 57–68.

McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. International Journal of Dairy Technology, 57: 127-144.

McSweeney, P. L. H. & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. Lait, 80: 293-324.

Moatsou, G., Massouras, T., Kandarakis, I. & Anifantakis, E. (2002). Evolution of proteolysis during the ripening of traditional Feta cheese. Le Lait, 82: 601-611.

Mouazen, A. M., De Baerdemaeker, J. & Ramon, H. (2005). Towards development of on-line soil moisture content sensor using a fibre-type NIR spectrophotometer. Soil & Tillage Research, 80: 171-183.

NMX-026-1997-SCFI (1997). Leche. Denominación. Especificaciones comerciales y métodos de prueba. Milk. Denomination. Diario Oficial de la Federación. 18 de agosto**,** pp 17.

NOM-155-SCFI-2003 (2003). Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-denominaciones, specificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. 12 de Septiembre**,** pp 38.

NOM-184-SSA1-2002 (2002). Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. 23 de octubre**,** pp

Omar, M. M., Kiesner, C. & El-Nour, A. M. A. (1999). Ripening time estimation of Kariesh cheese. Nahrung-Food, 43: 34-38.

Petibois, C., Melin, A. M., Perromat, A., Cazorla, G. & Déléris, G. (2000). Glucose and lactate concentration determination on single microsamples by Fourier-transform infrared spectroscopy. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 135: 210-215.

Picque, D., Cattenoz, T. & Corrieu, G. (2002). Discrimination of Emmental cheeses by infrared spectroscopy. Milchwissenschaft-Milk Science International, 57: 202-204.

Picque, D., Lefier, D., Grappin, R. & Corrieu, G. (1993). Monitoring of fermentation by infrared spectrometry alcoholic and lactic fermentations. Analytica Chimica Acta, 279: 67-72.

Pillonel, L., Ampuero, S., Tabacchi, R. & Bosset, J. O. (2003a). Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: Volatile compounds by GC/MS-FID and electronic nose. European Food Research and Technology, 216: 179-183.

Pillonel, L., Collomb, M., Tabacchi, R. & Bosset, J. O. (2002). Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese. Free fatty acids, triglycerides and fatty acid composition of cheese fat. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 93: 217-231.

Pillonel, L., Luginbuhl, W., Picque, D., Schaller, E., Tabacchi, R. & Bosset, J. O. (2003b). Analytical methods for the determination of the geographic origin of Emmental cheese: Mid- and near-infrared spectroscopy. European Food Research and Technology, 216: 174–178.

Poveda, J. M., Cabezas, L. & McSweeney, P. L. H. (2004a). Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. Food Chemistry, 84: 213-218.

Poveda, J. M., Garcia, A., Martin-Alvarez, P. J. & Cabezas, L. (2004b). Application of partial least squares (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese. Food Chemistry, 84: 29-33.

Powell, J. R., Wasacz, F. M. & Jakobsen, R. J. (1986). An algorithm for the reproducible spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of proteins in dilute solutions and adsorbed monolayers. Applied Spectroscopy, 40: 339-344.

Prieto, B., Franco, I., Fresno, J. M., Prieto, J. G., Bernardo, A. & Carballo, J. (2004). Effect of ripening time and type of rennet (farmhouse rennet from kid or commercial calf) on proteolysis during the ripening of leon cow milk cheese. Food Chemistry, 85: 389-398.

PROY-NOM-155-SCFI-2001 (2002). Leches, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación. 03 de abril**,** pp 23.

Riaublanc, A., Bertrand, D. & Dufour, E. (2000). Lipides. In Bertrand, D. & Dufour, E. (Eds.), La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, (1er Edition) (pp. 139-169). Paris, France, Tec & Doc.

Robert, P. & Dufour, E. (2000). Règles générales d'attribution des bandes spectrales. In Bertrand, D. & Dufour, E. (Eds.), La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques, (1er Edition) (pp. 79-92). Paris, France, Tec & Doc.

Rodriguez-Saona, L. E., Koca, N., Harper, W. J. & Alvarez, V. B. (2006). Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. Journal of Dairy Science, 89: 1407-1412.

Rohm, H., Jaros, D., Rockenbauer, C., Riedler-Hellrigl, M., Uniacke-Lowe, T. & Fox, P. F. (1996). Comparison of ethanol and trichloroacetic acid fractionation for measurement of proteolysis in Emmental cheese. International Dairy Journal, 6: 1069-1077.

Rychlik, M., Warmke, R. & Grosch, W. (1997). Ripening of Emmental cheese wrapped in plastic film with and without addition of *Lactobacillus casei* subsp. Casei. III. Analysis of character impact flavour compounds. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 30: 471–478.

SAGARPA (2006). Análisis de la leche. SAGARPA. 20 octubre. http://siap.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/anleche.html

Schlesser, J. E., Schmidt, S. J. & Speckman, R. (1992). Characterization of chemical and physical changes in Camembert cheese during ripening. Journal of Dairy Science, 75: 1753-1760.

SECOFI (1999). Resolución por la que se establece la obligación de los fabricantes, envasadores, importadores o comercializadores de someter a verificación la veracidad de la información que ostentan las etiquetas de leche. Diario Oficial de la Federación. 20 de diciembre**,** pp

Skeie, S., Feten, G., Almoy, T., Ostlie, H. & Isaksson, T. (2006). The use of near infrared spectroscopy to predict selected free amino acids during cheese ripening. International Dairy Journal, 16: 236-242.

Sousa, M. J., Ardö, Y. & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal, 11: 327-345.

Sumar, S. & Ismail, H. (1995). Adulteration of foods-past and present. Nutrition and Food Science, 4: 11-15.

Van De Voort, F. R., Sedman, J., Emo, G. & Ismail, A. A. (1992). Assessment of Fourier transform infrared analysis of milk. Journal of the AOAC International, 75: 780-785.

Vannini, L., Baldi, D. & Lanciotti, R. (2001). Use of fourier transform infrared spectroscopy to evaluate the proteolytic activity of *Yarrowia lipolytica* and its contribution to cheese ripening. International Journal of Food Microbiology, 69: 113-123.

Verdini, R. A., Zorrilla, S. E. & Rubiolo, A. C. (2004). Characterisation of soft cheese proteolysis by RP-HPLC analysis of its nitrogenous fractions. Effect of ripening time and sampling zone. International Dairy Journal, 14: 445-454.

Wi, S., Pancoska, P. & Keiderling, T. A. (1998). Predictions of protein secondary structures using factor analysis on Fourier transform infrared spectra: Effect of Fourier self-deconvolution of the amide I and amide II bands. Biospectroscopy, 4: 93-106.

Wust, E. & Rudzik, L. (2003). The use of infrared spectroscopy in the dairy industry. Journal of Molecular Structure, 661: 291-298.

Anexos

Anexo A. Metodologías

Tabla A.1. Estándares y resultados de calibración para metil ésteres de ácidos grasos (FAMES)

A.1 Elaboración de queso blando tipo Camembert (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004)

A.2 Determinación de lactosa y ácido láctico (Leclercq-Perlat *et al.*, 1999)

A.3 Determinación de fracciones nitrogenadas por (Leclercq-Perlat *et al.*, 2000)

Tabla A.1 Estándares y resultados de calibración para metil ésteres de ácidos grasos (FAMES)

COMPUESTO		CAS*	PUREZA (%)	R	R^2
Nombre trivial	**Nombre sistemático**				
Saturados					
Butírico	4:0	107-92-6	99	0,99919	0,99838
Hexanoico	6:0	142-62-1	99,8	0,99976	0,99952
Heptanoico	7:0	111-14-8	99	0,99983	0,99966
Octanoico	8:0	124-07-2	99,9	0,99987	0,99974
Nonanoico	9:0	112-05-0	99,9	0,99989	0,99978
Decanoico	10:0	334-48-5	99,5	0,99990	0,99980
Undecanoico	11:0	112-37-8	99,9	0,99992	0,99984
Laurico	12:0	143-07-7	97,6	0,99992	0,99984
Tridecanoico	13:0	638-53-9	99	0,99992	0,99984
Tetradecanoico	14:0	544-63-8	99,9	0,99991	0,99982
Pentadecanoico	15:0	1002-84-2	99,9	0,99992	0,99984
Palmitico	16:0	57-10-3	99,9	0,99988	0,99976
Heptadecanoico	17:0	506-12-7	99,5	0,99990	0,99980
Octadecanoico	18:0	57-11-4	99,9	0,99990	0,99980
Nonadecanoico	19:0	646-30-0	99,1	0,99984	0,99968
Araquidico	20:0	506-30-9	99,9	0,99940	0,99880
Heneicosanoico	21:0	2363-71-5	99,9	0,99992	0,99984
Docosanoico	22:0	112-85-6	99,2	0,99994	0,99988
Tricosanoico	23:0	2433-96-7	99,9	0,99996	0,99992
Lignocérico	24:0	557-59-5	99,9	0,99994	0,99988
Monoinsaturados					
Miristoleico	14:1n9c	544-64-9	99,6	0,99992	0,99984
Palmitoleico	16:1n9c	373-49-9	99,4	0,99991	0,99982
cis 6- petroselínico	18:1n6c	593-39-5	99,9	0,99983	0,99966
Elaídico	18:1n9t	112-79-8	99,9	0,99707	0,99415
Oleico	18:1n9c	54-11-4	99,9	0,99986	0,99972
cis-vaccenico	18:1n11c	506-17-2	98,2	0,99937	0,99874
Eicosenoico	20:1n11c	5561-69-9	98,6	0,99957	0,99914
Erucico	22:1n13c	112-86-7	99,9	0,99904	0,99808
Nervonico	24:1n15c	506-37-6	99,3	0,99510	0,99022
Poliinsaturados					
Linoelaidico	18:2n9t,n12t	506-21-8	99,9	0,99983	0,99966
Linoleico	18:2n9c,n12c	60-33-3	99,9	0,99991	0,99982
Linolenico	18:3n9c,n12c,n15c	463-40-1	99,9	0,99938	0,99876
Araquidonico	20:4n5c,n8c,n11c,n14c	506-32-1	99,6	0,99993	0,99986
cis-eicosapentaenoico	20:5n5c,n8c,n11c,n14c,n17c	10417-94-4	98,5	0,99447	0,98897
cis-docosahexanoico	22:6n4c,n7c,n10c,n13c,n16c,n19c	301-01-9	98,5	0,99960	0,99920

* CAS correspondiente al ácido graso no metilado

A.1 Elaboración de queso blando tipo Camembert (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004).

Antes de la fabricación, la leche fue estandarizada mezclando leche entera con leche descremada para obtener una relación grasa/proteína entre 0,85 y 0,89. Para cada lote se utilizaron 100 L de leche cruda, obteniéndose un total de 45 quesos de 360 g ± 20 g en cada fabricación.

Después de pasteurización a 75-77 ºC durante 30 segundos, la leche fue inoculada con un cultivo láctico y con un cultivo de maduración (*Brevibacteriun linens, Kleuveromyces lactis, Geotricum candidum* y *Penicilium camemberti*). Una vez alcanzado un pH de 6,3 ± 0,1, a cada 100 L de leche se le adicionaron 20 mL de cuajo con un contenido de 520 mg de quimosina/mL. Al termino de la coagulación, aproximadamente 40 min, la cuajada fue cortada en cubos de 2 cm por arista y se dejó drenar por 40 min. Transcurrido el tiempo, fue vertida en moldes cilíndricos de 110 mm de diámetro por 77 mm de altura que fueron llenados en una sola operación. Éstos fueron invertidos a los 30 min y 5 h y se dejaron drenar por gravedad durante 24 h. Los quesos desmoldados fueron salados por inmersión en salmuera estéril saturada (300 g NaCl/L) durante 25 min.

El proceso de maduración se inició después del salado (día 1). Los quesos fueron transferidos en una cámara de maduración de 2 m^3 previamente esterilizada con ácido peracético. Inicialmente fueron mantenidos a 13 °C ± 1 °C y una humedad relativa del 85 % ± 2 % (HR) durante 24 h. A partir del segundo día (escrito d2) la humedad se incrementó hasta el 95 % ± 2 % HR que fue mantenida hasta d15. En d 15 los quesos fueron embalados y dejados a madurar a 4 ºC y humedad desconocida hasta d27.

A.2 Determinación de lactosa y ácido láctico (Leclercq-Perlat *et al.*, 1999)

La lactosa residual y el ácido láctico se midieron por Cromatografía de Líquidos de Alto Desempeño (HPLC). Antes del análisis instrumental se prepararon suspensiones utilizando 10 g de queso para el lactato y 7.5 g para la lactosa. A las muestras de queso finamente ralladas se les agregaron 10 mL de agua destilada y se incubaron a 50 ºC durante 1 h antes de ser

homogeneizadas utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kundel, IKA-Labortechnik, Staufel, Germany) a 25,000 rpm durante 2 min.

Enseguida, a las suspensiones para la medición de lactato se les adicionó 12,5 mL de la solución I de Carrez (150 g $K_4(Fe(CN)_6)\cdot 6H_2O$ L^{-1}), 12,5 mL de la solución de Carrez II (240 g $Zn(CH_3COO)_2)\cdot 2H_2O$ L^{-1}) y 2,5 mL de NaOH 1M. Después de homogeneizar e incubar las suspensiones por 1 h a 25 ºC, se filtraron dos veces, la primera utilizando papel filtro Whatman No. 42 (Whatman International Limited) y la segunda sobre un filtro de celulosa (0,2 μm; Minisart SP25, Sartorius, Tigery, France).

Para la medición de lactato, a las suspensiones se les agregaron 10 mL de ácido tricloroacético y 10 ml de agua destilada, se homogeneizaron e incubaron durante 1 h a 25 ºC y se filtraron utilizando papel filtro Whatman No. 42 (Whatman International Limited).

Las condiciones y equipo utilizados para los análisis HPLC fueron descritos por Picque *et al.* (1993). Las muestras se analizaron con un equipo provisto de un detector refractométrico. La separación de los compuestos se realizó con una columna Aminex HPX87H (Biorad) utilizando como fase móvil una solución 0,005 M H_2SO_4, a una velocidad de 0,6 mL min^{-1}. Como estándar interno se utilizó una solución de ácido propiónico al 1%.

A.3 Determinación de fracciones nitrogenadas por (Leclercq-Perlat *et al.*, 2000)

La metodología descrita por Leclercq-Perlat *et al.* (2000) fue utilizada para evaluar las fracciones nitrogenadas Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), Nitrógeno no Proteico (NNP), amoniaco (NH_4^+) y Nitrógeno Total (NT). El NT fue evaluado de acuerdo al estándar de la International Dairy Federation (FIL IDF No. 20b, 1993).

Las diferentes fracciones nitrogenadas se obtuvieron por precipitación selectiva de las muestras de queso y el contenido de nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl. A 5 g de queso rallado se le adicionaron 45 mL de una solución de NaCl (9 g/L) y se homogeneizaron con el Ultra-Turrax a 25,000 rpm durante 5 minutos. A una alícuota de 20 mL de esta suspensión se

le adicionaron 20 mL de una solución de ácido Tricloroacético (240 g TAC/L) y se homogeneizó con el Ultra-Turrax a 25,000 rpm durante 2 minutos. Después de una incubación a 25 ºC durante 1 h, se filtró usando papel filtro Whatman No. 42. El sobrenadante así obtenido corresponde a la fracción de Nitrógeno No Proteico (NNP).

La suspensión restante fue ajustada a pH 4,6 con HCl 2N y se incubó a 25 ºC durante 20 min. Posteriormente se centrifugó durante 30 min a 12 000 g y se filtró con papel filtro Whatman No. 42. El filtrado obtenido corresponde al Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA).

Para la medición de NH_3, a una alícuota de 1 mL de la solución de NNP se le adicionaron 49 mL de agua destilada y 1 mL de la solución de Nessler (Prolabo). Después de 1 min de incubación a 25 ºC, se analizó por espectroscopia a 430 nm (Shimadzu UV-160A, Kyoto, Japan).

Anexo B. Leche

Tabla B.1. Perfil de ácidos grasos (FAMES) de leche y productos similares expresado en g 100 g^{-1} de ácidos grasos.

Tabla B.2. Distancias Mahalanobis al cuadrado y probabilidad de clasificación en función de la etiqueta para los perfiles de ácidos grasos de las muestras individuales leche y productos similares.

Tabla B.3. Distancias Mahalanobis al cuadrado y probabilidad de clasificación en función de la etiqueta para los perfiles de ácidos grasos de las muestras individuales leche y productos similares.

Tabla B.4 Perfil de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasas exógenas expresado en g 100 g^{-1} de ácidos grasos. Código de las muestras: MGxyz, donde x es la grasa, y el nivel y z la repetición.

Tabla B.1. Perfil de concentración de ácidos grasos (FAMES) de leche y productos similares expresado en g 100 g^{-1} de ácidos grasos.

TR	ÁCIDO GRASO	ETIQUETA[a]						NOM-155-SCFI-2003[b]								
		FL			L			PLC			FL			L		
		media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV
11,27	Hexanoico	0,0334	0,0747	2,2361	0,2220	0,1195	0,5385	-	-	-	0,1670	-	-	0,2220	0,1195	0,5385
12,54	Octanoico	0,0581	0,0667	1,1474	0,2812	0,1277	0,4539	0,0308	0,0309	1,0031	0,1674	-	-	0,2812	0,1277	0,4539
13,61	Decanoico	0,2274	0,2520	1,1079	0,9467	0,3586	0,3787	0,1192	0,0811	0,6807	0,6602	-	-	0,9467	0,3586	0,3787
13,91	4-decenoico	0,0211	0,0265	1,2564	0,0838	0,0420	0,5012	0,0102	0,0118	1,1595	0,0649	-	-	0,0838	0,0420	0,5012
14,20	Undecanoico	0,0035	0,0078	2,2361	0,0233	0,0164	0,7056	-	-	-	0,0174	-	-	0,0233	0,0164	0,7056
14,88	Laurico	0,4856	0,4528	0,9325	1,5775	0,5096	0,3230	0,3000	0,2092	0,6972	1,2280	-	-	1,5775	0,5096	0,3230
15,12	P2	0,0082	0,0123	1,5132	0,0335	0,0153	0,4570	0,0032	0,0065	2,0000	0,0278	-	-	0,0335	0,0153	0,4570
15,30	10-metil-dodecanoico	0,0174	0,0256	1,4722	0,0616	0,0280	0,4541	0,0076	0,0151	2,0000	0,0568	-	-	0,0616	0,0280	0,4541
15,70	Tridecanoico	0,0155	0,0195	1,2541	0,0554	0,0235	0,4240	0,0075	0,0089	1,1785	0,0475	-	-	0,0554	0,0235	0,4240
16,22	P4	0,0325	0,0441	1,3543	0,0959	0,0431	0,4490	0,0140	0,0175	1,2447	0,1066	-	-	0,0959	0,0431	0,4490
16,72	Tetradecanoico	2,3403	2,6354	1,1261	7,3556	2,0209	0,2747	1,2348	1,0550	0,8544	6,7624	-	-	7,3556	2,0209	0,2747
17,30	Miristoleico	0,1703	0,2036	1,1950	0,5452	0,1598	0,2930	0,0866	0,0922	1,0649	0,5053	-	-	0,5452	0,1598	0,2930
17,40	9-metil-tetradecanoico	0,0796	0,0979	1,2287	0,2212	0,0766	0,3461	0,0385	0,0385	1,0002	0,2442	-	-	0,2212	0,0766	0,3461
17,640	12-metil-tetradecanoico	0,1441	0,1743	1,2095	0,4288	0,1393	0,3250	0,0713	0,0717	1,0065	0,4353	-	-	0,4288	0,1393	0,3250
18,06	Pentadecanoico	0,3139	0,3551	1,1314	0,8839	0,2484	0,2810	0,1642	0,1369	0,8338	0,9127	-	-	0,8839	0,2484	0,2810
18,28	P7	0,0197	0,0227	1,1535	0,0545	0,0649	1,1893	0,0111	0,0138	1,2456	0,0544	-	-	0,0545	0,0649	1,1893
18,93	14-metil-pentadecanoico	0,0987	0,1180	1,1960	0,2499	0,0738	0,2955	0,0498	0,0513	1,0303	0,2943	-	-	0,2499	0,0738	0,2955
19,81	Palmitico	16,6840	7,7752	0,4660	28,5246	5,2267	0,1832	13,6466	4,3703	0,3202	28,8336	-	-	28,5246	5,2267	0,1832
20,26	P11	0,0420	0,0445	1,0609	0,0468	0,0283	0,6035	0,0239	0,0214	0,8967	0,1144	-	-	0,0468	0,0283	0,6035
20,39	7-hexadecenoico	0,0962	0,0857	0,8906	0,1777	0,0613	0,3452	0,0643	0,0547	0,8508	0,2239	-	-	0,1777	0,0613	0,3452
20,58	Palmitoleico	0,4665	0,4530	0,9711	1,1545	0,2406	0,2084	0,3042	0,3131	1,0292	1,1157	-	-	1,1545	0,2406	0,2084
20,92	P13	0,0072	0,0161	2,2361	0,0073	0,0134	1,8318	0,0090	0,0180	2,0000	-	-	-	0,0073	0,0134	1,8318
21,13	14-metil-hexadecenoico	0,1353	0,1861	1,3757	0,3964	0,1715	0,4327	0,0633	0,1078	1,7035	0,4232	-	-	0,3964	0,1715	0,4327
22,29	15-metil-hexadecenoico	0,1612	0,2302	1,4281	0,4294	0,1770	0,4122	0,0777	0,1553	2,0000	0,4955	-	-	0,4294	0,1770	0,4122
24,73	Heptadecanoico	0,3992	0,2386	0,5976	0,5883	0,2166	0,3681	0,3292	0,2079	0,6315	0,6792	-	-	0,5883	0,2166	0,3681

[a] Etiqueta, L: Leche y FL: Fórmula láctea

[b] NOM-155-SCFI-2003, L: Leche, FL: Fórmula láctea y PLC: Producto lácteo combinado

Tabla B.1. Continuación...

TR	ÁCIDO GRASO	ETIQUETA[a]						NOM-155-SCFI-2003[b]								
		FL			L			PLC			FL			L		
		media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV
27,42	P16	0,0953	0,1315	1,3797	0,1802	0,0811	0,4502	0,0539	0,1078	2,0000	0,2611	-	-	0,1802	0,0811	0,4502
32,61	Octadecanoico	17,7285	4,3044	0,2428	14,6554	4,3232	0,2950	18,0559	4,8979	0,2713	16,4189	-	-	14,6554	4,3232	0,2950
33,17	P17	14,3528	8,8838	0,6190	1,0959	0,6300	0,5748	17,4429	6,4477	0,3696	1,9925	-	-	1,0959	0,6300	0,5748
33,51	Cis-6-petroselinico	1,0949	0,5177	0,4728	0,3308	0,2008	0,6071	1,2647	0,4065	0,3214	0,4160	-	-	0,3308	0,2008	0,6071
33,61	Oleico	26,1546	5,0663	0,1937	25,9240	4,1739	0,1610	26,4677	5,7939	0,2189	24,9023	-	-	25,9240	4,1739	0,1610
33,88	Cis-vaccenico	2,2453	0,9067	0,4038	0,8783	0,2578	0,2935	2,5859	0,5682	0,2197	0,8831	-	-	0,8783	0,2578	0,2935
34,11	12-octadecenoico	2,6902	1,7181	0,6387	0,3218	0,2229	0,6927	3,2275	1,4181	0,4394	0,5408	-	-	0,3218	0,2229	0,6927
34,39	13-octadecenoico	0,6165	0,3610	0,5855	0,0279	0,0157	0,5627	0,7564	0,2082	0,2752	0,0571	-	-	0,0279	0,0157	0,5627
34,53	P19	0,0291	0,0652	2,2361	0,0178	0,0214	1,2002	0,0364	0,0729	2,0000	-	-	-	0,0178	0,0214	1,2002
34,66	Linoelaidico	1,6330	0,9257	0,5669	0,8703	0,2674	0,3072	1,7711	1,0077	0,5689	1,0806	-	-	0,8703	0,2674	0,3072
34,92	11-metil-octadecanoico	0,3321	0,1890	0,5691	0,0664	0,0539	0,8117	0,3776	0,1840	0,4874	0,1503	-	-	0,0664	0,0539	0,8117
35,13	P20	0,0972	0,0557	0,5734	0,1340	0,1131	0,8437	0,0900	0,0616	0,6846	0,1258	-	-	0,1340	0,1131	0,8437
35,25	P21	0,2754	0,3846	1,3965	0,0204	0,0588	2,8829	0,3198	0,4291	1,3416	0,0979	-	-	0,0204	0,0588	2,8829
35,46	P22	0,2032	0,2354	1,1585	0,0099	0,0397	4,0000	0,2143	0,2703	1,2611	0,1586	-	-	0,0099	0,0397	4,0000
35,59	P23	0,1238	0,1220	0,9851	0,0408	0,0647	1,5853	0,1548	0,1160	0,7493	-	-	-	0,0408	0,0647	1,5853
35,77	Linoleico	2,6054	0,4412	0,1694	6,0598	7,2213	1,1917	2,4689	0,3680	0,1490	3,1513	-	-	6,0598	7,2213	1,1917
36,31	P24	0,2837	0,1479	0,5213	0,0394	0,0374	0,9514	0,3313	0,1186	0,3578	0,0933	-	-	0,0394	0,0374	0,9514
36,49	P25	0,0050	0,0112	2,2361	0,0512	0,1392	2,7181	-	-	-	0,0250	-	-	0,0512	0,1392	2,7181
36,87	Nonadecanoico	0,0373	0,0519	1,3917	0,1074	0,1900	1,7685	0,0200	0,0401	2,0000	0,1065	-	-	0,1074	0,1900	1,7685
37,78	P27	0,0100	0,0223	2,2361	0,0751	0,1527	2,0320	0,0125	0,0249	2,0000	-	-	-	0,0751	0,1527	2,0320
38,02	P28	0,0336	0,0475	1,4165	0,0977	0,0618	0,6325	0,0167	0,0333	2,0000	0,1011	-	-	0,0977	0,0618	0,6325
38,22	P29	-	-	-	0,0401	0,0491	1,2264	-	-	-	-	-	-	0,0401	0,0491	1,2264
39,06	Linolenico	0,2512	0,2069	0,8237	0,8373	1,0440	1,2469	0,1698	0,1134	0,6679	0,5771	-	-	0,8373	1,0440	1,2469

[a] Etiqueta, L: Leche y FL: Fórmula láctea

[b] NOM-155-SCFI-2003, L: Leche, FL: Fórmula láctea y PLC: Producto lácteo combinado

Tabla B.1. Continuación...

TR	ÁCIDO GRASO	ETIQUETA[a]						NOM-155-SCFI-2003[b]								
		FL			L			PLC			FL			L		
		media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV	media	σ	CV
40,68	P30	0,2444	0,3834	1,5689	0,6292	0,2775	0,4410	0,0866	0,1732	2,0000	0,8757	-	-	0,6292	0,2775	0,4410
42,47	Araquidico	0,5135	0,2865	0,5578	0,2677	0,1270	0,4746	0,5697	0,2973	0,5219	0,2890	-	-	0,2677	0,1270	0,4746
43,26	P31	0,1932	0,1612	0,8344	0,0411	0,0678	1,6491	0,1927	0,1862	0,9660	0,1953	-	-	0,0411	0,0678	1,6491
43,55	P32	0,0401	0,0579	1,4448	0,0689	0,0731	1,0611	0,0501	0,0617	1,2307	-	-	-	0,0689	0,0731	1,0611
43,97	Eicosenoico	0,0981	0,0450	0,4590	0,1550	0,1629	1,0509	0,1050	0,0488	0,4649	0,0704	-	-	0,1550	0,1629	1,0509
44,17	P33	0,0264	0,0372	1,4097	0,0016	0,0064	4,0000	0,0134	0,0267	2,0000	0,0785	-	-	0,0016	0,0064	4,0000
45,92	P34	-	-	-	0,0442	0,0323	0,7307	-	-	-	-	-	-	0,0442	0,0323	0,7307
46,67	Heneicosanoico	0,0261	0,0251	0,9635	0,1035	0,0727	0,7023	0,0222	0,0273	1,2258	0,0413	-	-	0,1035	0,0727	0,7023
46,94	P35	0,0483	0,0519	1,0751	0,0253	0,0521	2,0575	0,0304	0,0383	1,2592	0,1196	-	-	0,0253	0,0521	2,0575
47,60	Araquidonico	0,0773	0,0924	1,1948	0,2000	0,0873	0,4366	0,0416	0,0538	1,2918	0,2200	-	-	0,2000	0,0873	0,4366
49,46	Eicosapentaenoico	5,5533	2,0864	0,3757	1,9458	0,9353	0,4807	6,2060	1,7218	0,2774	2,9428	-	-	1,9458	0,9353	0,4807
51,78	Tricosanoico	0,0335	0,0459	1,3697	0,0366	0,0610	1,6688	0,0206	0,0411	2,0000	0,0852	-	-	0,0366	0,0610	1,6688
52,66	P36	0,0092	0,0206	2,2361	0,0075	0,0181	2,4165	-	-	-	0,0460	-	-	0,0075	0,0181	2,4165
53,58	Lignocerico	0,1407	0,0636	0,4522	0,0732	0,0450	0,6148	0,1568	0,0606	0,3863	0,0763	-	-	0,0732	0,0450	0,6148
54,25	Docosahexaenoico	0,0365	0,0817	2,2361	0,0734	0,0755	1,0294	-	-	-	0,1826	-	-	0,0734	0,0755	1,0294

[a] Etiqueta, L: Leche y FL: Fórmula láctea

[b] NOM-155-SCFI-2003, L: Leche, FL: Fórmula láctea y PLC: Producto lácteo combinado

Tabla B.2. Distancias Mahalanobis al cuadrado y probabilidad de clasificación en función de la etiqueta para los perfiles de ácidos grasos de las muestras individuales leche y productos similares.

Muestra	**Valores de Clasificación**	**Distancia Mahalanobis**		**Probabilidad de Clasificación**	
		FL	**L**	**FL p=0,1667**	**L p=0,8333**
Calibración					
A	FL	5,000	1178,701	1,00	0,00
B1	FL	5,000	1140,558	1,00	0,00
E	L	1083,969	2,973	0,00	1,00
F1	L	1285,431	5,689	0,00	1,00
G2	L	1082,329	2,126	0,00	1,00
H1	L	1225,408	1,518	0,00	1,00
I	L	1096,650	5,445	0,00	1,00
J1	L	1225,603	1,983	0,00	1,00
K2	L	1123,616	6,765	0,00	1,00
J2	L	1134,528	0,900	0,00	1,00
F3	L	1117,893	0,872	0,00	1,00
G3	L	1200,871	1,729	0,00	1,00
Validación Cruzada					
*C	FL	6360,29	2161,345	0,00	1,00
*D	FL	13315,85	6975,257	0,00	1,00
G1	L	1241,76	3,477	0,00	1,00
F2	L	1008,24	7,466	0,00	1,00
H2	L	1302,31	6,910	0,00	1,00
K1	L	847,40	30,767	0,00	1,00
K3	L	7026,10	2555,063	0,00	1,00
L	L	1108,26	1,441	0,00	1,00
B2	FL	2152,90	6372,516	1,00	0,00

* Clasificaciones incorrectas

Tabla B.3. Distancias Mahalanobis al cuadrado y probabilidad de clasificación en función de la etiqueta para los perfiles de ácidos grasos de las muestras individuales leche y productos similares.

Muestra	Valores de Clasificación	Distancia Mahalanobis			Probabilidad de Clasificación		
		FL	L	PLC	FL p=0,0833	L p=0,8333	PLC p=0,0833
Calibración							
A	PLC	4654,691	7564,406	0,000	0,000	0,000	1,000
C	FL	0,000	1348,201	4654,691	1,000	0,000	0,000
E	L	1400,116	8,100	7512,953	0,000	1,000	0,000
F1	L	1328,094	8,100	7753,773	0,000	1,000	0,000
G2	L	1387,747	8,100	7591,005	0,000	1,000	0,000
H1	L	1355,003	8,100	7585,889	0,000	1,000	0,000
I	L	1311,190	8,100	7635,000	0,000	1,000	0,000
J1	L	1524,438	8,100	7918,892	0,000	1,000	0,000
K2	L	1358,334	8,100	7575,131	0,000	1,000	0,000
J2	L	1315,068	8,100	7336,282	0,000	1,000	0,000
F3	L	1338,542	8,100	7379,636	0,000	1,000	0,000
G3	L	1244,477	8,100	7436,501	0,000	1,000	0,000
Validación Cruzada							
B1	PLC	5048,551	11415,187	4828,931	0,000	0,000	1,000
*D	PLC	105,304	1047,004	5164,068	1,000	0,000	0,000
G1	L	551,318	278,403	5577,334	0,000	1,000	0,000
F2	L	2222,923	147,362	8442,834	0,000	1,000	0,000
H2	L	2513,858	362,229	10421,246	0,000	1,000	0,000
K1	L	590,699	231,711	6901,344	0,000	1,000	0,000
K3	L	1356,353	32,094	7965,874	0,000	1,000	0,000
L	L	2328,306	134,910	8942,221	0,000	1,000	0,000
B2	PLC	4586,300	10061,031	2705,465	0,000	0,000	1,000

* Clasificaciones incorrectas

Tabla B.4 Perfil de ácidos grasos (FAMES) de leches adulteradas con grasas exógenas expresado en g 100 g^{-1} de ácidos grasos. Código de las muestras: MGxyz, donde x es la grasa, y el nivel y z la repetición.

TR	Ácido graso	MGT			MGA1			MGA2			MGA3			MGA4			MGB1		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
8,62	P1																8,270	3,211	0,388
9,55	Butírico	1,124	0,752	0,669													0,343	0,101	0,295
11,34	Hexanoico	1,262	0,142	0,112	1,242	0,049	0,039	0,897	0,133	0,148	0,597	0,098	0,164	0,333	0,017	0,052	0,904	0,051	0,057
11,75	P2	0,094	0,010	0,105															
12,58	Octanoico	1,002	0,096	0,096	3,115	0,566	0,182	4,266	0,125	0,029	5,798	0,070	0,012	7,308	0,156	0,021	0,705	0,027	0,038
12,86	P3	0,070	0,001	0,017															
13,12	Nonanoico	0,027	0,008	0,286	0,020	0,001	0,063	0,018	0,001	0,050	0,014	0,001	0,105				0,017	0,003	0,181
13,65	Decanoico	2,241	0,152	0,068	3,560	0,320	0,090	4,187	0,113	0,027	4,903	0,069	0,014	5,748	0,066	0,011	1,601	0,082	0,051
13,93	4-decenoico	0,369	0,016	0,044	0,168	0,017	0,102	0,119	0,003	0,028	0,059	0,004	0,062				0,159	0,009	0,058
14,23	Undecanoico	0,056	0,003	0,048	0,039	0,001	0,024	0,036	0,002	0,057	0,031	0,001	0,033	0,026	0,000	0,018	0,028	0,002	0,083
14,90	Laurico	2,609	0,114	0,044	17,183	3,661	0,213	25,818	0,721	0,028	35,92	0,221	0,006	46,84	0,084	0,002	1,863	0,114	0,061
14,98	P4																		
15,15	Ciclopropanononanoico?	0,059	0,004	0,076	0,042	0,004	0,106	0,031	0,001	0,032	0,015	0,000	0,006				0,044	0,005	0,125
15,26	P5	0,172	0,007	0,041															
15,34	10-metil dodecanoico?	0,111	0,004	0,034	0,080	0,009	0,114	0,061	0,003	0,042	0,032	0,005	0,166	0,006	0,002	0,345	0,080	0,009	0,111
15,72	Tridecanoico	0,085	0,003	0,032	0,070	0,004	0,054	0,059	0,001	0,023	0,047	0,002	0,039	0,033	0,001	0,035	0,058	0,004	0,062
16,24	Isomero de c 14	0,117	0,003	0,024	0,091	0,010	0,105	0,064	0,003	0,041	0,031	0,003	0,100				0,086	0,003	0,040
16,57	P6	0,031	0,002	0,078															
16,74	Tetradecanoico	8,590	0,212	0,025	12,334	0,601	0,049	13,901	0,401	0,029	15,75	0,183	0,012	17,85	0,111	0,006	6,276	0,241	0,038
17,31	Miristoleico	1,310	0,040	0,030	0,565	0,065	0,115	0,403	0,012	0,029	0,201	0,006	0,031				0,543	0,024	0,044
17,41	9-metil tetradecanoico	0,270	0,006	0,021	0,198	0,026	0,130	0,136	0,007	0,052	0,069	0,001	0,012				0,191	0,008	0,041
17,66	12-metil tetradecanoico	0,478	0,011	0,023	0,360	0,045	0,124	0,256	0,007	0,026	0,128	0,002	0,013				0,352	0,014	0,039
17,93	P8	0,054	0,007	0,123															
18,07	Pentadecanoico	0,919	0,020	0,021	0,689	0,085	0,123	0,492	0,008	0,016	0,250	0,002	0,008	0,015	0,002	0,106	0,672	0,019	0,028
18,30	P9	0,065	0,008	0,122	0,032	0,003	0,102	0,025	0,002	0,093							0,038	0,001	0,020
18,78	P10	0,049	0,006	0,130															
18,95	14-metil pentadecanoico	0,265	0,009	0,034	0,195	0,025	0,129	0,142	0,004	0,031	0,068	0,002	0,024				0,192	0,006	0,033

Tabla B.4 Continuación...

TR	Ácido graso	MGT			MGA1			MGA2			MGA3			MGA4			MGB1		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
19,83	Palmitico	24,936	0,587	0,024	21,658	1,779	0,082	17,930	0,425	0,024	13,70	0,280	0,020	9,393	0,116	0,012	20,814	0,539	0,026
20,27	P11																0,036	0,000	0,003
20,40	7-hexadecenoico	0,155	0,003	0,018	0,143	0,021	0,148	0,088	0,009	0,101	0,048	0,000	0,001				0,134	0,009	0,070
20,59	Palmitoleico	1,257	0,030	0,023	0,949	0,120	0,127	0,675	0,009	0,013	0,343	0,008	0,024	0,022	0,002	0,108	0,946	0,033	0,035
20,81	P12	1,569	0,093	0,060													0,019	0,016	0,868
21,17	14-metil hexadecanoico	0,477	0,036	0,075	0,295	0,025	0,086	0,257	0,020	0,078	0,136	0,002	0,016				0,366	0,019	0,051
22,41	15-metil hexadecanoico	0,412	0,025	0,062	0,355	0,042	0,118	0,239	0,010	0,043	0,123	0,018	0,150				0,333	0,019	0,057
23,13	P13																		
24,93	Heptadecanoico	0,537	0,063	0,118	0,403	0,065	0,162	0,283	0,015	0,052	0,159	0,033	0,210				0,413	0,017	0,041
27,75	15-metil hexadecanoico																		
32,71	Octadecanoico	11,106	0,416	0,037	9,390	0,850	0,091	7,838	0,088	0,011	6,180	0,295	0,048	4,413	0,070	0,016	9,138	0,375	0,041
33,22	Elaidico	3,262	0,514	0,157	2,294	0,201	0,088	2,181	0,672	0,308	1,561	0,469	0,301	1,132	0,082	0,073	2,945	0,805	0,273
33,32	7-octadecenoico	3,850	2,381	0,618	1,712	0,065	0,038	2,069	0,917	0,443	1,182	0,234	0,198				1,645	0,222	0,135
33,47	Cis-6-petroselinico	0,298	0,045	0,152	0,230	0,028	0,124	0,150	0,024	0,160	0,058	0,010	0,177				0,216	0,037	0,169
33,71	Oleico	21,998	0,762	0,035	17,519	1,658	0,095	13,989	0,139	0,010	9,897	0,190	0,019	5,348	0,017	0,003	21,136	1,070	0,051
34,01	Cis-vaccenico	0,863	0,017	0,020	0,638	0,048	0,076	0,486	0,015	0,031	0,268	0,030	0,112	0,065	0,021	0,323	0,924	0,049	0,053
34,30	12-octadecenoico	0,855	0,041	0,048	0,212	0,007	0,032	0,168	0,011	0,065	0,074	0,023	0,313				0,262	0,023	0,087
34,52	Linoelaidico	0,115	0,014	0,120	0,049	0,011	0,224	0,134	0,157	1,172	0,157	0,011	0,070				0,081	0,015	0,184
34,80	P14	0,658	0,055	0,083	0,482	0,055	0,113	0,256	0,113	0,442							0,468	0,024	0,052
35,09	11-metil-octadecanoico	0,074	0,026	0,357	0,047	0,006	0,126	0,033	0,005	0,148							0,042	0,002	0,058
35,26	P15	0,105	0,035	0,336	0,082	0,042	0,514	0,078	0,046	0,595									
35,44	P16	1,914	0,127	0,066	0,138	0,060	0,438	0,122	0,064	0,529	0,120	0,038	0,319	0,057	0,004	0,072			
35,90	Linoleico	2,599	0,092	0,035	2,367	0,076	0,032	1,995	0,082	0,041	1,705	0,046	0,027	1,282	0,051	0,040	15,250	0,934	0,061
36,52	P18																		
36,97	Nonadecanoico																		
37,96	P19	0,184	0,021	0,116													0,187	0,023	0,125
38,22	P20	0,074	0,008	0,104	0,053	0,012	0,223	0,042	0,001	0,019							0,032	0,028	0,866
38,86	P21																		
39,04	P22																0,143	0,022	0,152

Tabla B.4 Continuación...

TR	Ácido graso	MGT			MGA1			MGA2			MGA3			MGA4			MGB1		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
39,21	Linolenico	0,394	0,022	0,055	0,287	0,022	0,077	0,210	0,013	0,062	0,108	0,007	0,066				1,809	0,139	0,077
40,88	P23	0,614	0,027	0,045	0,365	0,072	0,196	0,289	0,011	0,038	0,132	0,007	0,057				0,445	0,030	0,068
42,02	P24																		
42,61	Araquidico	0,160	0,014	0,085	0,148	0,006	0,043	0,132	0,013	0,099	0,121	0,005	0,041	0,092	0,006	0,063	0,209	0,034	0,162
42,88	P25																		
43,66	P26																		
43,66	Eicosenoico	0,158	0,022	0,141	0,051	0,007	0,134	0,050	0,008	0,165	0,039	0,001	0,026	0,042	0,013	0,317	0,084	0,008	0,091
44,94	P27																		
45,80	P28																		
46,00	P29																		
47,01	Heneicosanoico	0,128	0,008	0,061	0,079	0,011	0,134	0,057	0,005	0,089	0,027	0,002	0,065				0,077	0,005	0,064
47,03	P30																		
47,60	Araquidonico	0,194	0,008	0,039	0,132	0,018	0,138	0,091	0,013	0,142	0,044	0,000	0,002				0,142	0,016	0,112
48,93	P31																		
49,51	Eicosapentaenoico																		
49,51	Docosanoico																		
51,78	Tricosanoico																		
52,36	P32																		
53,60	Lignocerico																		
53,93	Cis-()-docosahexaenoico																		

Tabla B.4 Continuación...

TR	Ácido graso	MGB2			MGB3			MGC1			MGC2			MGC3		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
8,62	P1	9,976	3,775	0,378	5,906	2,090	0,354	6,136	2,179	0,355	6,027	0,643	0,107	6,809	2,053	0,302
9,55	Butírico							0,757	0,220	0,290						
11,34	Hexanoico	0,575	0,105	0,183	0,235	0,027	0,116	1,115	0,015	0,014	0,523	0,044	0,083	0,233	0,035	0,150
11,75	P2															
12,58	Octanoico	0,517	0,075	0,144	0,223	0,014	0,065	0,785	0,025	0,032	0,396	0,140	0,355	0,246	0,023	0,093
12,86	P3							0,032	0,018	0,567						
13,12	Nonanoico							0,021	0,002	0,105	0,012	0,001	0,075			
13,65	Decanoico	1,175	0,173	0,147	0,529	0,021	0,040	1,761	0,062	0,035	0,904	0,366	0,404	0,577	0,067	0,117
13,93	4-decenoico	0,117	0,016	0,135	0,053	0,002	0,033	0,175	0,007	0,042	0,108	0,007	0,066	0,057	0,008	0,132
14,23	Undecanoico	0,021	0,002	0,077				0,031	0,002	0,062	0,021	0,001	0,063	0,013	0,000	0,032
14,90	Laurico	1,383	0,178	0,129	0,632	0,047	0,074	2,046	0,079	0,038	1,081	0,445	0,411	0,729	0,046	0,063
14,98	P4	0,067	0,002	0,030	0,030	0,024	0,805									
15,15	Ciclopropanononanoico ?	0,031	0,003	0,095	0,021	0,006	0,290	0,046	0,002	0,043	0,038	0,014	0,373	0,017	0,000	0,022
15,26	P5							0,086	0,003	0,038	0,050	0,025	0,506	0,032	0,003	0,100
15,34	10-metil dodecanoico ?	0,059	0,009	0,157				0,007	0,002	0,245						
15,72	Tridecanoico	0,041	0,008	0,185	0,023	0,004	0,176	0,062	0,002	0,038	0,034	0,011	0,315	0,020	0,003	0,153
16,24	Isomero de c 14	0,064	0,010	0,160	0,028	0,003	0,111	0,094	0,004	0,042	0,058	0,027	0,470	0,032	0,004	0,126
16,57	P6															
16,74	Tetradecanoico	4,645	0,804	0,173	2,145	0,097	0,045	6,764	0,218	0,032	3,610	1,217	0,337	2,303	0,238	0,104
17,31	Miristoleico	0,392	0,062	0,158	0,176	0,011	0,065	0,585	0,022	0,037	0,382	0,029	0,075	0,196	0,019	0,097
17,41	9-metil tetradecanoico	0,138	0,024	0,173	0,060	0,001	0,018	0,201	0,005	0,026	0,106	0,029	0,272	0,069	0,006	0,090
17,66	12-metil tetradecanoico	0,254	0,041	0,160	0,112	0,007	0,063	0,375	0,014	0,036	0,203	0,062	0,307	0,124	0,013	0,103
17,93	P8															
18,07	Pentadecanoico	0,499	0,092	0,185	0,234	0,010	0,043	0,717	0,022	0,030	0,465	0,010	0,022	0,260	0,023	0,089
18,30	P9	0,038	0,007	0,182				0,036	0,003	0,082	0,098	0,145	1,472	0,028	0,006	0,225
18,78	P10															
18,95	14-metil pentadecanoico	0,143	0,024	0,168	0,065	0,005	0,084	0,204	0,009	0,043	0,118	0,033	0,278	0,072	0,006	0,082
19,83	Palmitico	19,068	3,673	0,193	13,772	0,124	0,009	20,565	0,618	0,030	12,62	3,396	0,269	10,10	1,041	0,103
20,27	P11	0,025	0,006	0,234				0,038	0,001	0,031	0,019	0,010	0,501			

Tabla B.4 Continuación...

TR	Ácido graso	MGB2			MGB3			MGC1			MGC2			MGC3		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
20,40	7-hexadecenoico	0,104	0,020	0,193	0,050	0,002	0,039	0,159	0,009	0,058	0,085	0,021	0,246	0,073	0,012	0,163
20,59	Palmitoleico	0,544	0,351	0,645	0,354	0,017	0,049	1,039	0,039	0,038	0,626	0,175	0,279	0,486	0,050	0,103
20,81	P12	0,027	0,000	0,018				0,025	0,002	0,085				0,023	0,004	0,192
21,17	14-metil hexadecanoico	0,297	0,052	0,175	0,104	0,014	0,135	0,350	0,037	0,106	0,227	0,059	0,261	0,134	0,015	0,111
22,41	15-metil hexadecanoico	0,238	0,071	0,299	0,109	0,002	0,015	0,362	0,026	0,071	0,195	0,050	0,256	0,128	0,008	0,059
23,13	P13													0,048	0,001	0,028
24,93	Heptadecanoico	0,326	0,063	0,193	0,188	0,005	0,028	0,454	0,026	0,058	0,308	0,016	0,053	0,186	0,023	0,123
27,75	15-metil hexadecanoico							0,175	0,012	0,071				0,108	0,019	0,176
32,71	Octadecanoico	8,211	1,651	0,201	5,671	0,285	0,050	8,868	0,307	0,035	6,380	0,056	0,009	4,435	0,448	0,101
33,22	Elaidico	1,600	0,490	0,306	1,212	0,103	0,085	2,349	0,503	0,214	1,844	0,541	0,293	1,110	0,018	0,017
33,32	7-octadecenoico	1,082	0,332	0,307	1,342	0,135	0,100				0,494	0,699	1,414	1,238	0,337	0,272
33,47	Cis-6-petroselinico	0,162	0,027	0,166	0,052	0,003	0,054	0,120	0,141	1,169	0,142	0,002	0,016	0,062	0,011	0,171
33,71	Oleico	22,672	4,092	0,180	20,041	0,427	0,021	29,456	0,179	0,006	36,42	1,933	0,053	45,94	4,907	0,107
34,01	Cis-vaccenico	1,104	0,201	0,182	1,048	0,098	0,093	1,278	0,196	0,153	1,941	0,080	0,041	2,663	0,298	0,112
34,30	12-octadecenoico	0,196	0,032	0,164	0,116	0,021	0,185	0,211	0,134	0,636	0,288	0,011	0,037	0,360	0,032	0,090
34,52	Linoelaidico	0,164	0,121	0,738	0,054	0,011	0,210	0,045	0,008	0,180				0,181	0,082	0,452
34,80	P14	0,378	0,049	0,128	0,146	0,008	0,055	0,443	0,076	0,171				0,181	0,067	0,369
35,09	11-metil-octadecanoico							0,043	0,005	0,127						
35,26	P15															
35,44	P16							0,200	0,005	0,027	0,158	0,120	0,760	0,244	0,042	0,172
35,90	Linoleico	26,982	1,677	0,062	40,049	0,340	0,008	7,583	0,363	0,048	8,775	5,353	0,610	16,58	0,708	0,043
36,52	P18															
36,97	Nonadecanoico															
37,96	P19	0,361	0,068	0,189	0,518	0,050	0,097	0,232	0,022	0,093	0,481	0,020	0,042	0,663	0,078	0,118
38,22	P20							0,070	0,009	0,124	0,361	0,591	1,637			
38,86	P21				0,041	0,005	0,133	0,027	0,006	0,220	0,055	0,002	0,038	0,073	0,014	0,196
39,04	P22	0,293	0,048	0,166	0,350	0,023	0,065	0,102	0,088	0,871	0,324	0,004	0,013	0,470	0,057	0,120
39,21	Linolenico	3,556	0,636	0,179	4,504	0,112	0,025	2,435	0,149	0,061	4,182	0,214	0,051	6,272	0,676	0,108
40,88	P23	0,308	0,026	0,084	0,120	0,030	0,252	0,381	0,010	0,027	0,268	0,046	0,173	0,168	0,032	0,192

Tabla B.4 Continuación...

TR	Ácido graso	MGB2			MGB3			MGC1			MGC2			MGC3		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
42,02	P24															
42,61	Araquidico	0,262	0,053	0,204	0,275	0,025	0,090	0,261	0,010	0,038	0,335	0,081	0,243	0,496	0,061	0,123
42,88	P25															
43,66	P26							0,084	0,004	0,047	0,075	0,026	0,342	0,031	0,001	0,029
43,66	Eicosenoico	0,131	0,027	0,202	0,150	0,012	0,083	0,373	0,023	0,062	0,599	0,094	0,156	1,040	0,118	0,114
44,94	P27															
45,80	P28							0,050	0,017	0,348				0,062	0,018	0,290
46,00	P29	0,046	0,022	0,479	0,026	0,023	0,894	0,051	0,004	0,079	0,067	0,001	0,013	0,072	0,005	0,065
47,01	Heneicosanoico	0,059	0,017	0,293				0,086	0,002	0,019				0,031	0,009	0,285
47,03	P30															
47,60	Araquidonico	0,104	0,015	0,147				0,136	0,004	0,027	0,072	0,019	0,263	0,043	0,007	0,153
48,93	P31															
49,51	Eicosapentaenoico							1,820	0,028	0,016						
49,51	Docosanoico	0,269	0,066	0,246	0,322	0,017	0,053				0,132	0,119	0,904	0,361	0,053	0,147
51,78	Tricosanoico				0,034	0,004	0,114	0,043	0,011	0,255	0,065	0,016	0,253	0,112	0,008	0,074
52,36	P32															
53,60	Lignocerico	0,085	0,026	0,303	0,082	0,009	0,112									
53,93	Cis-()-docosahexaenoico							0,046	0,011	0,234				0,127	0,019	0,148

Tabla B.4 Continuación...

TR	Ácido graso	MGC4			MGD1			MGD2			MGD3			MGD4		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
8,62	P1	6,347	0,024	0,004	6,555	0,621	0,095	5,911	2,913	0,493	4,235	2,755	0,651	5,055	0,258	0,051
9,55	Butírico				1,338	0,158	0,118	0,669	0,117	0,175				1,154	0,304	0,263
11,34	Hexanoico				1,517	0,064	0,042	1,468	0,090	0,061	1,534	0,063	0,041	1,808	0,106	0,058
11,75	P2															
12,58	Octanoico				1,075	0,030	0,028	1,093	0,083	0,076	1,248	0,049	0,039	1,320	0,053	0,040
12,86	P3															
13,12	Nonanoico				0,027	0,002	0,092	0,030	0,001	0,035	0,038	0,003	0,070	0,041	0,002	0,052
13,65	Decanoico				2,427	0,073	0,030	2,600	0,220	0,085	2,957	0,095	0,032	3,174	0,082	0,026
13,93	4-decenoico				0,219	0,009	0,040	0,216	0,019	0,089	0,349	0,109	0,312	0,231	0,006	0,026
14,23	Undecanoico				0,048	0,001	0,026	0,056	0,004	0,068	0,079	0,012	0,149	0,075	0,002	0,021
14,90	Laurico	0,019	0,000	0,011	2,837	0,114	0,040	3,089	0,196	0,063	3,418	0,108	0,032	3,688	0,048	0,013
14,98	P4															
15,15	Ciclopropanononanoico?				0,055	0,003	0,056	0,060	0,001	0,024	0,056	0,003	0,055	0,057	0,000	0,004
15,26	P5															
15,34	10-metil dodecanoico?				0,105	0,007	0,067	0,092	0,035	0,376	0,175	0,061	0,349	0,114	0,002	0,020
15,72	Tridecanoico				0,084	0,003	0,038	0,096	0,012	0,122	0,107	0,004	0,038	0,109	0,001	0,010
16,24	Isomero de c 14				0,112	0,004	0,040	0,101	0,003	0,034	0,096	0,001	0,011	0,090	0,000	0,004
16,57	P6															
16,74	Tetradecanoico	0,062	0,001	0,017	9,027	0,312	0,035	9,588	0,528	0,055	10,19	0,389	0,038	10,52	0,069	0,007
17,31	Miristoleico				0,702	0,023	0,033	0,650	0,025	0,039	0,869	0,357	0,411	0,575	0,004	0,007
17,41	9-metil tetradecanoico				0,264	0,006	0,021	0,263	0,010	0,036	0,271	0,009	0,034	0,269	0,001	0,003
17,66	12-metil tetradecanoico				0,474	0,011	0,023	0,466	0,019	0,040	0,456	0,012	0,026	0,453	0,003	0,007
17,93	P8															
18,07	Pentadecanoico	0,020	0,001	0,042	0,952	0,021	0,022	1,000	0,045	0,045	1,055	0,030	0,029	1,075	0,007	0,007
18,30	P9	0,023	0,003	0,119	0,035	0,013	0,381	0,042	0,005	0,111	0,064	0,019	0,294	0,042	0,006	0,140
18,78	P10															
18,95	14-metil pentadecanoico				0,246	0,006	0,023	0,230	0,008	0,036	0,213	0,006	0,028	0,195	0,003	0,015
19,83	Palmitico	4,427	0,023	0,005	25,370	0,175	0,007	25,636	1,138	0,044	26,12	0,553	0,021	25,75	0,168	0,007
20,27	P11				0,066	0,006	0,093	0,087	0,005	0,062	0,100	0,007	0,067	0,124	0,001	0,011

Tabla B.4 Continuación...

TR	Ácido graso	MGC4			MGD1			MGD2			MGD3			MGD4		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
20,40	7-hexadecenoico	0,032	0,002	0,054	0,188	0,008	0,044	0,185	0,005	0,028	0,152	0,026	0,173	0,194	0,000	0,002
20,59	Palmitoleico	0,204	0,002	0,011	1,203	0,023	0,019	1,124	0,027	0,024	1,050	0,035	0,033	0,995	0,005	0,005
20,81	P12	0,020	0,003	0,144	0,030	0,004	0,139				1,508	0,232	0,154			
21,17	14-metil hexadecanoico				0,482	0,036	0,076	0,461	0,066	0,144	0,499	0,049	0,099	0,454	0,011	0,023
22,41	15-metil hexadecanoico				0,470	0,011	0,023	0,440	0,013	0,030	0,427	0,029	0,068	0,397	0,014	0,036
23,13	P13	0,065	0,007	0,110												
24,93	Heptadecanoico	0,052	0,001	0,028	0,560	0,023	0,041	0,566	0,015	0,026	0,551	0,033	0,059	0,546	0,029	0,054
27,75	15-metil hexadecanoico				0,190	0,019	0,099	0,179	0,006	0,033				0,158	0,027	0,171
32,71	Octadecanoico	1,890	0,007	0,003	11,075	0,204	0,018	11,234	0,525	0,047	11,47	0,287	0,025	11,07	0,089	0,008
33,22	Elaidico				2,875	0,498	0,173	3,118	0,045	0,014	3,544	1,825	0,515	2,779	0,157	0,056
33,32	7-octadecenoico				2,568	0,044	0,017	2,528	0,279	0,110	2,021	1,751	0,866	3,082	0,191	0,062
33,47	Cis-6-petroselinico				0,396	0,021	0,052	0,493	0,016	0,032	0,563	0,037	0,066	0,628	0,007	0,011
33,71	Oleico	51,110	0,169	0,003	20,165	0,392	0,019	18,454	0,412	0,022	16,70	0,818	0,049	14,85	0,138	0,009
34,01	Cis-vaccenico	2,681	0,032	0,012	0,756	0,086	0,114	0,797	0,023	0,029	0,675	0,089	0,133	0,648	0,057	0,088
34,30	12-octadecenoico				0,192	0,084	0,436	0,227	0,008	0,034	0,463	0,338	0,729	0,096	0,052	0,540
34,52	Linoelaidico				0,074	0,010	0,138	0,068	0,008	0,110	0,085	0,001	0,014	0,093	0,006	0,064
34,80	P14				0,739	0,014	0,018	0,822	0,026	0,032	0,938	0,048	0,051	0,988	0,031	0,032
35,09	11-metil-octadecanoico				0,071	0,012	0,162	0,072	0,008	0,108	0,080	0,009	0,110	0,092	0,008	0,089
35,26	P15				0,142	0,020	0,138	0,102	0,038	0,372	0,143	0,080	0,559	0,090	0,044	0,488
35,44	P16	0,249	0,009	0,036				0,103	0,034	0,326	1,189	0,185	0,155			
35,90	Linoleico	20,560	0,091	0,004	2,377	0,080	0,033	2,020	0,114	0,056	1,550	0,031	0,020	1,375	0,030	0,022
36,52	P18				0,049	0,011	0,222	0,050	0,005	0,098				0,058	0,004	0,067
36,97	Nonadecanoico				0,091	0,025	0,278	0,080	0,004	0,052				0,075	0,001	0,019
37,96	P19	0,859	0,009	0,011										0,018	0,008	0,409
38,22	P20				0,080	0,012	0,149	0,051	0,009	0,185				0,108	0,016	0,151
38,86	P21	0,078	0,014	0,175												
39,04	P22	0,616	0,010	0,016												
39,21	Linolenico	7,847	0,028	0,004	0,476	0,029	0,061	0,592	0,031	0,053	0,722	0,070	0,096	0,777	0,013	0,017
40,88	P23				0,601	0,053	0,089	0,693	0,011	0,016	0,815	0,083	0,102	0,798	0,020	0,025

Tabla B.4 Continuación...

TR	Ácido graso	MGC4			MGD1			MGD2			MGD3			MGD4		
		$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV	$\overline{X}$	σ	CV
42,02	P24													0,050	0,008	0,159
42,61	Araquidico	0,584	0,007	0,013	0,167	0,009	0,052	0,163	0,016	0,096	0,171	0,024	0,139	0,156	0,003	0,019
42,88	P25													0,024	0,004	0,174
43,66	P26				0,123	0,013	0,106	0,120	0,010	0,085	0,082	0,025	0,299	0,065	0,010	0,160
43,66	Eicosenoico	1,327	0,009	0,007	0,047	0,010	0,215	0,071	0,056	0,797	0,112	0,070	0,631	0,117	0,008	0,070
44,94	P27	0,050	0,001	0,018												
45,80	P28	0,062	0,002	0,029												
46,00	P29	0,076	0,001	0,013												
47,01	Heneicosanoico				0,088	0,001	0,013	0,049	0,023	0,477	0,060	0,018	0,294	0,022	0,002	0,113
47,03	P30													0,031	0,003	0,106
47,60	Araquidonico				0,153	0,013	0,084	0,124	0,007	0,060	0,089	0,011	0,124	0,056	0,003	0,056
48,93	P31													0,044	0,008	0,178
49,51	Eicosapentaenoico							1,896	0,315	0,166	1,855	0,139	0,075	2,068	0,013	0,006
49,51	Docosanoico	0,421	0,005	0,012												
51,78	Tricosanoico	0,137	0,002	0,013												
52,36	P32										0,939	0,073	0,078	1,002	0,077	0,076
53,60	Lignocerico				0,096	0,014	0,146				0,107	0,084	0,786	0,046	0,012	0,263
53,93	Cis-()-docosahexaenoico	0,154	0,008	0,049										0,105	0,006	0,054

Anexo C. Queso Camembert

Tabla C.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de corazón (C) y subcorteza (SC) de queso Camembert y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$).

Tabla C.2. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros Suspensión Desgrasada de Queso Camembert (DCS) y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$)

Tabla C.3. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de Grasa purificada (PF), Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), Caseína (CN) y Nitrógeno soluble (NS-EtOH) e Insoluble (NI-EtOH) en Etanol y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$)

Tabla C.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de corazón (C) y subcorteza (SC) de queso Camembert y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) (p≤0,05)

BANDAS	CS	P value		DÍAS DE MADURACIÓN												
		DÍA	LOTE	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d10	d13	d15	d17	d20	d27
978 cm^{-1}	C	**0,037***	0,607	0,00022 ^{ab}	0,00025 ^{ab}	0,00022 ^{ab}	0,00025 ^{ab}	0,00029 ^{ab}	0,00021 ^{ab}	0,00027 ^{ab}	0,00015 ^{a}	0,00023 ^{ab}	0,00029 ^{ab}	0,00029 ^{ab}	0,00028 ^{ab}	0,00034 ^{b}	0,00073 ^{c}
(NA)	SC	**0,000***	0,542	0,00025 ^{a}	0,00030 ^{ab}	0,00025 ^{a}	0,00027 ^{a}	0,00026 ^{ab}	0,00019 ^{a}	0,00020 ^{a}	0,00025 ^{a}	0,00021 ^{a}	0,00031 ^{ab}	0,00021 ^{a}	0,00025 ^{a}	0,00042 ^{b}	0,00099 ^{c}
1045 cm^{-1}	C	0,057	0,260	0,00166 ^{c}	0,00159 ^{c}	0,00143 ^{bc}	0,00157 ^{c}	0,00149 ^{bc}	0,00138 ^{bc}	0,00136 ^{bc}	0,00115 ^{abc}	0,00094 ^{ab}	0,00101 ^{abc}	0,00101 ^{ab}	0,00116 ^{abc}	0,00082 ^{a}	0,00066 ^{a}
(Lactosa + ms)	SC	**0,001***	0,067	0,00195 ^{g}	0,00149 ^{ef}	0,00146 ^{ef}	0,00141 ^{def}	0,00169 ^{fg}	0,0012 ^{cdef}	0,0012 ^{cdef}	0,0010 ^{bcd}	0,00079 ^{ab}	0,0011 ^{bcde}	0,00060 ^{a}	0,00084 ^{abc}	0,00073 ^{ab}	0,0006 ^{ab}
1082 cm^{-1}	C	**0,008***	0,183	0,00258 ^{e}	0,00260 ^{e}	0,00241 ^{de}	0,00252 ^{de}	0,00245 ^{de}	0,00231 ^{cde}	0,00230 ^{cde}	0,0021 ^{bcd}	0,00189 ^{ab}	0,00186 ^{abc}	0,00187 ^{ab}	0,002 ^{abcde}	0,00177 ^{ab}	0,00162 ^{a}
(Lactosa)	SC	**0,005***	0,280	0,00278 ^{g}	0,00240 ^{def}	0,00245 ^{ef}	0,00238 ^{def}	0,00257 ^{ef}	0,00230 ^{cde}	0,0022 ^{bcde}	0,0020 ^{abcd}	0,00175 ^{ab}	0,002 ^{abcde}	0,00159 ^{a}	0,00178 ^{ab}	0,00175 ^{ab}	0,0018 ^{bc}
1095 cm^{-1}	C	**0,002***	0,239	0,0025 ^{cdef}	0,00278 ^{f}	0,00264 ^{ef}	0,00258 ^{def}	0,003 ^{bcdef}	0,0025 ^{bcde}	0,00265 ^{ef}	0,0025 ^{bcde}	0,0025 ^{bcde}	0,0023 ^{bcd}	0,00226 ^{b}	0,003 ^{bcdef}	0,00231 ^{bc}	0,00170 ^{a}
(Lactosa)	SC	**0,013***	0,377	0,00253 ^{bc}	0,00249 ^{bc}	0,00268 ^{c}	0,00260 ^{c}	0,0025 ^{abc}	0,00277 ^{c}	0,00251 ^{bc}	0,00251 ^{bc}	0,00223 ^{ab}	0,00240 ^{abc}	0,00205 ^{a}	0,00213 ^{a}	0,00209 ^{a}	0,00197 ^{a}
1115 cm^{-1}	C	**0,001***	0,156	0,00241 ^{def}	0,00262 ^{f}	0,00249 ^{ef}	0,00246 ^{ef}	0,00249 ^{def}	0,00237 ^{cde}	0,00254 ^{ef}	0,0024 ^{cdef}	0,00241 ^{def}	0,00209 ^{bc}	0,0022 ^{bcd}	0,0023 ^{bcde}	0,00212 ^{b}	0,00142 ^{a}
(Lactato)	SC	**0,000***	0,334	0,00242 ^{def}	0,00238 ^{de}	0,00257 ^{ef}	0,00253 ^{ef}	0,00243 ^{def}	0,00267 ^{f}	0,00245 ^{def}	0,00244 ^{def}	0,00207 ^{bc}	0,00217 ^{cd}	0,00187 ^{abc}	0,00190 ^{abc}	0,00180 ^{ab}	0,00164 ^{a}
1161 cm^{-1}	C	0,170	0,834	0,00360 ^{b}	0,00408 ^{b}	0,00404 ^{b}	0,00377 ^{b}	0,00386 ^{b}	0,00377 ^{b}	0,00418 ^{b}	0,00402 ^{b}	0,00421 ^{b}	0,00362 ^{b}	0,00344 ^{b}	0,00375 ^{b}	0,00367 ^{b}	0,00172 ^{a}
(Lactosa + ms)	SC	**0,001***	0,119	0,00328 ^{bc}	0,00355 ^{cd}	0,00409 ^{de}	0,00395 ^{de}	0,0035 ^{bcd}	0,00452 ^{e}	0,00410 ^{de}	0,00412 ^{de}	0,00356 ^{cd}	0,0035 ^{bcd}	0,00314 ^{bc}	0,00315 ^{bc}	0,00281 ^{b}	0,0017 ^{a}
1315 cm^{-1}	C	0,268	0,474	0,00098 ^{bc}	0,00101 ^{bc}	0,00095 ^{abc}	0,00100 ^{bc}	0,00099 ^{abc}	0,00102 ^{c}	0,00101 ^{bc}	0,00099 ^{bc}	0,00099 ^{bc}	0,00090 ^{abc}	0,00084 ^{abc}	0,0009 ^{abc}	0,00081 ^{ab}	0,00071 ^{a}
(Amida III?)	SC	**0,049***	0,495	0,00102 ^{c}	0,00093 ^{abc}	0,00101 ^{c}	0,00103 ^{c}	0,00098 ^{abc}	0,00097 ^{bc}	0,00102 ^{c}	0,00100 ^{c}	0,00088 ^{abc}	0,00082 ^{abc}	0,00076 ^{a}	0,00074 ^{a}	0,00079 ^{ab}	0,0007 ^{ab}
1377 cm^{-1}	C	0,154	0,834	0,00126 ^{b}	0,00136 ^{b}	0,00129 ^{b}	0,00129 ^{b}	0,00129 ^{b}	0,00134 ^{b}	0,00138 ^{b}	0,00134 ^{b}	0,00134 ^{b}	0,00128 ^{b}	0,00116 ^{b}	0,00121 ^{b}	0,00116 ^{b}	0,00078 ^{a}
(ms)	SC	**0,013***	0,373	0,00124 ^{bc}	0,00119 ^{bc}	0,0014 ^{b}	0,00139 ^{b}	0,00124 ^{bc}	0,00138 ^{b}	0,00139 ^{b}	0,00138 ^{b}	0,00138 ^{b}	0,00112 ^{abc}	0,00107 ^{ab}	0,00101 ^{ab}	0,00102 ^{ab}	0,00086 ^{a}
1402 cm^{-1}	C	**0,012***	0,731	0,00100 ^{a}	0,00097 ^{a}	0,00089 ^{a}	0,00094 ^{a}	0,00093 ^{a}	0,00097 ^{a}	0,00090 ^{a}	0,00092 ^{a}	0,00095 ^{a}	0,00099 ^{a}	0,00097 ^{a}	0,00107 ^{a}	0,00107 ^{a}	0,00167 ^{b}
(-COO-)	SC	**0,002***	0,189	0,0011 ^{abcd}	0,00087 ^{ab}	0,00092 ^{ab}	0,00095 ^{abc}	0,0010 ^{abcd}	0,00083 ^{a}	0,00091 ^{ab}	0,00094 ^{abc}	0,0011 ^{bcd}	0,0010 ^{abcd}	0,00120 ^{d}	0,00117 ^{cd}	0,00148 ^{e}	0,00171 ^{e}
1549 cm^{-1}	C	**0,019***	0,327	0,00240 ^{a}	0,00203 ^{a}	0,00191 ^{a}	0,00205 ^{a}	0,00198 ^{a}	0,00196 ^{a}	0,00162 ^{a}	0,00186 ^{a}	0,00168 ^{a}	0,00195 ^{a}	0,00215 ^{a}	0,00264 ^{a}	0,0025 ^{a}	0,00536 ^{b}
(Amida II)	SC	**0,000***	**0,043***	0,00239 ^{bc}	0,00189 ^{ab}	0,00168 ^{ab}	0,00172 ^{ab}	0,00209 ^{abc}	0,00144 ^{a}	0,00165 ^{ab}	0,00179 ^{ab}	0,00304 ^{cde}	0,0024 ^{abcd}	0,00355 ^{ef}	0,00337 ^{de}	0,00429 ^{fg}	0,00510 ^{g}
1649 cm^{-1}	C	0,234	0,064	0,00521 ^{b}	0,00435 ^{ab}	0,00419 ^{ab}	0,00450 ^{ab}	0,00437 ^{ab}	0,00403 ^{ab}	0,00365 ^{ab}	0,00376 ^{ab}	0,00306 ^{a}	0,00342 ^{ab}	0,00431 ^{ab}	0,00391 ^{ab}	0,00424 ^{ab}	0,00775 ^{c}
(Amida I)	SC	**0,013***	**0,000***	0,00567 ^{d}	0,00396 ^{abc}	0,00390 ^{abc}	0,00370 ^{ab}	0,0051 ^{abcd}	0,00336 ^{a}	0,00370 ^{ab}	0,00330 ^{a}	0,0052 ^{bcd}	0,0045 ^{abcd}	0,00545 ^{cd}	0,00601 ^{de}	0,00560 ^{d}	0,00782 ^{e}
1639 cm^{-1}/1549 cm^{-1}	C	**0,000***	**0,000***	2,50766 ^{h}	2,42652 ^{gh}	2,50540 ^{h}	2,44373 ^{gh}	2,52251 ^{h}	2,35756 ^{fgh}	2,55061 ^{h}	2,22826 ^{efg}	2,0088 ^{bde}	1,8937 ^{bcd}	2,15363 ^{def}	1,58047 ^{ac}	1,88040 ^{b}	1,50086 ^{a}
(Amida I/ Amida II)	SC	**0,001***	**0,001***	2,73560 ^{e}	2,33355 ^{cde}	2,65300 ^{e}	2,44746 ^{de}	2,75389 ^{e}	2,62843 ^{e}	2,49320 ^{de}	1,99919 ^{bc}	1,91152 ^{b}	2,0080 ^{bcd}	1,70743 ^{ab}	1,95311 ^{bc}	1,40246 ^{a}	1,69157 ^{ab}

ms: monosacáridos, CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza, AI/AII: Coeficiente de las señales Amida.

* Significativo a p≤0,05.

$^{a-h}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes (p≤0,05)

Tabla C.1. Continuación...

BANDAS	CS	P value		DÍAS DE MADURACIÓN													
		DÍA	LOTE	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d10	d13	d15	d17	d20	d27
1743 cm^{-1}	C	0,461	0,311	0,00508 ^{ab}	0,00571 ^{b}	0,00605 ^{b}	0,00561 ^{b}	0,00576 ^{ab}	0,00609 ^{b}	0,00651 ^{b}	0,00666 ^{b}	0,00700 ^{b}	0,00540 ^{ab}	0,00561 ^{b}	0,00537 ^{ab}	0,00559 ^{b}	0,00229 ^{a}
(C=O)	SC	**0,001***	**0,006***	0,00428 ^{bc}	0,00524 ^{cd}	0,0062 ^{defg}	0,0056 ^{defg}	0,0052 ^{bcde}	0,00714 ^{g}	0,00673 ^{efg}	0,00693 ^{fg}	0,00541 ^{cd}	0,0054 ^{cdef}	0,00467 ^{bc}	0,00455 ^{bc}	0,00385 ^{ab}	0,00231 ^{a}
2850 cm^{-1}	C	0,418	0,178	0,00421 ^{ab}	0,00464 ^{b}	0,00493 ^{b}	0,00462 ^{b}	0,00468 ^{ab}	0,00510 ^{b}	0,00521 ^{b}	0,00539 ^{b}	0,00570 ^{b}	0,00476 ^{ab}	0,00598 ^{b}	0,00468 ^{ab}	0,00468 ^{b}	0,00236 ^{a}
(CH_2)	SC	**0,002***	**0,006***	0,00368 ^{bc}	0,00443 ^{cd}	0,00508 ^{def}	0,00504 ^{def}	0,0044 ^{bcde}	0,00564 ^{f}	0,00541 ^{ef}	0,00557 ^{ef}	0,00446 ^{cd}	0,0046 ^{cdef}	0,00406 ^{bc}	0,00394 ^{bc}	0,00336 ^{ab}	0,00232 ^{a}
2872 cm^{-1}	C	0,643	0,130	0,00164 ^{ab}	0,00172 ^{ab}	0,00186 ^{ab}	0,00177 ^{ab}	0,00183 ^{ab}	0,00196 ^{ab}	0,00198 ^{ab}	0,00206 ^{ab}	0,00222 ^{b}	0,00186 ^{ab}	0,00191 ^{ab}	0,00180 ^{ab}	0,00188 ^{ab}	0,00134 ^{a}
(CH_3)	SC	**0,039***	**0,005***	0,00149 ^{ab}	0,002 ^{bcdef}	0,0020 ^{cdef}	0,00197 ^{def}	0,002 ^{abcde}	0,00209 ^{ef}	0,00206 ^{def}	0,00217 ^{f}	0,002 ^{abcdef}	0,002 ^{abcdef}	0,0017 ^{abcd}	0,00156 ^{abc}	0,00156 ^{abc}	0,00130 ^{a}
2920 cm^{-1}	C	0,474	0,123	0,00583 ^{ab}	0,00615 ^{ab}	0,00671 ^{b}	0,00648 ^{b}	0,00647 ^{ab}	0,00705 ^{b}	0,00717 ^{b}	0,00754 ^{b}	0,00775 ^{b}	0,00606 ^{ab}	0,00698 ^{b}	0,00603 ^{ab}	0,00639 ^{ab}	0,00352 ^{a}
(CH_2)	SC	**0,003***	**0,006***	0,00515 ^{bc}	0,00594 ^{cd}	0,00682 ^{def}	0,00687 ^{def}	0,0063 ^{cdef}	0,00768 ^{f}	0,00746 ^{ef}	0,00762 ^{f}	0,00618 ^{cde}	0,0063 ^{cdef}	0,0056 ^{bcd}	0,00542 ^{bc}	0,00452 ^{ab}	0,00344 ^{a}
2954 cm^{-1}	C	0,605	0,064	0,00191 ^{ab}	0,00195 ^{ab}	0,00216 ^{ab}	0,00209 ^{ab}	0,00215 ^{ab}	0,00228 ^{ab}	0,00233 ^{ab}	0,00244 ^{ab}	0,00258 ^{b}	0,00216 ^{ab}	0,00235 ^{ab}	0,00209 ^{ab}	0,00226 ^{ab}	0,00167 ^{a}
(CH_3)	SC	**0,029***	**0,002***	0,00173 ^{ab}	0,002 ^{abcde}	0,0022 ^{cdef}	0,00231 ^{def}	0,0020 ^{bcde}	0,00243 ^{ef}	0,00244 ^{ef}	0,00253 ^{f}	0,002 ^{bcdef}	0,002 ^{abcdef}	0,002 ^{abcde}	0,0019 ^{abcd}	0,00188 ^{abc}	0,00162 ^{a}
2954 cm^{-1}/2920 cm^{-1}	C	**0,000***	0,367	0,32832 ^{ab}	0,31699 ^{a}	0,32267 ^{a}	0,32349 ^{ab}	0,33222 ^{abc}	0,32320 ^{ab}	0,32476 ^{ab}	0,32402 ^{ab}	0,33237 ^{abc}	0,35588 ^{bc}	0,33732 ^{abc}	0,34675 ^{abc}	0,35729 ^{c}	0,47474 ^{d}
(CH_3/ CH_2)	SC	**0,000***	0,202	0,33527 ^{ab}	0,34086 ^{abc}	0,32539 ^{ab}	0,33715 ^{ab}	0,31564 ^{ab}	0,31624 ^{a}	0,32635 ^{ab}	0,33144 ^{ab}	0,34324 ^{abc}	0,33508 ^{abc}	0,37165 ^{c}	0,35262 ^{bc}	0,41669 ^{d}	0,47204 ^{e}
2920 cm^{-1}/2872 cm^{-1}	C	**0,019***	0,528	3,55960 ^{bc}	3,57641 ^{bc}	3,61269 ^{bc}	3,65156 ^{c}	3,54740 ^{bc}	3,59630 ^{bc}	3,63694 ^{bc}	3,65742 ^{c}	3,50570 ^{bc}	3,25537 ^{b}	3,64862 ^{c}	3,36089 ^{bc}	3,38289 ^{bc}	2,62427 ^{a}
(CH_2/ CH_3)	SC	**0,005***	0,632	3,44447 ^{bc}	3,3201 ^{b}	3,48940 ^{bc}	3,48668 ^{bc}	3,74383 ^{c}	3,66697 ^{c}	3,62593 ^{bc}	3,51540 ^{bc}	3,47555 ^{bc}	3,66425 ^{bc}	3,33720 ^{b}	3,45881 ^{bc}	2,90099 ^{a}	2,64576 ^{a}
2954 cm^{-1}/2850 cm^{-1}	C	**0,000***	**0,033***	0,45527 ^{bc}	0,42002 ^{a}	0,43886 ^{ab}	0,45277 ^{bc}	0,4598 ^{bcd}	0,44609 ^{abc}	0,44741 ^{abc}	0,45206 ^{bc}	0,45241 ^{bc}	0,4530 ^{abcd}	0,47201 ^{cd}	0,44713 ^{abc}	0,48806 ^{d}	0,70959 ^{e}
(CH_3/ CH_2)	SC	**0,000***	0,104	0,46842 ^{bc}	0,45703 ^{abc}	0,43629 ^{ab}	0,45950 ^{abc}	0,44717 ^{abc}	0,43085 ^{a}	0,45038 ^{abc}	0,45364 ^{abc}	0,47533 ^{c}	0,46001 ^{abc}	0,51187 ^{d}	0,48499 ^{cd}	0,56052 ^{e}	0,69927 ^{f}

ms: monosacáridos, CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza, AI/AII: Coeficiente de las señales Amida.

* Significativo a $p \leq 0,05$.

$^{a-h}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla C.2. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros Suspensión Desgrasada de Queso Camembert (DCS) y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) (p≤0,05)

BANDAS	CS	P value		DÍAS DE MADURACIÓN													
		DÍA	LOTE	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d13	d15	d17	d20	d27
978 cm^{-1} (NA)	**C**	0,813	**0,000***	0,00031 ^{ab}	0,00028 ^{ab}	0,00037 ^{ab}	0,00038 ^{ab}	0,00007 ^{a}	0,000395 ^{b}	0,000443 ^{b}	0,000366 ^{ab}	0,000587 ^{b}	0,000461 ^{b}	0,00042 ^{b}	0,000485 ^{b}	0,000454 ^{b}	0,00043 ^{b}	0,000318 ^{ab}
	UR	0,869	**0,010***	0,00030 ^{ab}	0,00021 ^{a}	0,00037 ^{ab}	0,00041 ^{ab}	0,000408 ^{ab}	0,000382 ^{ab}	0,000457 ^{ab}	0,000402 ^{ab}	0,000585 ^{ab}	0,000428 ^{ab}	0,000893 ^{b}	0,000381 ^{ab}	0,000488 ^{ab}	0,000471 ^{ab}	0,000444 ^{ab}
1045 cm^{-1} (Lactosa + ms)	**C**	**0,003***	**0,002***	0,001147 ^{fg}	0,00105 ^{dfg}	0,001329 ^{g}	0,001197 ^{fg}	0,001 ^{bcdefg}	0,00110 ^{dfg}	0,001321 ^{g}	0,00097 ^{cdef}	0,00109 ^{defg}	0,00097 ^{cdef}	0,0008 ^{bcde}	0,00070 ^{bce}	0,000666 ^{bc}	0,0006 ^{ab}	0,000211 ^{a}
	UR	0,143	**0,027***	0,001259 ^{d}	0,00110 ^{bcd}	0,00133 ^{d}	0,00123 ^{cd}	0,00132 ^{bcd}	0,00117 ^{bcd}	0,00114 ^{bcd}	0,0009 ^{abcd}	0,0010 ^{abcd}	0,00075 ^{abcd}	0,00107 ^{bcd}	0,00054 ^{abc}	0,0006 ^{abcd}	0,00049 ^{ab}	0,000148 ^{a}
1082 cm^{-1} (Lactosa)	**C**	**0,002***	0,294	0,001823 ^{ef}	0,001782 ^{ef}	0,001912 ^{f}	0,001845 ^{ef}	0,00164 ^{def}	0,001733 ^{ef}	0,001815 ^{ef}	0,00162 ^{def}	0,0015 ^{bcdef}	0,00144 ^{bde}	0,0013 ^{abcd}	0,00101 ^{ac}	0,00105 ^{abc}	0,00099 ^{ac}	0,000877 ^{a}
	UR	**0,032***	0,209	0,001853 ^{cd}	0,001744 ^{cd}	0,001906 ^{d}	0,001871 ^{cd}	0,001907 ^{cd}	0,001827 ^{cd}	0,00162 ^{bcd}	0,0015 ^{abcd}	0,0013 ^{abcd}	0,00126 ^{abc}	0,0014 ^{abcd}	0,001029 ^{ab}	0,001045 ^{ab}	0,001002 ^{a}	0,00078 ^{a}
1095 cm^{-1} (Lactosa)	**C**	**0,046***	**0,046***	0,001809 ^{c}	0,001712 ^{c}	0,001623 ^{bc}	0,001793 ^{c}	0,00144 ^{abc}	0,001753 ^{c}	0,001522 ^{bc}	0,001713 ^{c}	0,00107 ^{abc}	0,00125 ^{abc}	0,00118 ^{abc}	0,000824 ^{a}	0,00098 ^{ab}	0,000818 ^{a}	0,00103 ^{abc}
	UR	0,332	0,331	0,001632 ^{ab}	0,001483 ^{ab}	0,001577 ^{ab}	0,001835 ^{b}	0,001587 ^{ab}	0,001803 ^{b}	0,00136 ^{ab}	0,001541 ^{ab}	0,001049 ^{ab}	0,001323 ^{ab}	0,001327 ^{ab}	0,000974 ^{a}	0,000906 ^{a}	0,000932 ^{a}	0,000932 ^{ab}
1115 cm^{-1} (Lactato)	**C**	**0,014***	**0,022***	0,001674 ^{de}	0,00165 ^{cde}	0,0016 ^{bcde}	0,001697 ^{e}	0,0014 ^{abcde}	0,00165 ^{cde}	0,0015 ^{bcde}	0,0016 ^{bcde}	0,0010 ^{abcd}	0,0012 ^{abcde}	0,00111 ^{abc}	0,00074 ^{a}	0,000879 ^{a}	0,0007 ^{a}	0,000931 ^{ab}
	UR	0,171	0,278	0,00154 ^{bcd}	0,0014 ^{abcd}	0,0015 ^{abcd}	0,001713 ^{d}	0,0015 ^{abcd}	0,00169 ^{cd}	0,0013 ^{abcd}	0,0014 ^{abcd}	0,0010 ^{abcd}	0,0012 ^{abcd}	0,0012 ^{abcd}	0,000835 ^{ab}	0,00079 ^{a}	0,000787 ^{a}	0,00081 ^{abc}
1161 cm^{-1} (Lactosa + ms)	**C**	0,056	**0,001***	0,00272 ^{c}	0,002636 ^{bc}	0,00199 ^{abc}	0,002538 ^{bc}	0,00218 ^{abc}	0,00253 ^{bc}	0,00186 ^{abc}	0,002618 ^{bc}	0,001087 ^{a}	0,001512 ^{ab}	0,00165 ^{abc}	0,000985 ^{a}	0,001358 ^{a}	0,001028 ^{a}	0,00160 ^{abc}
	UR	0,248	**0,009***	0,00224 ^{ab}	0,002029 ^{ab}	0,001894 ^{ab}	0,002524 ^{b}	0,002049 ^{ab}	0,002573 ^{b}	0,001631 ^{ab}	0,002272 ^{ab}	0,001053 ^{ab}	0,001857 ^{ab}	0,001606 ^{ab}	0,001261 ^{ab}	0,001056 ^{a}	0,001001 ^{a}	0,001005 ^{ab}
1313 cm^{-1} (Amida III?)	**C**	0,641	**0,044***	0,000821 ^{b}	0,00076 ^{ab}	0,000711 ^{ab}	0,000661 ^{ab}	0,0007 ^{ab}	0,000736 ^{ab}	0,000741 ^{ab}	0,000682 ^{ab}	0,000583 ^{ab}	0,000603 ^{a}	0,000665 ^{ab}	0,000638 ^{ab}	0,000662 ^{ab}	0,000604 ^{a}	0,000631 ^{ab}
	UR	0,626	0,265	0,00085 ^{b}	0,000747 ^{ab}	0,000658 ^{ab}	0,000709 ^{ab}	0,000817 ^{ab}	0,000723 ^{ab}	0,000741 ^{ab}	0,000701 ^{ab}	0,000582 ^{ab}	0,000606 ^{ab}	0,000737 ^{ab}	0,000561 ^{a}	0,000663 ^{ab}	0,000658 ^{ab}	0,000539 ^{ab}
1377 cm^{-1} (ms)	**C**	0,081	**0,004***	0,001054 ^{e}	0,00095 ^{cde}	0,0009 ^{bcde}	0,0009 ^{bcde}	0,0009 ^{abcde}	0,000983 ^{de}	0,0009 ^{abcde}	0,00092 ^{cde}	0,00068 ^{abc}	0,00072 ^{abc}	0,0008 ^{abcd}	0,000666 ^{ab}	0,0008 ^{abcd}	0,000647 ^{a}	0,0008 ^{abcde}
	UR	0,297	**0,021***	0,001009 ^{c}	0,00086 ^{abc}	0,00082 ^{abc}	0,000958 ^{bc}	0,00087 ^{abc}	0,000977 ^{bc}	0,00083 ^{abc}	0,00091 ^{abc}	0,00068 ^{abc}	0,00079 ^{abc}	0,00075 ^{abc}	0,000647 ^{a}	0,00073 ^{abc}	0,000713 ^{ab}	0,00066 ^{abc}
1406 cm^{-1} (-COO-)	**C**	**0,008***	**0,003***	0,00087 ^{abc}	0,000815 ^{ab}	0,0010 ^{bcde}	0,000808 ^{ab}	0,00085 ^{abc}	0,00085 ^{abc}	0,00098 ^{cde}	0,000782 ^{a}	0,00103 ^{cdef}	0,0009 ^{abcd}	0,0010 ^{bcde}	0,00101 ^{cde}	0,00106 ^{def}	0,001098 ^{ef}	0,001207 ^{f}
	UR	**0,020***	0,069	0,000939 ^{a}	0,00086 ^{a}	0,000907 ^{a}	0,000857 ^{a}	0,000898 ^{a}	0,000864 ^{a}	0,000975 ^{ab}	0,000914 ^{a}	0,000986 ^{ab}	0,000939 ^{a}	0,000969 ^{a}	0,001097 ^{ab}	0,001226 ^{bc}	0,001406 ^{c}	0,00114 ^{abc}
1551 cm^{-1} (Amida II)	**C**	**0,006***	0,136	0,002139 ^{ac}	0,00242 ^{abc}	0,0027 ^{abcd}	0,002114 ^{a}	0,0031 ^{bcdef}	0,002042 ^{a}	0,0028 ^{abcd}	0,002119 ^{ac}	0,0029 ^{abcde}	0,00293 ^{bde}	0,00295 ^{bde}	0,00323 ^{def}	0,00327 ^{def}	0,003655 ^{ef}	0,004188 ^{f}
	UR	**0,038***	0,763	0,002426 ^{ab}	0,00265 ^{abc}	0,00267 ^{abc}	0,002139 ^{a}	0,0029 ^{abcd}	0,002279 ^{ab}	0,0028 ^{abcd}	0,002414 ^{ab}	0,0029 ^{abcd}	0,00270 ^{abc}	0,0030 ^{abcd}	0,00371 ^{cde}	0,003906 ^{de}	0,00443 ^{e}	0,0036 ^{bcde}
1651 cm^{-1} (Amida I)	**C**	0,479	**0,046***	0,00752 ^{abc}	0,00871 ^{abc}	0,00795 ^{abc}	0,00654 ^{abc}	0,00899 ^{abc}	0,005864 ^{a}	0,00770 ^{abc}	0,0062 ^{ab}	0,00722 ^{abc}	0,00811 ^{abc}	0,00832 ^{abc}	0,009194 ^{c}	0,008876 ^{bc}	0,00854 ^{abc}	0,00855 ^{abc}
	UR	0,844	0,066	0,008891 ^{a}	0,008275 ^{a}	0,007062 ^{a}	0,009434 ^{a}	0,006738 ^{a}	0,007574 ^{a}	0,006512 ^{a}	0,007236 ^{a}	0,007408 ^{a}	0,008209 ^{a}	0,008693 ^{a}	0,009244 ^{a}	0,007863 ^{a}	0,007723 ^{a}	0,009481 ^{a}

ms: monosacáridos, CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza, AI/AII: Coeficiente de las señales Amida.

***** Significativo a p≤0,05.

$^{a-g}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes (p≤0,05)

Tabla C.2. Continuación...

BANDAS	CS	P value		DÍAS DE MADURACIÓN														
		DÍA	LOTE	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d13	d15	d17	d20	d27
1651 cm^{-1}/1551 cm^{-1} (Amida I/ Amida II)	**C**	**0,000***	**0,000***	3,559261 ^{h}	3,641428 ^{h}	3,01327 ^{efg}	3,143257 ^{g}	2,91216 ^{defg}	2,90810 ^{defg}	2,740276 ^{cd}	3,067228 ^{fg}	2,466795 ^{bc}	2,79234 ^{cde}	2,82508 ^{def}	2,79342 ^{cde}	2,695902 ^{cd}	2,331531 ^{ab}	2,04074 ^{a}
	UR	**0,000***	**0,000***	3,678167 ^{g}	3,583182 ^{fg}	3,10484 ^{def}	3,30691 ^{efg}	3,24008 ^{defg}	2,996127 ^{de}	2,72569 ^{bcd}	2,79295 ^{cde}	2,49542 ^{bcd}	2,79412 ^{cde}	2,67632 ^{bcd}	2,363698 ^{bc}	2,342146 ^{bc}	1,777091 ^{a}	2,139059 ^{ab}
1741 cm^{-1} (C=O)	**C**	0,151	**0,000***	0,004544 ^{b}	0,004084 ^{b}	0,002466 ^{ab}	0,004108 ^{b}	0,003854 ^{ab}	0,004026 ^{b}	0,002452 ^{ab}	0,004347 ^{b}	0,000777 ^{a}	0,00192 ^{ab}	0,002138 ^{ab}	0,001198 ^{a}	0,001956 ^{ab}	0,001113 ^{a}	0,003016 ^{ab}
	UR	0,415	**0,002***	0,003579 ^{ab}	0,002976 ^{ab}	0,002314 ^{ab}	0,003858 ^{ab}	0,002948 ^{ab}	0,004143 ^{b}	0,001982 ^{ab}	0,003597 ^{ab}	0,000814 ^{ab}	0,00287 ^{ab}	0,001754 ^{ab}	0,001893 ^{ab}	0,001272 ^{a}	0,001242 ^{a}	0,002115 ^{ab}
2850 cm^{-1} (CH_2)	**C**	0,240	**0,002***	0,003805 ^{c}	0,00346 ^{abc}	0,00260 ^{abc}	0,003852 ^{c}	0,00324 ^{abc}	0,00365 ^{bc}	0,00265 ^{abc}	0,003935 ^{c}	0,00173 ^{abc}	0,00225 ^{abc}	0,00252 ^{abc}	0,001767 ^{a}	0,00240 ^{abc}	0,001861 ^{ab}	0,00301 ^{abc}
	UR	0,465	**0,007***	0,003132 ^{ab}	0,002674 ^{ab}	0,002531 ^{ab}	0,003492 ^{ab}	0,002629 ^{ab}	0,003781 ^{b}	0,002142 ^{ab}	0,003383 ^{ab}	0,001737 ^{ab}	0,0029 ^{ab}	0,002188 ^{ab}	0,002276 ^{ab}	0,001801 ^{a}	0,001885 ^{a}	0,002278 ^{ab}
2954 cm^{-1} (CH_3)	**C**	0,555	**0,028***	0,001616 ^{ab}	0,001523 ^{ab}	0,00132 ^{ab}	0,001748 ^{ab}	0,00158 ^{ab}	0,001732 ^{ab}	0,001456 ^{ab}	0,001864 ^{b}	0,001226 ^{ab}	0,001307 ^{ab}	0,001425 ^{ab}	0,001125 ^{a}	0,001403 ^{ab}	0,001247 ^{ab}	0,001811 ^{ab}
	UR	0,802	0,120	0,001371 ^{a}	0,001182 ^{a}	0,001286 ^{a}	0,00164 ^{a}	0,001287 ^{a}	0,00175 ^{a}	0,00128 ^{a}	0,001704 ^{a}	0,001188 ^{a}	0,001617 ^{a}	0,001229 ^{a}	0,001441 ^{a}	0,001229 ^{a}	0,001508 ^{a}	0,001542 ^{a}
2954 cm^{-1}/2920 cm^{-1} (CH_3/ CH_2)	**C**	0,263	**0,000***	0,300314 ^{a}	0,30006 ^{a}	0,37385 ^{abc}	0,341329 ^{ab}	0,319612 ^{ab}	0,37265 ^{abc}	0,38205 ^{abc}	0,37449 ^{abc}	0,509386 ^{bc}	0,442528 ^{bc}	0,39514 ^{abc}	0,497473 ^{c}	0,39516 ^{abc}	0,456939 ^{bc}	0,38264 ^{abc}
	UR	0,067	**0,000***	0,302643 ^{ab}	0,299526 ^{a}	0,36814 ^{abc}	0,34072 ^{abc}	0,31258 ^{abc}	0,33683 ^{abc}	0,42389 ^{abc}	0,40943 ^{abc}	0,496602 ^{cd}	0,460644 ^{cd}	0,40487 ^{abc}	0,42817 ^{abc}	0,44603 ^{bcd}	0,589668 ^{d}	0,4395 ^{abcd}
2954 cm^{-1}/2850 cm^{-1} (CH_3/ CH_2)	**C**	**0,037***	**0,000***	0,42952 ^{a}	0,441535 ^{a}	0,5274 ^{abcd}	0,477795 ^{ab}	0,48807 ^{abc}	0,51747 ^{abc}	0,5565 ^{abcdf}	0,52016 ^{abc}	0,708568 ^{ef}	0,62478 ^{cdef}	0,570 ^{abcdef}	0,701423 ^{c}	0,5958 ^{bcdef}	0,66955 ^{def}	0,603 ^{abcdef}
	UR	**0,026***	**0,001***	0,446246 ^{ab}	0,438123 ^{a}	0,52208 ^{abc}	0,478045 ^{ab}	0,48940 ^{abc}	0,47731 ^{ab}	0,60192 ^{abc}	0,56164 ^{abc}	0,68392 ^{bcd}	0,641603 ^{bc}	0,58425 ^{abc}	0,63440 ^{abc}	0,681031 ^{c}	0,891009 ^{d}	0,67680 ^{abcd}
2920 cm^{-1}/2872 cm^{-1} (CH_2/ CH_3)	**C**	0,391	**0,000***	3,987077 ^{bc}	4,088942 ^{c}	3,17489 ^{abc}	3,52187 ^{abc}	4,011884 ^{bc}	3,24601 ^{abc}	3,13332 ^{abc}	3,18197 ^{abc}	2,205605 ^{a}	2,861363 ^{ab}	3,09176 ^{abc}	2,97129 ^{abc}	3,36820 ^{abc}	2,583662 ^{a}	3,32499 ^{abc}
	UR	0,075	**0,000***	3,977058 ^{de}	3,96020 ^{cde}	3,2371 ^{abcde}	3,5282 ^{bcde}	4,293089 ^{e}	3,5441 ^{bcde}	2,917277 ^{ab}	3,00753 ^{abc}	2,204603 ^{a}	2,872607 ^{ab}	3,0483 ^{abcd}	3,0608 ^{abcd}	2,919588 ^{ab}	2,345358 ^{a}	2,8098 ^{abcd}

ms: monosacáridos, CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza, AI/AII: Coeficiente de las señales Amida,

***** Significativo a $p \leq 0,05$,

$^{a-g}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla C.3. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de Grasa purificada (PF), Nitrógeno Soluble en Ácido (NSA), Caseína (CN) y Nitrógeno soluble (NS-EtOH) e Insoluble (NI-EtOH) en Etanol y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) (p≤0,05)

	BANDAS	CS	P value		DÍAS DE MADURACIÓN														
			DÍA	LOTE	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d13	d15	d17	d20	d27
PF	1119 cm^{-1}	C	0,564	0,792	0,0031 ^{ab}	0,0031 ^{ab}	0,0032 ^{b}	0,0031 ^{ab}	0,0031 ^{ab}	0,0031 ^{ab}	0,0031 ^{ab}	0,0031 ^{ab}	0,0031 ^{ab}	0,00316 ^{b}	0,00318 ^{b}	0,0031 ^{ab}	0,00300 ^{a}	0,0031 ^{ab}	0,0031 ^{ab}
		SC	**0,085**	0,144	0,00319 ^{c}	0,0031 ^{bc}	0,00317 ^{c}	0,00318 ^{c}	0,0032 ^{bc}	0,0031 ^{bc}	0,00317 ^{c}	0,00320 ^{c}	0,0032 ^{bc}	0,0031 ^{bc}	0,0032 ^{bc}	0,0030 ^{ab}	0,003 ^{abc}	0,00293 ^{a}	0,0031 ^{bc}
	1163 cm^{-1}	C	0,573	0,647	0,00451 ^{a}	0,00457 ^{a}	0,00430 ^{a}	0,00430 ^{a}	0,00425 ^{a}	0,00436 ^{a}	0,00438 ^{a}	0,00439 ^{a}	0,00431 ^{a}	0,00432 ^{a}	0,00435 ^{a}	0,00437 ^{a}	0,00455 ^{a}	0,00429 ^{a}	0,00430 ^{a}
		SC	**0,090**	0,996	0,0045 ^{bc}	0,00461 ^{c}	0,0043 ^{ab}	0,0043 ^{ab}	0,0044 ^{ab}	0,0043 ^{ab}	0,0044 ^{ab}	0,0043 ^{ab}	0,0044 ^{ab}	0,0043 ^{ab}	0,0044 ^{ab}	0,00427 ^{a}	0,0044 ^{ab}	0,00424 ^{a}	0,0043 ^{ab}
	1416 cm^{-1}	C	0,652	0,057	0,0013 ^{ab}	0,0013 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,0014 ^{ab}	0,00131 ^{a}	0,00141 ^{b}	0,0014 ^{ab}
		SC	**0,046***	0,042*	0,001 ^{abc}	0,00131 ^{a}	0,001 ^{bcd}	0,001 ^{bcd}	0,001 ^{bcd}	0,001 ^{bcd}	0,0013 ^{ab}	0,0014 ^{d}	0,001 ^{abc}	0,0014 ^{bc}	0,001 ^{bcd}	0,00142 ^{d}	0,0014 ^{bc}	0,00141 ^{d}	0,001 ^{abcd}
	2954 cm^{-1}/2872 cm^{-1}	C	**0,055**	0,089	1,1635 ^{cd}	1,162 ^{bcd}	1,14750 ^{a}	1,1482 ^{ab}	1,147 ^{abc}	1,152 ^{abc}	1,154 ^{abc}	1,153 ^{abc}	1,147 ^{abc}	1,14636 ^{a}	1,1496 ^{ab}	1,152 ^{abc}	1,17237 ^{d}	1,1492 ^{ab}	1,150 ^{abc}
		SC	0,550	0,749	1,1556 ^{ab}	1,16664 ^{b}	1,14856 ^{a}	1,14865 ^{a}	1,1514 ^{ab}	1,1477 ^{a}	1,1515 ^{ab}	1,1498 ^{ab}	1,14507 ^{a}	1,14847 ^{a}	1,1518 ^{ab}	1,14553 ^{a}	1,1567 ^{ab}	1,14515 ^{a}	1,1495 ^{ab}
ASN	1554 cm^{-1}	C	**0,005***	**0,000***	0,0376 ^{ab}	0,0381 ^{ab}	0,0385 ^{ab}	0,0382 ^{ab}	0,0326 ^{a}	0,0385 ^{ab}	0,0413 ^{bc}	0,0407 ^{bc}	0,0365 ^{ab}	0,0422 ^{bc}	0,0425 ^{bc}	0,043 ^{bcd}	0,0470 ^{cd}	0,0489 ^{d}	0,0507 ^{d}
		UR	**0,014***	**0,001***	0,041 ^{abcd}	0,040 ^{abcd}	0,0331 ^{a}	0,0365 ^{ab}	0,036 ^{abc}	0,037 ^{abc}	0,041 ^{abcd}	0,0359 ^{ab}	0,046 ^{abcd}	0,047 ^{bcd}	0,045 ^{abcd}	0,0518 ^{de}	0,0490 ^{cd}	0,0617 ^{e}	0,0559 ^{de}
	1633 cm^{-1}	C	0,376	0,082	0,106 ^{abc}	0,102 ^{abc}	0,116 ^{abc}	0,121 ^{abc}	0,088 ^{abc}	0,0735 ^{a}	0,106 ^{abc}	0,111 ^{abc}	0,0679 ^{ab}	0,114 ^{abc}	0,123 ^{abc}	0,123 ^{abc}	0,1427 ^{c}	0,1329 ^{bc}	0,1468 ^{bc}
		UR	0,884	**0,000***	0,1547 ^{ab}	0,1507 ^{ab}	0,1505 ^{ab}	0,1502 ^{ab}	0,1472 ^{ab}	0,1330 ^{ab}	0,1298 ^{ab}	0,1078 ^{a}	0,1316 ^{ab}	0,1342 ^{ab}	0,1471 ^{ab}	0,1268 ^{ab}	0,1247 ^{ab}	0,1552 ^{ab}	0,2045 ^{b}
	1633 cm^{-1} /1554 cm^{-1}	C	0,912	0,670	2,7778 ^{a}	2,6846 ^{a}	2,9399 ^{a}	3,0860 ^{a}	2,6979 ^{a}	1,9365 ^{a}	2,6368 ^{a}	2,7755 ^{a}	1,8581 ^{a}	2,7851 ^{a}	2,8948 ^{a}	2,8673 ^{a}	3,0348 ^{a}	2,7465 ^{a}	2,8977 ^{a}
		UR	0,346	**0,000**	3,950 ^{abc}	3,701 ^{abc}	4,7688 ^{c}	4,2384 ^{bc}	4,149 ^{abc}	3,600 ^{abc}	3,265 ^{abc}	3,520 ^{abc}	2,846 ^{abc}	3,134 ^{abc}	3,404 ^{abc}	2,4784 ^{a}	2,5490 ^{ab}	2,8842 ^{ab}	3,662 ^{abc}
CAS	1548 cm^{-1}	C	0,082	**0,019**	0,1356 ^{a}	0,1560 ^{ab}	0,1630 ^{ab}	0,1579 ^{ab}	0,170 ^{abc}	0,1665 ^{ab}	0,174 ^{abc}	0,1885 ^{bc}	0,1582 ^{ab}	0,1921 ^{bc}	0,1820 ^{bc}	0,1986 ^{bc}	0,1991 ^{bc}	0,2165 ^{c}	0,1467 ^{ab}
		UR	0,095	**0,036**	0,143 ^{abcd}	0,16 ^{abcde}	0,17 ^{abcde}	0,155 ^{abcd}	0,18 ^{abcde}	0,183 ^{bcde}	0,17 ^{abcde}	0,189 ^{bcde}	0,17 ^{abcde}	0,2032 ^{de}	0,2274 ^{e}	0,135 ^{abc}	0,193 ^{cde}	0,1256 ^{ab}	0,0992 ^{a}
	1633 cm^{-1}	C	0,401	**0,019***	0,2766 ^{ab}	0,305 ^{abc}	0,325 ^{abc}	0,297 ^{abc}	0,332 ^{abc}	0,321 ^{abc}	0,323 ^{abc}	0,324 ^{abc}	0,312 ^{abc}	0,3515 ^{bc}	0,3647 ^{c}	0,2392 ^{a}	0,3375 ^{bc}	0,2740 ^{ab}	0,2542 ^{ab}
		UR	0,249	0,084	0,2867 ^{ab}	0,302 ^{abc}	0,315 ^{abc}	0,307 ^{abc}	0,318 ^{abc}	0,315 ^{abc}	0,320 ^{abc}	0,3517 ^{bc}	0,307 ^{abc}	0,345 ^{abc}	0,328 ^{abc}	0,2731 ^{a}	0,345 ^{abc}	0,3613 ^{c}	0,290 ^{abc}
	1633 cm^{-1} /1548 cm^{-1}	C	0,346	0,844	2,1178 ^{b}	1,9360 ^{b}	1,9353 ^{b}	1,9435 ^{b}	1,8716 ^{ab}	1,8952 ^{b}	1,8524 ^{b}	1,8732 ^{b}	1,9388 ^{b}	1,7949 ^{ab}	1,8177 ^{ab}	1,3663 ^{a}	1,7542 ^{ab}	1,6934 ^{ab}	1,9748 ^{b}
		UR	**0,036***	0,061	1,9344 ^{ab}	1,8615 ^{a}	1,8900 ^{a}	1,9233 ^{ab}	1,8587 ^{ab}	1,7576 ^{a}	1,9204 ^{ab}	1,7363 ^{a}	1,8431 ^{ab}	1,7480 ^{a}	1,6121 ^{a}	1,8154 ^{a}	1,7509 ^{a}	2,2770 ^{bc}	2,5627 ^{c}

ms: monosacáridos, CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza, AI/AII: Coeficiente de las señales Amida.

* Significativo a p≤0,05.

$^{a-e}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes (p≤0,05)

Tabla C.3. Continuación...

	BANDAS	CS	P value		DÍAS DE MADURACIÓN														
			DÍA	LOTE	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d13	d15	d17	d20	d27
EtOH-NS	1579 cm^{-1}	C	0,225	0,051	0,0314 ^{c}	0,0248 ^{bc}	-0,055 ^{ab}	0,012 ^{abc}	0,0532 ^{c}	-0,020^{abc}	0,001 ^{abc}	-0,007 ^{abc}	-0,059 ^{abc}	-0,039^{abc}	0,012 ^{abc}	-0,0638 ^{a}	-0,0624 ^{a}	-0,007 ^{abc}	-0,054 ^{abc}
		UR	0,531	**0,050***	0,0341 ^{b}	-0,010 ^{ab}	-0,036 ^{ab}	-0,021 ^{ab}	-0,024 ^{ab}	-0,025 ^{ab}	-0,037 ^{ab}	-0,0423 ^{a}	-0,047 ^{ab}	-0,029 ^{ab}	-0,033 ^{ab}	-0,0605 ^{a}	-0,004 ^{ab}	-0,0445 ^{a}	-0,0663 ^{a}
	1648 cm^{-1}	C	0,782	**0,000***	0,3494 ^{a}	0,3368 ^{a}	0,2145 ^{a}	0,2121 ^{a}	0,3603 ^{a}	0,2684 ^{a}	0,2455 ^{a}	0,2211 ^{a}	0,1500 ^{a}	0,2338 ^{a}	0,2566 ^{a}	0,2039 ^{a}	0,2124 ^{a}	0,2055 ^{a}	0,3420 ^{a}
		UR	0,972	**0,000***	0,3115 ^{b}	0,2110 ^{ab}	0,1858 ^{ab}	0,2373 ^{ab}	0,3385 ^{b}	0,2330 ^{ab}	0,2420 ^{ab}	0,2318 ^{ab}	0,1240 ^{a}	0,2278 ^{ab}	0,2326 ^{ab}	0,2149 ^{ab}	0,2338 ^{ab}	0,1989 ^{ab}	0,3368 ^{b}
	1648 cm^{-1} /1579 cm^{-1}	C	0,608	0,758	-5,574 ^{ab}	13,5948 ^{b}	-3,821 ^{ab}	1,6122 ^{ab}	6,7726 ^{ab}	9,3885 ^{b}	2,1173 ^{ab}	0,8030 ^{ab}	-2,537 ^{ab}	-6,600 ^{ab}	2,0418 ^{ab}	-3,010 ^{ab}	-3,267 ^{ab}	-29,229 ^{a}	-6,298 ^{ab}
		UR	0,715	0,434	-6,725 ^{ab}	3,1762 ^{b}	-5,688 ^{ab}	11,2872 ^{b}	-14,32 ^{ab}	-57,210^{a}	-13,79 ^{ab}	-5,621 ^{ab}	-2,652 ^{ab}	-15,60 ^{ab}	-8,702 ^{ab}	-3,490 ^{ab}	7,6269 ^{b}	-3,871 ^{ab}	-5,079 ^{ab}
EtOH-NIS	1542 cm^{-1}	C	**0,022***	**0,000***	0,0310 ^{de}	0,0323 ^{e}	0,0316 ^{e}	0,03 ^{abcde}	0,0150 ^{a}	0,0192 ^{ab}	0,022 ^{abc}	0,022^{abc}	0,03 ^{abcde}	0,023 ^{abcd}	0,026 ^{bcde}	0,03^{abcde}	0,027 ^{bcde}	0,029 ^{cde}	0,0321 ^{de}
		UR	**0,034***	**0,000***	0,023 ^{bcd}	0,0334 ^{cd}	0,0305 ^{c}	0,0287 ^{bc}	0,0210 ^{a}	0,0249 ^{ab}	0,0295 ^{bc}	0,0324 ^{cd}	0,0348 ^{cd}	0,0326 ^{cd}	0,0290 ^{bc}	0,0330 ^{cd}	0,0366 ^{d}	0,0342 ^{cd}	0,0321 ^{cd}
	1648 cm^{-1}	C	0,056	0,133	0,0473 ^{b}	0,0495 ^{b}	0,0475 ^{b}	0,0243 ^{ab}	0,0040 ^{a}	0,0098 ^{a}	0,0172 ^{a}	0,0134 ^{a}	0,0173 ^{ab}	0,0137 ^{a}	0,0139 ^{a}	0,0176 ^{a}	0,0194 ^{a}	0,0196 ^{a}	0,0330 ^{ab}
		UR	**0,000***	**0,000***	0,0242 ^{a}	0,0209 ^{a}	0,0387 ^{b}	0,0415 ^{bc}	0,042 ^{bcd}	0,0407 ^{bc}	0,0434 ^{cd}	0,045 ^{cde}	0,043 ^{bcd}	0,044 ^{cde}	0,0405 ^{bc}	0,045 ^{cde}	0,0474 ^{de}	0,0482 ^{e}	0,0471 ^{de}
	1648 cm^{-1} /1542 cm^{-1}	C	0,276	0,624	1,6539 ^{c}	1,6094 ^{bc}	1,568 ^{abc}	0,5403 ^{ab}	0,2687 ^{a}	0,4932 ^{a}	0,655 ^{abc}	0,614 ^{abc}	0,695 ^{abc}	0,605 ^{abc}	0,5155 ^{a}	0,786 ^{abc}	0,785 ^{abc}	0,712 ^{abc}	1,030 ^{abc}
		UR	0,057	**0,000***	0,8093 ^{ab}	0,6263 ^{a}	1,3200 ^{c}	1,5563 ^{cd}	2,0240 ^{e}	1,6961 ^{de}	1,4877 ^{cd}	1,4487 ^{cd}	1,2241 ^{bc}	1,3761 ^{c}	1,4383 ^{cd}	1,4013 ^{cd}	1,3065 ^{c}	1,4302 ^{cd}	1,4665 ^{cd}

ms: monosacáridos, CS: sección de queso, C: corazón, SC: subcorteza, AI/AII: Coeficiente de las señales Amida,

* Significativo a $p \leq 0,05$,

$^{a-e}$ Medias sin letra común son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Anexo D. Queso Emmental

Tabla D.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de queso Emmental y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$).

Tabla D.2. Bandas seleccionadas por el procedimiento paso a paso ascendente para el Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de queso Emmental.

Tabla D.3. Distancias Mahalanobis al cuadrado para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Calibración.

Tabla D.4. Prueba de significancia de la Distancia Mahalanobis al cuadrado ($p < 0,05$).

Tabla D.5. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Calibración.,

Tabla D.6. Distancias Mahalanobis al cuadrado para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Validación Cruzada.

Tabla D.7. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Validación Cruzada.

Tabla D.8. Distancias Mahalanobis al cuadrado para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Predicción.

Tabla D.9. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Predicción.

Tabla D.1. Análisis de Varianza (ANOVA) de los espectros de queso Emmental y prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) ($p \leq 0,05$)

Banda	**P value**		**DIAS DE MADURACIÓN**						
	Cepa	**Muestreo**	**d20**	**d27**	**d34**	**d51**	**d58**	**d65**	**AM**
1099 cm^{-1} (Lactosa)	**0,0352***	**0,0000***	$0,006587^{a}$	$0,006632^{a}$	$0,006622^{a}$	$0,006427^{b}$	$0,006315^{b}$	$0,006404^{b}$	$0,006680^{a}$
1115 cm^{-1} (Lactato)	**0,0365***	**0,0000***	$0,006366^{a}$	$0,006504^{c}$	$0,00650^{bc}$	$0,006381^{a}$	$0,006340^{a}$	$0,00641^{ab}$	$0,006612^{d}$
1161 cm^{-1} (Lactosa + ms)	0,4737	**0,0000***	$0,00999^{bc}$	$0,00976^{bc}$	$0,010179^{b}$	$0,00929^{ac}$	$0,008855^{a}$	$0,009027^{a}$	$0,012926^{d}$
1240 cm^{-1} (C-O-C, P=O)	0,1369	**0,0002***	$0,00516^{cd}$	$0,00523^{ac}$	$0,005144^{d}$	$0,00523^{abc}$	$0,00530^{ab}$	$0,00528^{ab}$	$0,005307^{b}$
1379 cm^{-1} (ms)	**0,0139***	**0,0001***	$0,003185^{c}$	$0,003391^{a}$	$0,00333^{ac}$	$0,00346^{ab}$	$0,003617^{b}$	$0,003573^{b}$	$0,003373^{a}$
1466 cm^{-1} (CH_2)	**0,0092***	**0,0123***	$0,005696^{b}$	$0,00610^{ab}$	$0,00592^{ab}$	$0,00599^{ab}$	$0,00631^{ac}$	$0,00633^{ac}$	$0,006708^{c}$
1541 cm^{-1} (Amida II)	0,4116	**0,0000***	$0,01624^{ab}$	$0,016849^{b}$	$0,01591^{ab}$	$0,013084^{c}$	$0,01409^{ac}$	$0,01629^{ab}$	$0,019678^{d}$
1647 cm^{-1} (Amida I)	0,1867	**0,0000***	$0,019608^{c}$	$0,017351^{b}$	$0,017849^{b}$	$0,014852^{a}$	$0,015160^{a}$	$0,016646^{b}$	$0,013881^{a}$
1647 cm^{-1}/1541 cm^{-1} (Amida I/ Amida II)	0,5899	**0,0186***	$1,213525^{a}$	$1,03217^{ab}$	$1,144025^{a}$	$1,357387^{a}$	$1,153822^{a}$	$1,03417^{ab}$	$0,708156^{b}$
1743 cm^{-1} (C=O)	0,2728	**0,0000***	$0,06031^{bc}$	$0,05859^{bc}$	$0,060978^{c}$	$0,05646^{ab}$	$0,052419^{a}$	$0,053959^{a}$	$0,079408^{d}$
2852 cm^{-1} (CH_2)	**0,0390***	**0,0032***	$0,018502^{a}$	$0,019306^{a}$	$0,019271^{a}$	$0,018541^{a}$	$0,018472^{a}$	$0,018988^{a}$	$0,020224^{b}$
2872 cm^{-1} (CH_3)	0,4417	**0,0000***	$0,008648^{b}$	$0,00911^{cd}$	$0,00889^{bc}$	$0,00942^{ad}$	$0,009656^{a}$	$0,009498^{a}$	$0,008046^{e}$
2922 cm^{-1} (CH_2)	0,4247	**0,0000***	$0,022403^{b}$	$0,02157^{bc}$	$0,022698^{b}$	$0,02022^{ac}$	$0,018935^{a}$	$0,019801^{a}$	$0,028161^{d}$
2956 cm^{-1} (CH_3)	0,5896	**0,0000***	$0,010341^{a}$	$0,01063^{bc}$	$0,01049^{ab}$	$0,01080^{cd}$	$0,011133^{e}$	$0,01090^{de}$	$0,009842^{f}$
3012 cm^{-1} (CH=CH)	**0,0000***	**0,0038***	$0,00108^{bc}$	$0,001132^{b}$	$0,001131^{b}$	$0,00101^{abc}$	$0,000866^{a}$	$0,000900^{a}$	$0,00096^{ac}$
2956 cm^{-1}/2922 cm^{-1} (CH_3/ CH_2)	0,4748	**0,0000***	$0,463504^{a}$	$0,493563^{a}$	$0,467744^{a}$	$0,539444^{b}$	$0,588198^{c}$	$0,55501^{bc}$	$0,352521^{d}$

Tabla D.2. Bandas seleccionadas por el procedimiento paso a paso ascendente para el Análisis Discriminante (ADG) de los espectros de queso Emmental.

Bandas (cm^{-1})	**GL[#]**	**F exclusión***	**P exclusión***	**Bandas (cm^{-1})**	**GL[#]**	**F exclusión***	**P exclusión***
1122	6	241,84844	0,00005	1734	6	12,61817	0,01412
1138	6	289,01083	0,00003	1763	6	11,93097	0,01564
1335	6	57,09237	0,00079	1792	6	38,27062	0,00172
1350	6	51,21485	0,00097	1794	6	32,68661	0,00233
1460	6	35,15227	0,00203	2835	6	62,74534	0,00065
1462	6	11,33005	0,01718	2839	6	222,81553	0,00005
1475	6	538,07978	0,00001	2858	6	127,00360	0,00016
1483	6	396,62733	0,00002	2875	6	277,29529	0,00003
1512	6	172,75478	0,00009	2887	6	6,78221	0,04252
1632	6	230,46562	0,00005	2895	6	9,48551	0,02366
1678	6	165,35167	0,00010	2981	6	131,57051	0,00015
1724	6	157,29492	0,00011	2997	6	126,51163	0,00016

[#] GL: Grados de libertad

* F exclusión = 0,05; P exclusión = 0,05

Tabla D.3. Distancias Mahalanobis al cuadrado para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Calibración.

Valores de Clasificación	d20	d27	d34	d51	d58	d65	AM
d20	21	4261693	4348872	3617592	3900597	4128061	4942699
d20	15	4254816	4341668	3610816	3893209	4120190	4934630
d20	19	4256884	4343834	3612863	3895467	4122421	4937050
d20	21	4254008	4340787	3609842	3892147	4118620	4933313
d20	18	4253787	4340742	3609624	3892204	4119019	4933308
d27	4253109	20	2643	44423	35679	97809	74692
d27	4266254	17	2497	45459	36273	98078	73628
d27	4250678	12	2432	43558	34745	96074	73650
d27	4263213	17	2359	44799	35559	96931	73168
d27	4247922	16	2564	43809	35099	97307	74946
d34	4343488	2534	22	44180	28050	75720	52493
d34	4344608	2562	14	44182	27924	75388	52266
d34	4338737	2592	21	43466	27447	74785	52083
d34	4345612	2376	21	44361	28431	76454	52476
d34	4343459	2445	18	44499	28350	76302	53201
d51	3615374	44093	43738	19	8674	48903	110541
d51	3612621	44288	44041	20	8957	49462	111260
d51	3609500	44584	44383	20	9048	49638	111835
d51	3611097	44683	44389	19	8979	49326	111486
d58	3896739	35483	28020	9116	21	24319	69085
d58	3895959	35764	28260	8812	21	24032	68791
d58	3894776	35306	27918	8893	21	24483	69321
d58	3891307	35274	27915	8796	21	24529	69426
d58	3894853	35550	28100	8964	21	24294	69183
d65	4124153	96671	75189	49126	24113	20	52420
d65	4122492	97888	76270	49805	24699	19	53043
d65	4123318	96996	75475	49390	24292	15	52589
d65	4115483	97362	75961	48873	24228	16	53313
d65	4122863	97288	75749	49463	24311	20	52896
AM	4938828	73943	52459	111528	69480	53335	19
AM	4933902	73045	51689	110630	68586	52907	21
AM	4937067	74251	52697	111489	69389	52940	21
AM	4931778	74147	52602	110851	68676	52125	20
AM	4939433	74718	53078	111910	69675	52968	21

Tabla D.4. Prueba de significancia de la Distancia Mahalanobis al cuadrado (p< 0,05).

Valores de clasificación	**d20**		**d27**		**d34**		**d51**	
	F	**p**	**F**	**p**	**F**	**p**	**F**	**p**
d20			65682,39	0,00000	67024,10	0,00000	49549,09	0,00000
d27	65682,39	0,00000			38,31	0,00142	608,96	0,00001
d34	67024,10	0,00000	38,31	0,00142			605,19	0,00001
d51	49549,09	0,00000	608,96	0,00001	605,19	0,00001		
d58	60103,49	0,00000	547,14	0,00001	432,43	0,00001	122,02	0,00014
d65	63605,61	0,00000	1500,36	0,00000	1168,38	0,00000	676,45	0,00000
AM	76175,63	0,00000	1141,98	0,00000	809,94	0,00000	1526,21	0,00000

Tabla D.4. Continuación...

Valores de clasificación	d58		d65		AM	
	F	p	F	p	F	p
d20	60103,49	0,00000	63605,61	0,00000	76175,63	0,00000
d27	547,14	0,00001	1500,36	0,00000	1141,98	0,00000
d34	432,43	0,00001	1168,38	0,00000	809,94	0,00000
d51	122,02	0,00014	676,45	0,00000	1526,21	0,00000
d58			375,16	0,00002	1066,98	0,00000
d65	375,16	0,00002			815,34	0,00000
AM	1066,98	0,00000	815,34	0,00000		

Tabla D.5. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Calibración.

Valores de Clasificación	d20	d27	d34	d51	d58	d65	AM
d20	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d20	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d20	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d20	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d20	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d27	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d27	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d27	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d27	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d27	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d34	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d34	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d34	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d34	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d34	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d51	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
d51	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
d51	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
d51	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
d58	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
d58	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
d58	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
d58	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
d58	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
d65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
d65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
d65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
d65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
d65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
AM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
AM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
AM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
AM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
AM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000

Tabla D.6. Distancias Mahalanobis al cuadrado para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Validación Cruzada.

Valores de Clasificación	d20	d27	d34	d51	d58	d65	AM
d20	658	4339007	4428119	3691818	3978675	4211808	5031485
d20	4548532	5077	4949	75089	55568	113999	62787
d27	4230892	220	3561	45229	37089	102357	81246
d27	4285751	83	1998	46076	35828	96043	70798
d34	4382765	1283	920	51651	36849	91207	58677
d34	4307523	2633	147	40244	24790	71861	53190
d51	4125794	45862	34897	22619	10458	18733	39400
d51	3061734	133058	134752	28568	51874	91980	229746
d58	3722685	61743	52430	10751	4203	20563	93133
d58	3636500	64347	56845	9300	6278	28462	109291
d65	4463571	109668	82560	84044	44673	7151	32794
d65	4294284	115849	90233	72041	39839	2928	44107
AM	5586709	177703	142576	238233	168953	115786	26082
AM	5102637	88410	65814	137337	91321	71670	1708

Tabla D.7. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Validación Cruzada.

Valores de Clasificación	d20	d27	d34	d51	d58	d65	AM
d20	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
*d20	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
d27	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
d27	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
d34	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
d34	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
*d51	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
d51	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
d58	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
d58	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
d65	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
d65	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
AM	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
AM	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000

* Clasificaciones incorrectas

Tabla D.8. Distancias Mahalanobis al cuadrado para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Predicción.

Valores de Clasificación	d20	d27	d34	d51	d58	d65	AM
d20	4418886	2615,4	522,8	53071,9	35254,67	84847,0	52169,0
d20	4362541	784,6	1961,9	54556,9	41021,72	101058,8	68539,6
d27	4117013	1642,2	7275,7	39987,7	37144,74	107874,9	95514,6
d27	4008898	8729,8	19880,3	48404,1	54235,26	141501,0	131178,2
d34	4322880	304,3	2360,9	51152,3	40147,72	101566,4	71261,2
d34	4498287	6460,1	1543,5	57670,8	35296,89	76758,5	40420,7
d51	3983376	28092,8	22187,2	9879,9	3416,72	29516,9	56274,1
d51	3569866	42422,9	43221,3	2670,9	9932,54	57118,2	125142,9
d58	3897252	48662,4	37825,1	14409,2	1742,25	16671,6	70139,8
d58	3124403	125185,4	124469,0	25824,4	44003,98	80084,8	214085,2
d65	4863810	132777,4	100869,2	133171,1	80648,03	31192,1	20089,3
d65	4515873	120061,2	91946,9	92366,4	52645,65	9862,7	31135,9
AM	5182245	110107,0	81463,8	156998,2	99694,88	67550,0	7357,3
AM	5201790	93519,3	68145,6	152885,8	97212,09	76857,3	6795,9

Tabla D.9. Probabilidad de clasificación para los espectros de infrarrojo de las muestras individuales de queso Emmental en el grupo de Predicción.

Valores de Clasificación	d20	d27	d34	d51	d58	d65	AM
*d20	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
*d20	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d27	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d27	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
*d34	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
d34	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
*d51	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
d51	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
d58	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
*d58	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000
*d65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
d65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
AM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000
AM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000

* Clasificaciones incorrectas