

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

“INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS NATIVAS DE LA LECHE LIPOPROTEÍNA LIPASA Y PLASMINA EN LA LIPÓLISIS Y LA PROTEÓLISIS DE QUESOS DUROS DE PASTA COCIDA”

María Ayelén Vélez

Director de Tesis: Dra. Erica Rut Hynes
Co-director de Tesis: Dra. María Cristina Perotti

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

-2013-

Brújula

**Todas las cosas son palabras del
idioma en que Alguien o Algo, noche y día,
escribe esa infinita algarabía
que es la historia del mundo. En su tropel**

**pasan Cartago y Roma, yo, tú, él,
mi vida que no entiendo, esta agonía
de ser enigma, azar, criptografía,
y toda la discordia de Babel.**

**Detrás del nombre hay lo que no se nombra;
hoy he sentido gravitar su sombra
en esta aguja azul, lúcida y leve,**

**que hacia el confín de un mar tiende su empeño,
con algo de reloj visto en un sueño
y algo de ave dormida que se mueve.**

Jorge Luis Borges.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por su aporte a la realización de la presente tesis a través de su programa de becas doctorales.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) perteneciente a la Universidad Nacional del Litoral por posibilitar la realización de esta tesis a través del Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al Instituto de Lactología Industrial (Facultad de Ingeniería Química/CONICET) por brindarme el lugar de trabajo para realizar el estudio doctoral.

A los miembros del Jurado, por el interés y tiempo dedicados a la evaluación de la presente tesis.

A mi directora Erica Hynes y a mi co-directora Cristina Perotti, quienes me formaron en la investigación científica y me guiaron constantemente en la realización de la presente tesis. Por su ejemplo, la confianza depositada en mí y la calidad de su persona. Por todo lo compartido, por alentarme en momentos de incertidumbre.

A Susana Palma, por ayudarme a dar los primeros pasos en el INLAIN, brindándome humildemente todos sus conocimientos y su experiencia. Por su colaboración con los análisis fisicoquímicos. Por las charlas y su aliento constante.

A Carlos Meinardi y Mario Candioti, por su colaboración en las elaboraciones de queso en la planta piloto, por su alegría y buena voluntad al contestar siempre a todas mis preguntas y escuchar mis dudas.

A Carina Bergamini, Silvina Rebechi y Verónica Wolf, por sus valiosos aportes en la realización de la presente tesis. Por los buenos momentos compartidos.

A Liliana Forzani, por darme la posibilidad de trabajar con ella, y brindarme sus conocimientos en estadística. Por su confianza.

A todos los miembros del INLAIN, porque fue sumamente agradable trabajar en el Instituto.

A mis compañeros, por la amistad, los buenos momentos, las charlas, los mates, las risas y su aliento. Por compartir la Sala de Becarios. Gracias Claudia, Manqui, Silvi, Diego, Guille, Dani, Leila, Caro, Flor, Facu, Patri, Sofí.

A mis amigos, especialmente a Ludmi, Nare, Moni y Li, por su apoyo y aliento para la finalización de esta tesis.

A mis hermanos: Jai, Gus y Lore, por su comprensión y su apoyo constante e incondicional.

A mi padre y a mi madre, porque son mi ejemplo de esfuerzo y perseverancia, por inculcarme el valor de caminar con dignidad. Por apoyarme siempre.

RESUMEN

La manufactura del queso consiste básicamente en un proceso de deshidratación, donde la grasa y las caseínas de la leche se concentran, y que prosigue con la etapa de maduración que lleva al producto final, con características únicas de aroma, textura y flavour. La transformación de la cuajada en queso es consecuencia de cambios físicos y complejas reacciones químicas y bioquímicas, todos ellos de gran influencia en las características finales de los productos, que involucran la difusión de sales, la evaporación del agua, los equilibrios químicos del calcio, la degradación de hidratos de carbono, proteínas y lípidos.

La proteólisis es el conjunto de reacciones de hidrólisis que tiene lugar sobre las caseínas intactas y sobre los péptidos derivados de ellas. La hidrólisis inicial de las caseínas es producida por el coagulante y por la enzima nativa plasmina, lo cual resulta en la formación de péptidos largos que luego son degradados por enzimas de la microflora perteneciente y no perteneciente al fermento. La formación de péptidos y de aminoácidos libres contribuye al flavour, por actuar como precursores de compuestos de gran impacto en el aroma.

La lipólisis es la hidrólisis enzimática de los triglicéridos para dar ácidos grasos libres (AGL, desde $C_{4:0}$ hasta $C_{18:2}$), glicerol, mono y diglicéridos. En algunos tipos de quesos la lipólisis es indeseable, pero en quesos duros italianos o en el queso Reggianito, una lipólisis moderada es deseable ya que contribuye al desarrollo del flavour genuino. En este tipo de queso los agentes lipolíticos son la lipasa nativa de la leche, lipoproteína lipasa (LPL), y las enzimas de los fermentos lácticos y bacterias lácticas no pertenecientes al fermento. En la leche cruda la hidrólisis enzimática no se produce espontáneamente debido a que las enzimas lipolíticas y su sustrato se encuentran compartimentalizados: los TG dentro de glóbulos rodeados por una membrana, la LPL asociada a la fase proteica. Sin embargo, los procesos físicos aplicados a la leche antes de la elaboración de quesos (agitación mecánica, bombeo, homogeneización) pueden disminuir la acción protectora de la membrana del glóbulo graso y favorecer la lipólisis.

El objetivo de la presente tesis fue identificar cambios tecnológicos que, introducidos en la elaboración tradicional de queso Reggianito, favorecieran la actividad de enzimas nativas de la leche, lipoproteína lipasa y plasmina, en vistas a incrementar la lipólisis y proteólisis y de esta manera acelerar la maduración.

Para ello, en una primera etapa se implementaron tres modelos de queso en miniatura, que permitieron ensayar las intervenciones tecnológicas propuestas en una escala reducida y con rapidez y simplicidad de manipulación. Se obtuvieron cuajadas miniatura, pseudocuajadas y

miniquesos de baja humedad y pasta cocida. Las matrices alimentarias así preparadas resultaron de composición reproducible y se aplicaron en las experiencias llevadas a cabo en la presente tesis.

Para incrementar la lipólisis en los quesos, en primer lugar se ensayó un tratamiento físico de agitación mecánica y bombeo para incrementar la accesibilidad de las enzimas lipolíticas a los TG. Se estudiaron mezclas de leche y crema de distintos porcentajes de grasa (5%, 15% y 30%) a distintas temperaturas (5, 15 y 45°C) y el daño a la membrana del glóbulo graso se estimó mediante la medida de la grasa liberada y observación microscópica. Las condiciones más apropiadas para tratar la crema fueron a 5°C y 30% de contenido graso, bajo agitación mecánica a 2800 rpm durante 2 min. Una vez seleccionado el tratamiento, se aplicó a la elaboración de cuajadas miniatura, donde se evaluó la retención de materia grasa. El tratamiento no incrementó la pérdida de grasa en el suero ni causó detrimento alguno en la coagulación y en la sinéresis de la cuajada, por lo que se aplicó a la elaboración de quesos miniatura. En esta matriz se evaluó la influencia del pre-tratamiento físico y de la pasteurización de la leche en la lipólisis y la producción de compuestos volátiles durante la maduración. Los factores estudiados no influyeron sobre el incremento de los ácidos grasos libres totales: el nivel de lipólisis promedio global se incrementó de manera similar durante la maduración de todos los quesos, hayan sido elaborados con leche cruda o pasteurizada, y con tratamiento mecánico de agitación o no. En cuanto al perfil de los AGL, los ácidos grasos cortos (C_{4:0} – C_{8:0}) fueron significativamente afectados, siendo mayor la proporción en los quesos elaborados con leche cruda. Este incremento puede ser atribuido tanto a la acción de la LPL como a las enzimas lipolíticas microbianas, y reviste importancia ya que estos ácidos grasos tienen una influencia directa en el flavour. Además, en ausencia de tratamiento térmico y en algunos casos bajo condiciones que favorecieron la descompartmentalización enzima-sustrato, se produjeron cantidades incrementadas de compuestos volátiles derivados de la grasa, como la 2-heptanona y la 2-nonanona, el hexanoato de etilo, butanoato de etilo y butanoato de isoamilo. De esta experiencia, pudo apreciarse que el pre-tratamiento de la leche de elaboración por agitación tuvo un impacto bajo en la lipólisis, ya que sólo en algunos casos fue significativo y siempre interaccionando con el tratamiento térmico; además quedó en evidencia que los cambios favorables en lipólisis y producción de aromas derivados de la grasa se obtuvieron sólo en presencia de leche cruda. Por ello, se profundizó el estudio acerca de la accesibilidad enzima-sustrato mediante una nueva experiencia de elaboración de miniquesos, en los que el tratamiento de desestabilización del glóbulo graso fuera más energético. Esta consistió en la aplicación de una etapa de homogeneización de la fracción grasa

de la leche de elaboración, y en todos los casos se trabajó con leche cruda. A diferencia de la experiencia anterior, se observó un aumento inicial significativo de la concentración total promedio de los ácidos grasos libres en quesos elaborados con crema homogeneizada con respecto a los quesos controles. En efecto, en los quesos elaborados con leche homogeneizada se alcanzaron niveles máximos de lipólisis en los primeros días, mientras que en los quesos controles dichos niveles se incrementaron gradualmente durante la maduración. En cuanto al perfil de ácidos grasos, a los 3 días las concentraciones de los ácidos grasos cortos y medios fueron superiores en los quesos elaborados con leche homogeneizada, siendo el C_{10:0} el ácido graso más abundante. En los quesos controles las concentraciones de estos ácidos fueron similares entre sí. A los 90 días, se observó una diferenciación en el perfil con respecto al inicial, ya que el ácido graso más abundante en quesos controles y homogeneizados fue el C_{4:0}. Los ácidos grasos C_{4:0}, C_{6:0} y C_{8:0} presentaron valores similares en quesos controles y experimentales, y C_{10:0} y C_{12:0} mostraron concentraciones significativamente superiores en los quesos homogeneizados. Al igual que el aumento inicial de lipólisis encontrado en los quesos homogeneizados, estas diferencias en los ácidos grasos en particular se explican en la mayor accesibilidad lograda para las enzimas lipolíticas a su sustrato, especialmente la LPL que se encuentra activa en quesos de leche cruda. Al final de la maduración, los niveles de ácidos grasos libres totales eran similares en todos los quesos. Estos resultados indican que la estrategia de aumento de contacto grasa – enzimas lipolíticas fue exitosa para acelerar la reacción enzimática de lipólisis.

Respecto a la intensificación de la proteólisis, se evaluaron las variables: pH de drenado de suero, temperatura de cocción de la cuajada, e incorporación de una etapa de lavado de la cuajada, sobre la actividad de la enzima plasmina y su contribución a la proteólisis en pseudocuajadas modelo. El aumento del pH y el lavado de la cuajada afectaron positivamente la actividad de la enzima plasmina y aumentaron su acción en la proteólisis de las pseudocuajadas modelo, lo que fue evidenciado en perfiles de péptidos solubles. No se detectó una influencia de la temperatura de cocción en la acción de la enzima. Si bien la actividad residual de coagulante no era objeto de estudio en esta tesis, pudo observarse que su acción se favoreció por la disminución del pH de drenado de suero y la disminución de la temperatura de cocción, y que el lavado no modificó significativamente su acción. Estos resultados se correspondieron con incrementos en la proteólisis detectados tanto por perfiles de péptidos solubles como por electroforesis y fracciones nitrogenadas. El tiempo de almacenamiento de las pseudocuajadas, seleccionado en 7 días, fue suficiente para realizar un screening de tratamientos favorables a la acción de la enzima plasmina, pero probablemente

debe prolongarse si se desea caracterizar mejor su actividad. En efecto, la mayor actividad de esta enzima se reflejó solamente en los perfiles peptídicos, pero no mediante fracciones nitrogenadas o electroforesis.

Finalmente, se diseñó una tecnología modificada teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los modelos, que se validó mediante una experiencia de elaboración a escala piloto. Se seleccionaron los cambios que resultaron más favorables para incrementar las actividades enzimáticas de interés y se evaluó su influencia sobre la proteólisis, lipólisis y la calidad sensorial de los quesos obtenidos. Se realizaron dos elaboraciones en paralelo, una siguiendo la tecnología tradicional para quesos duros de pasta cocida- leche pasteurizada, temperatura de cocción 52°C y sin aplicación de lavado a la cuajada - y otra aplicando la tecnología modificada -fracción grasa homogeneizada, temperatura de cocción 50°C e incluyendo una etapa de lavado-. Los quesos duros de pasta cocida tipo Reggianito con tecnología modificada mostraron una maduración acelerada, basada tanto en un incremento en la velocidad de lipólisis como en la velocidad de hidrólisis de las caseínas, especialmente debido a la acción del coagulante. No mostraron rancidez, y el flavour genuino y picante se desarrolló más rápido y sin defectos. Los quesos se retiraron de maduración a los 60 días debido al avance de la lipólisis y a que alcanzaron un flavour completamente maduro. La textura no siguió la evolución típica de un queso duro de pasta cocida, ya que en ese tiempo de 60 días, los quesos elaborados con tecnología modificada no alcanzaron una textura dura y quebradiza, mientras que el control evolucionaba en ese sentido.

En el presente trabajo se obtuvo información novedosa acerca de la influencia del estado de la materia grasa de la leche y del tratamiento térmico en la reacción de lipólisis que tienen lugar durante la maduración. También se produjo nueva evidencia sobre la influencia del pH al momento de drenar el suero, los tratamientos térmicos de cocción, y la solubilización de componentes del sistema plasmina-plasminógeno, en la actividad de la plasmina en el queso y en su acción proteolítica. En base a ello, se propuso un cambio en la tecnología de elaboración de queso en vistas a incrementar la acción de enzimas naturalmente presentes en la leche y de esta manera acelerar la maduración. Dicha intervención tecnológica demostró ser exitosa, especialmente desde el punto de vista del incremento de la lipólisis, y la consecuente formación de flavour maduro y genuino en un tiempo más corto, sin consecuencias negativas o flavour atípico.

ABSTRACT

Cheese-making is a dehydration process by which fat and caseins of milk are separated from whey; it continues with the ripening phase that changes curd into cheese. While curds are all alike, different cheeses have unique characteristics of aroma, texture and flavour due to complex chemical and biochemical reactions that take place during ripening, including salt diffusion, water evaporation, calcium equilibrium, carbohydrates fermentation, and hydrolysis of proteins and lipids.

Proteolysis involves a series of biochemical events that confer cheeses unique characteristics of taste, aroma and texture according to the variety. The initial breakdown of caseins during cheese ripening is mediated by the coagulant and the native enzyme plasmin, which results in large peptides degraded subsequently by the same enzymes plus enzymes from the starter and non-starter lactic acid bacteria. The formation of peptides and free amino acids contributes to flavour, directly or indirectly as they are precursors of key flavour compounds.

Lipolysis is the enzymatic hydrolysis of triglycerides to free fatty acids (FFAs, from C4:0 to C18:2) and glycerol, mono or diglycerides. In several cheese varieties such as Cheddar or Dutch type cheeses, little lipolysis occurs during ripening, and extensive FFAs production is considered undesirable as rancid flavour may develop; but in Italian-type hard cooked cheeses and Reggiano cheeses moderate to extensive lipolysis is an advantage, as it contributes favorably to cheese flavour. In this type of cheeses the enzymes responsible for lipolysis include the indigenous milk lipase (lipoprotein lipase, **LPL**), and microbes that develop during cheese ripening either intentionally (starter bacteria) or unintentionally (non-starter acid bacteria) at significant numbers. In raw milk, the enzymatic hydrolysis of milk fat is not spontaneous, as triglycerides are surrounded by a thin layer of surface-active material called the milk fat globule membrane (**MFGM**), and LPL is associated to the protein phase. However, if this membrane is damaged by physical treatments (e.g., homogenization, agitation, foaming, freezing), significant lipolysis may occur.

The objective of the present thesis was to identify technological steps that, by modifying the standard cheese-making technology of Reggiano cheese, enhance the activities of indigenous enzymes plasmin and LPL in order to increase lipolysis, proteolysis and therefore accelerate ripening.

First, three cheese models were set up to assess the effect of the proposed technological changes in a reduced scale, ensuring simple and reproducible experiments. Miniature curds,

pseudo-curds and low-moisture cooked cheeses were obtained. The food matrixes prepared this way had a reproducible gross composition and pH, experimental manipulation to obtain them was simpler than traditional cheese-making experiments, and the models were applied in the following trials of the present work.

In order to enhance cheese lipolysis, two physical treatments were studied: mechanical agitation and pumping, which were applied to increase the accessibility of lipolytic enzymes to triglycerides by means of fat globule membrane damage. The influence of temperature (5, 15 and 45°C) and fat content (5, 15 y 30%) at which the treatments were applied was also investigated. The damage to fat globules membrane was evaluated by measuring free fat content and by microscopic observation. The conditions chosen were: cream of 30% fat at 5°C, treated by mechanical agitation at 2800 rpm for 2 minutes. Once the treatment was selected, it was applied to milk for miniature curd making, in which fat retention was studied. Physical pre-treatment of the milk did not increase fat loss in the whey; detrimental effects were observed neither in the coagulation step nor in curd syneresis. Taking into account these results, we applied the mechanical treatment tested in miniature cheese-making. In this model we assessed the influence of two factors, physical pre-treatment of cheese milk and pasteurization, on the lipolysis profile and in the production of volatile compounds during cheese ripening. The factors studied did not influence on the total FFAs content: the lipolysis levels increased in a similar way in all cheeses. As for the FFAs profile, the short chain FFAs (C_{4:0}-C_{8:0}) proportions showed significant differences: the highest levels regarding to the total FAA were found in cheeses made with raw milk. This increase may be attributed to the activity of LPL and microbial enzymes, and it is relevant due to the direct impact of short chain FFAs in cheese flavour. Increased amounts of volatile compounds derived from lipolysis and FFA metabolism were also produced when thermal treatment was not applied, and in some cases, under conditions that promoted the accessibility of enzymes to substrate. Such compounds were 2-heptanone, 2-nonanone, ethyl hexanoate, ethyl butanoate and isoamyl butanoate. From this experience, it could be observed that the mechanical pre-treatment of milk had a relatively low impact on lipolysis, as it influence was significant on the characteristics of the FFA profile and the production of key odorants, only when interacting with thermal treatment factor. Favorable changes in miniature cheeses lipolysis and volatile production were, as a matter of fact, always found in cheeses made with raw milk. Because of this, a new experience was lay out, directed to obtain a more effective approach to the study of the milk fat globule destabilization and fat globule membrane damage. Miniature cheeses were made in which a homogenization step was applied to milk

fat before milk fat content adjustment and cheese-making; all the cheeses in this trial were made with raw milk. Unlike in the previous trial, an initial increase in the total concentration of FFAs was observed in the cheeses treated with a homogenization step: FFAs level reached a maximum in the first days, while in the control it increased gradually during ripening. As for the FFAs profile, at 3 days the concentrations of short and medium free fatty acids were higher in cheeses made with homogenized milk, being C_{10:0} the major FFA. In control cheeses, short and medium FFAs had similar levels among them at 3 days. C_{4:0} became the most abundant FFA in both control and experimental cheeses at the end of the ripening. The fatty acids C_{4:0}, C_{6:0} and C_{8:0} presented similar values in all cheeses, and C_{10:0} and C_{12:0} were higher in the homogenized ones. Like the initial increase of the lipolysis level in the homogenized cheeses, the differences found in short and medium fatty acids could be explained by the enhanced accessibility of the lipolytic enzymes, especially LPL, to their substrate. The results point out that increasing the contact between the fat and lipolytic enzymes was a successful strategy to accelerate the reaction of lipolysis.

In respect of proteolysis, the effect of whey draining pH, cooking temperature and washing of the curd on plasmin activity and proteolysis were assessed in a pseudo-curd model. The increase of pH at whey draining and washing of the curd had a positive effect positively plasmin activity and increased its action on proteolysis, which was evidenced in soluble peptide profiles. No impact of increased cooking temperature was observed on plasmin activity. Although the study of coagulant activity was not an objective of the present thesis, it was observed that lower pH values at whey draining and a decrease in curd cooking temperature increased its activity on caseins; washing of the curd had no significant influence on coagulant enzyme. These results were consistent with the proteolysis enhancement detected by peptide profiles, electrophoresis and nitrogen fractions. Time of ripening of pseudo-curds, settled in 7 days, was enough to screen treatments and to select those that enhanced plasmin activity, but probably it should be extended if a best characterization of proteolysis is needed. Indeed, increased plasmin activity was only evidenced by peptide profiles, but not by nitrogen fractions or electrophoresis.

Finally, according to the results obtained in mini-cheeses and curd models, a modified technology was lay out to be validated at pilot plant scale. The technological steps chosen were the most favorable to increase the enzymatic activities of interest; their influence was assessed on proteolysis, lipolysis and sensory profile of the cheeses. Two cheese-makings were performed in parallel, one following the standard technology for Reggiano type hard cooked cheeses – pasteurized milk, cooking temperature of the curd 52°C, no washing step –

and another applying the modified technology – no thermal treatment (raw milk), homogenization of cheese milk, cooking temperature of the curd 50°C and a curd washing step. Ripening was accelerated in the cheeses obtained by the modified technology, based on increased lipolysis and proteolysis rates, the last especially due to coagulant-mediated casein hydrolysis. Concomitantly, pungent/piquant and genuine flavour developed faster, and no defect arose. Although FFAs total content was 6-times higher in the experimental cheeses than in the control, they did not develop rancid off flavour. Ripening was stopped at 60 days because the flavour was fully mature in experimental cheeses. Texture did not have the typical evolution of a hard cooked cheese, as at 60 days the experimental cheeses did not reach the typical hardness and grainy texture, while control cheeses were evolving in that sense.

In this doctoral thesis, novel information about the influence of milk fat structure and thermal treatment on lipolysis during cheese ripening was produced. Furthermore, new evidence was obtained about the influence of pH at whey draining, curd cooking temperature, and solubilization of components of the plasminogen/plasmin system on the final plasmin activity and its proteolytic effect. Based on these results, a modified technology was proposed addressing the increase of enzyme activities naturally present in the milk to accelerate ripening. The proposed innovation in cheese-making technology proved to be successful, mainly at increasing lipolysis, which derived in the formation of genuine flavour in shorter time, without negative consequences or defects.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. La bioquímica de maduración de quesos	1
2. Agentes enzimáticos de origen no microbiano	5
2.1 La lipoproteína lipasa y otras enzimas lipolíticas en la maduración de quesos	5
2.2 La plasmina en la maduración de quesos	7
2.3 La enzima coagulante residual en la maduración de quesos	9
2.4 Microorganismos y enzimas que provienen de ellos	10
3. Tecnología quesera de elaboración y su impacto en el queso	12
4. Tecnología de elaboración de quesos Reggiano	17
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19

CAPÍTULO 1: "Implementación de modelos casearios experimentales para el estudio de lipólisis y proteólisis"

1. Introducción	20
2. Materiales y Métodos	22
2.1 Minicuajadas	22
2.2 Quesos miniatura de pasta dura cocida	25
2.3 Pseudocuajadas	26
2.4 Análisis	29
<i>pH</i>	29
<i>Humedad</i>	29
<i>Materia Grasa</i>	29
<i>Proteínas</i>	30
2.4 Resultados y Discusión	30
2.5 Conclusiones	33

CAPÍTULO 2: "Influencia del pre-tratamiento de la leche de elaboración en la lipólisis de quesos duros de pasta cocida"

1. Introducción	34
2. Selección del tratamiento físico	35
2.1. Materiales y Métodos	35
2.1.1. Diseño experimental	35
2.1.2. Preparación y pre-tratamiento de las mezclas de crema-leche descremada	35
2.1.3 Análisis	37
<i>Grasa libre</i>	37
<i>Microscopía de contraste de fases</i>	37
<i>Grasa total en leche</i>	37
<i>Grasa total en crema</i>	38
2.2 Resultados	38
<i>Selección de las condiciones operativas del tratamiento mecánico</i>	38
<i>Pre-tratamiento de las mezclas</i>	39
3. Aplicación del tratamiento seleccionado en un modelo de minicuajadas	40
3.1 Materiales y Métodos	40
3.1.1 Preparación de minicuajadas	40
3.1.2 Análisis	41
<i>Grasa total en minicuajadas</i>	41

<i>Grasa total en suero</i>	41
<i>Humedad</i>	41
<i>Análisis Estadístico</i>	41
3.2 Resultados	41
<i>Preparación de minicuajadas</i>	41
4. Influencia del pre-tratamiento de la leche (tratamiento térmico y agitación mecánica) sobre la lipólisis y producción de compuestos volátiles en quesos duros miniatura	42
4.1 Materiales y Métodos	42
4.1.1 Diseño experimental.....	42
4.1.2 Pre-tratamiento de la leche.....	43
4.1.3 Elaboración de quesos.....	44
4.1.4 Análisis.....	44
<i>Grasa libre y total</i>	44
<i>Composición química global y pH</i>	44
<i>Contenido de Nitrógeno Soluble (NS-pH 4.6)</i>	44
<i>Análisis de Ácidos grasos libres</i>	45
<i>Compuestos volátiles por GC/FID-MS</i>	46
<i>Análisis microbiológico</i>	47
<i>Análisis estadístico</i>	47
4.2 Resultados	47
<i>Eficiencia del tratamiento mecánico</i>	47
<i>Composición global, recuentos microbianos y proteólisis</i>	47
<i>Lipólisis en quesos</i>	49
<i>Compuestos Volátiles</i>	54
5. Influencia de la homogeneización en la lipólisis de quesos duros miniatura (5L)	57
5.1 Materiales y Métodos	58
5.1.1 Diseño experimental.....	58
5.1.2 Preparación de la leche de elaboración	58
5.1.3 Elaboración de quesos.....	59
5.1.4 Análisis.....	59
<i>Microcopia de contraste de fases</i>	59
<i>Determinación de grasa libre</i>	59
<i>Análisis de composición química global de los quesos</i>	60
<i>Contenido de Nitrógeno Soluble (NS-pH 4.6)</i>	60
<i>Análisis de Ácidos grasos libres</i>	60
<i>Análisis microbiológico</i>	60
<i>Análisis estadístico</i>	60
5.2 Resultados	60
<i>Pre-tratamiento de la leche de elaboración</i>	60
<i>Composición global, recuento microbiano y proteólisis</i>	62
<i>Lipólisis</i>	63
6. Discusión.....	67
7. Conclusiones	80

CAPÍTULO 3: “Efecto del pH, la temperatura de cocción y el lavado de la cuajada sobre la actividad de plasmina en pseudocuajadas modelo”

1. Introducción	81
2. Materiales y Métodos	82
2.1. Diseño experimental.....	82
2.2. Preparación de pseudocuajadas	82

2.3. Determinaciones analíticas.....	84
<i>pH, contenido de humedad y proteína</i>	84
<i>Actividad de plasmina</i>	84
<i>Nitrógeno soluble a pH 4.6 (NS-pH 4.6)</i>	85
<i>Electroforesis (Urea-PAGE)</i>	86
<i>Perfiles peptídicos por RP-HPLC</i>	86
2.4. Análisis estadístico	86
3. Resultados	87
3.1. Composición de las pseudocuajadas	87
3.2 Actividad del sistema plasmina – plasminógeno en pseudocuajadas	89
3.3 Proteólisis.....	90
<i>N soluble a pH 4,6 y electroforesis</i>	90
<i>Perfiles peptídicos</i>	93
4. Discusión.....	95
5. Conclusiones	101

CAPÍTULO 4: "Validación a escala piloto de las estrategias tecnológicas seleccionadas"

1. Introducción	102
2. Materiales y Métodos	102
2.1 Diseño experimental.....	102
2.2 Pretratamiento de la leche	103
2.3 Elaboración de quesos.....	103
2.4. Determinaciones analíticas.....	105
<i>Grasa total</i>	105
<i>Composición química global y pH</i>	105
<i>Fracciones nitrogenadas</i>	105
<i>Electroforesis</i>	106
<i>Lipólisis</i>	106
<i>Actividad de plasmina y plasminógeno</i>	106
<i>Análisis microbiológico</i>	106
<i>Análisis sensorial</i>	106
3. Resultados	107
Composición global, recuentos microbianos y proteólisis.....	107
Actividad de plasmina – plasminógeno en quesos.....	109
Análisis Sensorial.....	113
4. Discusión.....	116
5. Conclusiones	121

CONCLUSIONES DEL TRABAJO DE TESIS	123
--	-----

BIBLIOGRAFÍA	125
---------------------------	-----

ABREVIATURAS

Abreviaturas generales

AGL: Ácidos Grasos Libres.

AGLT: Ácidos Grasos Libres Totales.

C: Control

E: Experimental

GC: Cromatografía Gaseosa

HPH: homogeneización a alta presión, acrónimo del inglés high pressure homogenization.

Lb.: Lactobacillus.

log: Logarítmico/s.

LPL: Lipoproteína lipasa

MG: materia grasa

NS-pH 4,6: Nitrógeno soluble a pH 4,6.

NS-PTA: Nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico.

NS-TCA: Nitrógeno soluble en ácido tricloroacético.

NT: Nitrógeno total.

PG: Plasminógeno

PL: Plasmina

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.

Urea – PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de urea.

Abreviaturas específicas de los diseños experimentales empleados en Capítulo 2:

A: Mezcla Agitada

N: Mezcla no Agitada

PA: Quesos elaborados con leche pasteurizada y mezcla agitada.

PN: Quesos elaborados con leche pasteurizada y mezcla no agitada.

AfA: Quesos elaborados con leche aflorada y mezcla agitada.

AfN: Quesos elaborados con leche aflorada y mezcla no agitada

C: Quesos Controles elaborados con mezcla no homogeneizada

H: Quesos experimentales elaborados con mezcla homogeneizada

Introducción y Objetivos

1. La bioquímica de maduración de quesos

Los quesos son alimentos que en general se definen en términos de concentración de los sólidos de la leche: el código alimentario Argentino (ANMAT, 2009) en su artículo 605 brinda la siguiente definición “Se entiende por Queso el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes”, que a su vez se condice con lo que propone la literatura de referencia (Fox y McSweeney, 2004). Por esta razón, una de las etapas claves de la fabricación del queso es la coagulación de la caseína, que como anticipa la definición, puede inducirse por acidificación, acidificación y calor, o mediante enzimas coagulantes, siendo esta última la metodología más común, ya que más del 75% de los quesos se obtiene de esta manera (Heller y col., 2003). A diferencia de la mayoría de los quesos coagulados por acidificación, que son consumidos inmediatamente luego de su elaboración, el proceso de producción de un queso coagulado enzimáticamente involucra también la etapa de maduración (CAA, art. 605, Figura 1).

Luego de la concentración de los sólidos, la eliminación del suero y la obtención de la cuajada o queso joven, la maduración del queso es el conjunto de cambios físicos y bioquímicos por el cual la cuajada, que tiene pobres características reológicas y sensoriales, se transforma en queso maduro, un producto muypreciado por sus buenas y diversas características de textura, aroma y sabor (Zalazar y col., 1999; Fox, 2011).

Esta transformación da origen a las diferentes variedades de quesos, ya que las cuajadas son todas similares entre sí, mientras que luego de la maduración se obtienen familias de productos con características muy diferentes. Los principales cambios físicos tienen que ver con el transporte de materia: la evaporación del agua y la difusión de la sal son los más conocidos, pero también ocurren otros, como la difusión de otros iones y moléculas pequeñas, y son de importancia los equilibrios químicos del calcio, y reacciones químicas no catabolizadas por enzimas, fenómenos que han sido mucho menos estudiados (Walstra y col., 1999a). Las reacciones bioquímicas involucran, en primer lugar, el metabolismo de la lactosa residual, del citrato y del lactato, la lipólisis y la proteólisis, y además incluyen el metabolismo de los aminoácidos y ácidos grasos (McSweeney, 2011).

La proteólisis durante la maduración del queso ha sido estudiada en profundidad y se considera que influye en las propiedades de fractura del queso y en el sabor de fondo. Es un conjunto de reacciones de hidrólisis que tiene lugar sobre las caseínas intactas y sobre los péptidos derivados de ellas, en el que actúa una gran cantidad de agentes enzimáticos y de organismos vivos disponibles en la matriz alimentaria (Fox y col., 2000). Desde el punto de vista cuantitativo, es el principal fenómeno que ocurre durante la maduración, y sin duda tiene relación con la calidad del producto final (Visser, 1991; Gobetti y DiCagno, 2003; O'Mahony y col., 2005). Además de esta influencia directa, los aminoácidos y oligopéptidos provenientes de la proteólisis, son precursores de una serie de transformaciones de gran impacto en la formación de flavour en las que interviene la microbiota del queso (Yvon y Rijnen, 2001).

En los quesos duros de pasta cocida, la proteólisis está caracterizada por una hidrólisis menos marcada de la caseína α_1 que en los quesos de pasta blanda y semidura, y por un aumento en la presencia de caseínas γ con una concomitante disminución de la caseína β y la α_2 (Battistotti y Corradini, 1993; Gobetti y DiCagno, 2003; Hynes y col., 2004).

Además, debido al tiempo de maduración prolongado y a los fermentos que contienen *Lactobacillus helveticus*, especie que alberga muchas cepas proteolíticas, los quesos duros suelen demostrar una elevada “profundidad” de proteólisis, esto es, una degradación de los péptidos grandes y medianos para dar oligopéptidos y aminoácidos libres, lo que se ha detectado por diversos índices (Battistotti y Corradini, 1993; Milesi y col., 2011).

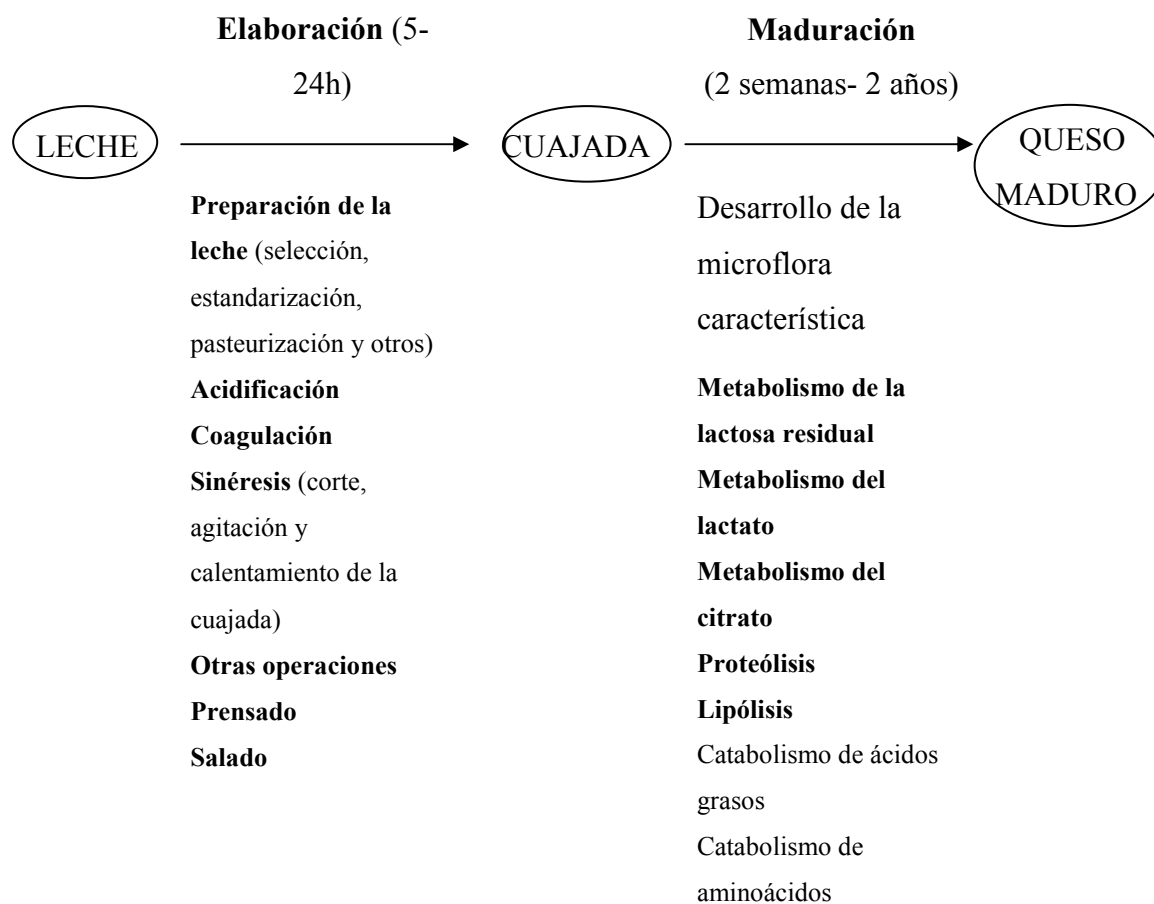


Figura 1. Esquema general de producción de quesos coagulados enzimáticamente (Fox y McSweeney, 2004).

Por otro lado, en la maduración de quesos el término lipólisis refiere en conjunto a las reacciones de hidrólisis de los triacilglicerol para dar di o monoacilglicerol, ácidos grasos libres (AGL) y glicerol. A diferencia de la proteólisis, es un fenómeno cuantitativamente minoritario en la mayoría de las variedades de queso, lo que constituye una ventaja para la mayoría de ellas, ya que puede volverse una reacción indeseable si las condiciones son desfavorables. En efecto, la lipólisis excesiva causa rancidez en productos lácteos, y en quesos particularmente cuando no es un rasgo típico de la maduración o cuando el pH y la humedad no permiten incrementarla sin desequilibrar el sabor (Michalski y col., 2004). En los quesos duros de pasta cocida la degradación de los triglicéridos para dar ácidos grasos libres y sus derivados es significativa, probablemente debido al largo periodo de maduración, que permite la expresión de la actividad lipolítica relativamente débil que está presente en el queso (Gobetti y Di Cagno, 2003). La lipólisis así desarrollada no genera sabores rancios ni off flavours, por el contrario, es una transformación necesaria para la formación del flavour

genuino de este tipo de producto, en el que los ácidos grasos libres (AGL) influyen directamente, especialmente los de cadena corta, que son volátiles. Además de aportar notas de flavour por sí mismos, los AGL pueden ser transformados por microorganismos en otros compuestos que impactan más fuertemente en el flavour, como las metilcetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehídos. La lipólisis, al igual que la proteólisis y la transformación de aminoácidos, tiene gran influencia en el desarrollo de aroma y sabor de quesos duros (Urbach, 1995; Yvon y Rijnen, 2001; Sousa y col., 2001).

Los agentes enzimáticos que aportan a la maduración del queso, como ya se ha mencionado, son numerosos, y provienen ya sea de un origen no microbiano – la leche, o los preparados enzimáticos que se agregan a ella – como de microorganismos, que en la matriz del queso pueden hallarse vivos o muertos, y con un diverso grado de integridad celular y actividad metabólica (McSweeney, 2011).

Las enzimas de origen no microbiano son principalmente tres, aunque existen muchas otras cuya importancia relativa se considera menor. Se trata de las enzimas nativas plasmina y lipoproteína lipasa, ambas nativas de la leche, y de la enzima coagulante, parte de la cual queda retenida en la cuajada luego de cumplir su función durante la transformación de leche en queso. Los aportes que realizan estas enzimas de origen no microbiano a la proteólisis y la lipólisis, han sido parcialmente dilucidados para algunas variedades de queso, pero se conocen poco para los quesos duros de pasta cocida. A su vez, entre estas enzimas, la acción del coagulante es la que ha recibido más atención, pero la plasmina y especialmente la lipoproteína lipasa, son ciertamente menos estudiadas.

En efecto, aunque existen algunas nociones generalmente reconocidas, como que la plasmina cumple un rol preponderante en la proteólisis primaria, y que la actividad del coagulante no es significativa en quesos duros (Battistotti y Corradini, 1993), estudios más recientes han encontrado evidencia contraria a algunas de estas afirmaciones (Kindstedt y col., 1995; Walsh y Xiaoshan Li, 2000; Hynes y col., 2004). Tampoco se ha verificado completamente la relación entre la proteólisis primaria y las modificaciones deseables de la textura de los quesos duros (O'Mahony y col., 2005), y si el aumento en algunas transformaciones enzimáticas clave puede traducirse en un real acortamiento de la maduración (Law, 2001; El Soda, 2003).

2. Agentes enzimáticos de origen no microbiano

2.1 La lipoproteína lipasa y otras enzimas lipolíticas en la maduración de quesos

En la leche, la grasa se encuentra emulsionada en forma de glóbulos. El tamaño de los mismos en leche de vaca se encuentra en un rango que va desde 0,1 a 20 μm de diámetro, con un promedio de alrededor de 4 μm ; el rango y el valor promedio varía con la especie, la alimentación, la estación del año y otros factores (Fox, 2011; Lopez, 2005; Lopez y col., 2007; MacGibbon y Taylor, 2006). El núcleo de los glóbulos está compuesto fundamentalmente por triglicéridos y se encuentra rodeado de una capa de material de superficie activo llamado membrana del glóbulo graso (MFGM por sus siglas en inglés: milk fat globule membrane). La composición de la membrana es variable, pero está integrada fundamentalmente por proteínas, glicoproteínas, fosfolípidos, triglicéridos, glicolípidos, esfingolípidos, colesterol, enzimas y otros constituyentes menores (Evers, 2004a). La función de la membrana es actuar como un emulsionante permitiendo que la grasa sea compatible con el ambiente acuoso de la leche, y protege a los glóbulos de la coalescencia y de la degradación enzimática. En efecto, la MFGM actúa como una barrera natural aislando a las enzimas lipolíticas de su sustrato (Fox, 2000a; Argov y col., 2008).

Las lipasas (EC 3.1.1.3, triacilglicerol hidrolasas) pueden catalizar la hidrólisis de uniones éster de triglicéridos para liberar AGL y glicerol en interfases aceite-agua de emulsiones y exhiben preferencia sobre triglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena larga (Deeth y Fitz-Gerald, 2006). Por su parte, las estererasas son hidrolasas que catalizan la hidrólisis de las uniones éster sólo en soluciones acuosas, prefieren los sustratos solubles en agua, y pueden hidrolizar sólo triglicéridos compuestos por ácidos grasos cortos (Holland y col., 2005). La lipasa natural de la leche es una lipoproteína lipasa (LPL, EC 3.1.1.34) que muestra especificidad hacia los ácidos grasos ubicados en la posición Sn-1 y Sn-3 del triglicérido (Collins y col., 2003). En la leche existe cierto resguardo de la actividad lipasa, originado en la compartimentalización de la enzima y el sustrato. La enzima está asociada a las caseínas a través de uniones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas (Deeth 2005) y la grasa, como ya se mencionó, se encuentra dentro de los glóbulos grasos, protegida por la membrana. Por esta razón, el factor clave para que la enzima actúe radica en el deterioro de la membrana del glóbulo graso, que en general se produce por daño físico asociado a la agitación, homogeneización, espumado o fluctuaciones de temperatura de la leche, entre otros (Fox y col., 1993; Choisy y col., 1997; Menéndez y col., 1999; McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2003; Muir y Banks; 2003). Además, la LPL se inactiva por acción de la luz ultravioleta, agentes oxidantes y ácidos y por los tratamientos térmicos,

requiriéndose temperaturas superiores a 60°C y pH inferior a 6,5 para su desnaturalización. Algunos autores han informado que la enzima se inactiva totalmente durante la pasteurización a 72°C por 15 segundos (Collins y col., 2003). Por el contrario, las altas presiones aparentemente no ocasionan la inactivación de la LPL (Buffa y col., 2001).

La influencia de la LPL en la maduración de quesos depende de la cantidad de enzima activa que queda retenida en la cuajada y del estado de la membrana de los glóbulos grasos (Choisy y col., 1997). Se cree que su influencia es significativa solamente en los quesos elaborados con leche cruda, y menor en aquellos obtenidos con leche pasteurizada, aunque no está descartado que exista alguna actividad lipásica residual post-pasteurización (Collins y col., 2003). En los quesos madurados con hongos, especialmente los quesos azules obtenidos con leche cruda, se cree que la LPL contribuye significativamente en la lipólisis, ya que su acción se ve favorecida por la alta actividad retenida en la cuajada y el pH elevado que se desarrolla durante la maduración (Choisy y col., 1997; Menéndez y col., 1999; Pinna y col., 1999; Collins y col., 2003). Asimismo, en esta variedad de quesos, también se puede emplear el proceso de homogeneización para facilitar aún más la lipólisis. Con esto se consigue aumentar la actividad de la LPL mediante el deterioro de la membrana del glóbulo graso, y el aumento de la superficie total de la interfase suero-lípido (Werner y col., 1993).

Otra estrategia para aumentar la lipólisis en quesos, implementada hasta el momento con bastante éxito, es el uso de enzimas lipolíticas exógenas. El Código Alimentario Argentino permite su adición a quesos de media y baja humedad (Art. 605, ANMAT 2009). Un ejemplo son las esterasas pregástricas parcialmente purificadas (PGE, por sus siglas en inglés pregastric esterase). El origen de estas enzimas en el queso proviene del uso de cuajos en pasta de cabrito o cordero, que se utilizan para elaborar algunas variedades de queso italiano picante (Di Cagno y Gobetti, 2011). El cuajo en pasta, que contiene la quimosina - cuyo propósito tecnológico es coagular la leche - posee también la enzima lipasa pregástrica proveniente de la saliva del animal, que se recupera en el estómago al faenar los cabritos o corderos luego de ser amamantados. Como consecuencia, al procesar los estómagos, el cuajo resultante contiene proteasas (quimosina) y lipasas (PGE); esta última otorga a los quesos un sabor picante característico (Fox y col., 1993). Las PGE se pueden obtener purificadas del coagulante en pasta, y agregarse como enzimas exógenas; muestran una alta especificidad hacia la posición Sn3 de los triglicéridos, liberando ácidos grasos cortos y medios, lo que explica el flavour picante de ese tipo de quesos.

Otras lipasas que han sido propuestas como aditivos para quesería, siempre con el objetivo de aumentar el sabor picante o acelerar su producción, son las provenientes de los hongos

Rhizomucor miehei y Penicillium roqueforti y de la levadura Candida rugosa (Fox y col., 1993, Veloso de Paula y col., 2010). Si bien las lipasas exógenas han mostrado un impacto positivo en el flavour, muestran algunas desventajas. En primer lugar, presentan un costo adicional en el proceso, ya que las enzimas son insumos costosos, y debe considerarse además que la mayor parte de la lipasa agregada a la leche se pierde en el suero. En segundo lugar, se han informado problemas asociados a una mala distribución de la enzima en la cuajada (Muir y Banks, 2003).

2.2 La plasmina en la maduración de quesos

La plasmina (EC 3.4.21.7) es una serina proteinasa que constituye la enzima nativa de mayor concentración en la leche. Su pH y temperaturas óptimos son aproximadamente 7,5 y 37°C. En la Figura 2 se detalla el sistema complejo del que forma parte la plasmina en la leche, y que incluye la enzima activa, su precursor inactivo plasminógeno, un activador del plasminógeno y dos inhibidores: el inhibidor de la plasmina y el inhibidor del activador del plasminógeno (Grufferty y Fox, 1988). La concentración de plasminógeno presente en la leche es notablemente mayor a la de plasmina, variando la relación de plasminógeno a plasmina entre 50:1 y 2:1 (Ozen y col., 2003). La plasmina, el plasminógeno y el activador del plasminógeno se encuentran asociados a la micela de caseína, mientras que los dos inhibidores se hallan en el suero (Crudden y Kelly, 2003).

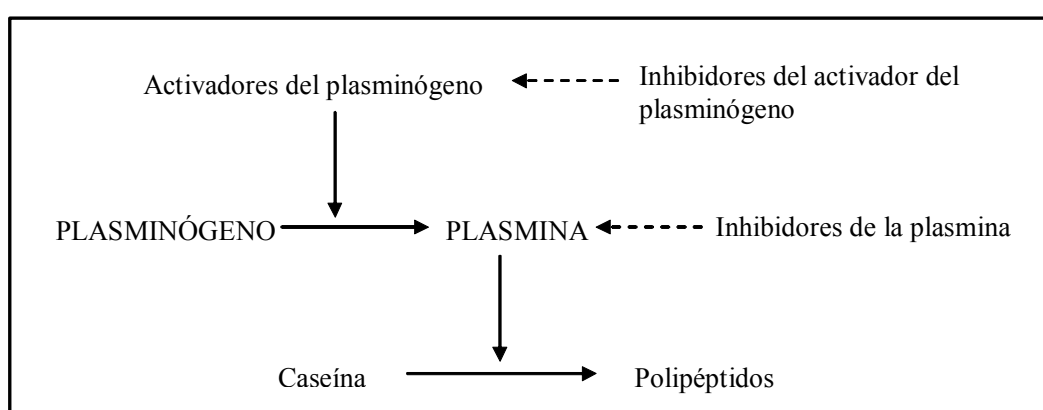


Figura 2. Sistema plasmina de la leche (modificado por Bastian y Brown, 1996).

Se ha encontrado que tanto el agregado de cloruro de sodio como la acidificación de la leche reducen las interacciones entre la plasmina y el plasminógeno con las micelas de caseína. Grufferty y Fox (1988) informaron que entre pH 6,6 y 4,8 el nivel de plasmina asociado a las micelas permanecía inalterado, pero cuando el pH era inferior a 4,6 la mayor parte de la enzima se disociaba. La estabilidad al calor de la plasmina es relativamente alta: se requiere una temperatura de 80°C durante 10 minutos para producir una inactivación total de la enzima (Sommers y Kelly, 2002), y el deterioro de los diversos componentes del sistema plasmina en la leche debido a los tratamientos térmicos puede conducir a un aumento neto de la actividad de la enzima (Grufferty y Fox, 1988). Los sustratos preferenciales de la plasmina son las caseínas β y la α_{s2} , originándose a partir de la proteólisis de la primera los fragmentos C-terminales denominados caseínas γ_1 , γ_2 y γ_3 (Rampilli y Raja, 1998). En los quesos, la plasmina es una de las enzimas responsables de la proteólisis primaria durante la maduración. La intensidad de este efecto depende de varios factores tecnológicos, entre los que se pueden mencionar la temperatura de cocción de la cuajada y el pH alcanzado durante la elaboración, el lavado y el hilado de la cuajada. Estas variables condicionan la actividad de la plasmina en la masa del queso y consecuentemente el grado de hidrólisis de sus sustratos preferenciales. Generalmente el aumento de la concentración de γ caseínas es considerado como un índice de acción de esta enzima (Grufferty y Fox, 1988; Fernández, 2004).

Teniendo en cuenta la importancia de la plasmina en la maduración de diversos tipos de quesos, se han desarrollado numerosos trabajos basados en el incremento de la concentración de esta enzima en el queso. Entre las alternativas más utilizadas se destaca el agregado de plasmina exógena a la leche de elaboración. Farkye y Fox (1992) agregaron la enzima a la leche para elaborar queso Cheddar, consiguiendo al final de la maduración un 20% más de nitrógeno soluble en el queso experimental con respecto a un testigo. Sommers y col. (2002), enriquecieron con plasmina la leche de elaboración de queso Mozzarella, observando una mayor hidrólisis de la β caseína. O'Farrell y col. (2002) verificaron una mayor proteólisis primaria en *Smear cheese* elaborado con leche adicionada de plasmina. Otra estrategia consiste en lograr un aumento de la concentración de plasmina en el queso por medio de la activación del plasminógeno, agregando uroquinasa. Esta técnica ha sido ensayada sobre quesos Suizos (Bastian y col., 1997) y Cheddar (Barret y col., 1999; Milesi y col. 2008), conduciendo a un aumento de la proteólisis primaria. Rippel y col. (2004) lograron estimular la actividad del activador del plasminógeno por medio de α -lactoalbúmina nativa, y por β lactoglobulina desnaturalizada. La estreptoquinasa, una proteasa exocelular producida por el *Streptococcus uberis*, forma un complejo con el plasminógeno que induce a un cambio

conformacional que activa la plasmina sin mediar una escisión proteolítica (Johnsen y col., 2000). Según Upadhyay y col. (2004a), la estreptoquinasa adicionada a la leche de elaboración de queso Cheddar activó la mayor parte del plasminógeno. En este caso la proteólisis se aceleró, como lo indicaron el aumento de nitrógeno soluble a pH 4,6 y la hidrólisis de la β caseína (Upadhyay y col., 2004a). Sommers y Kelly (2002) estudiaron el efecto del tratamiento térmico de la leche y de la temperatura de cocción sobre quesos miniatura, concluyendo que la cocción tiene un efecto importante sobre la actividad de la plasmina, pero que no sucede lo mismo con la temperatura de tratamiento térmico previo de la leche. Exceptuando este trabajo reciente, existe escasa información sobre las operaciones de la fabricación del queso que pueden llevar a un incremento de la actividad de la plasmina.

Si bien las estrategias para aumentar la actividad de plasmina en la leche de elaboración han conducido a acelerar la proteólisis de los quesos durante su maduración, este fenómeno se ha observado sobre todo para la formación de péptidos grandes y de tamaño intermedio, que no contribuyen en una manera directa a la formación del sabor. Sin embargo, tal hidrólisis puede jugar un papel directo en la modificación de las propiedades de fractura del queso. Asimismo, la producción de péptidos de mediano tamaño es importante para la provisión de aminoácidos libres, principales precursores de compuestos de *flavour* (Upadhyay y col., 2004a, Upadhyay y col., 2004b).

2.3 La enzima coagulante residual en la maduración de quesos

Es un hecho conocido que la enzima coagulante residual es uno de los principales agentes proteolíticos en quesos de pasta blanda o semidura, que no incluyen una etapa de cocción de la cuajada (Noomen, 1978; Visser, 1993; Hynes y col., 2001a, Hynes y col., 2001b, entre otros). La quimosina (EC 3.4.23.4) retenida en la cuajada puede alcanzar hasta el 30% de la cantidad original agregada a la leche (Sousa y col., 2001), y durante la maduración ataca fundamentalmente la caseína α_{s1} en el enlace Phe₂₃-Phe₂₄ para dar los péptidos α_{s1} (f1-23) y α_{s1} (f24-199) o α_{s1} -I (Carles y Ribadeau-Dumas, 1985; McSweeney y Fox, 1993). Esta hidrólisis se manifiesta tempranamente durante la maduración de quesos blandos, lo cual resulta coherente con la proporción relativamente alta de coagulante residual en la matriz proteica en estas variedades (de Jong, 1978). Sin embargo, también se ha detectado el péptido α_{s1} -I en quesos de pasta dura. Delacroix-Buchet y Fournier (1992) demostraron que un aumento de 52 a 56 °C en el tratamiento térmico durante la fabricación de queso Gruyère, disminuía la hidrólisis de la caseína α_{s1} , lo que indicaría que el coagulante residual contribuye

a la formación de α_{S1} -I en esta variedad. Kindstedt y col. (1995) encontraron que la proteólisis se hacía más lenta en Mozzarella cuando se reducía la dosis de quimosina usada en la elaboración, lo que indica que el cuajo estuvo activo a pesar de las altas temperaturas de cocción. Otros autores han postulado que el péptido α_{S1} (f24-199) es producido por la quimosina, pero antes de la etapa de cocción de la cuajada, esto es en la tina durante la elaboración (Chianese y col., 1996; Gaiaschi y col., 2000). Recientemente, se ha encontrado que la enzima coagulante residual contribuye a la proteólisis de queso Reggiano, probablemente debido a una reactivación, y es al menos parcialmente responsable de la hidrólisis de la caseína α_{S1} (Hynes y col., 2004).

La proteólisis de la caseína α_{S1} se ha relacionado tradicionalmente al ablandamiento de la pasta de quesos blandos (de Jong, 1978), y a modificaciones en la textura de quesos duros (Visser y col., 1991). Recientemente, algunos indicios señalaron que el ablandamiento y la generación del péptido α_{S1} -I pueden ser hechos paralelos, pero no necesariamente vinculados por una relación causa-efecto (Hynes y col., 1999; O'Mahony y col., 2005; Alonso y col., 2005). Existen muy pocos antecedentes que relacionen la hidrólisis de la caseína α_{S1} en quesos duros y el tiempo de maduración del queso (Gaiaschi y col., 2000), y en este caso la actividad residual de coagulante no ha sido investigada. Finalmente, como el papel del coagulante residual está fundamentalmente ligado a la hidrólisis de las caseínas intactas, en especial α_{S1} , su impacto en el *flavour* sería secundario. Sin embargo, actividades muy elevadas de la enzima han sido relacionadas con defectos sensoriales (sabor amargo), y por otra parte su acción proveedora de péptidos medianos para ser utilizados por la biota en la generación de aroma y sabor se ha indicado, por el contrario, como muy favorable (Sousa y col., 2001). Existen pocos antecedentes que dan cuenta de la acción del coagulante en la calidad de quesos duros de pasta cocida, probablemente porque se lo consideraba totalmente inactivado, lo que como se ha mencionado, no siempre se cumple.

2.4 Microorganismos y enzimas que provienen de ellos

Los microorganismos capaces de influir en el proceso de proteólisis y lipólisis incluyen a los pertenecientes al fermento primario, al fermento secundario o adjunto, y a las NSLAB (por sus siglas en inglés: *non starter lactic acid bacteria*) (Sousa y col., 2001). Los fermentos secundarios no lácticos, por ejemplo las bacterias del género *Propionibacterium* y hongos del género *Penicillium*, que son utilizados en quesos suizos y azules respectivamente, tienen gran importancia en los procesos de proteólisis y lipólisis de los mismos.

En quesos argentinos de pasta cocida, las enzimas proteolíticas de origen microbiano provienen de bacterias lácticas, ya sea del fermento o NSLAB. La actividad proteolítica del fermento es considerada primordial en la proteólisis secundaria, en todos los quesos madurados sin hongos y sin una flora superficial. Si bien las bacterias lácticas son consideradas poco proteolíticas comparadas con otras bacterias, tienen un sistema proteolítico bastante completo, el cual les sirve para cumplir con sus exigentes requerimientos nutricionales de aminoácidos (Kok y de Vos, 1994; Steele, 1998; Sousa y col., 2001).

El sistema proteolítico de las bacterias lácticas es muy importante en el desarrollo de productos lácteos fermentados, ya que por un lado les permite crecer y acidificar en leche y por otro, contribuir al desarrollo de las propiedades organolépticas del producto (Gripon, 1994, Monnet y Gripon, 1997, Savijoki y col., 2006).

En quesos duros argentinos de pasta cocida, se utilizan fermentos termófilos (donde predomina fundamentalmente la especie *Lb. helveticus*) con un óptimo de temperatura de ~45°C (Renheimer y col., 1996). La elección del fermento depende del tipo de queso que se elabore, por ej. los fermentos mesófilos (con una temperatura óptima de ~30°C) se utilizan en la producción de quesos Cheddar, Gouda, Edam, entre otros (Cogan y Colin Hill, 1993).

El sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*, un fermento mesófilo ampliamente utilizado en varios tipos de quesos (Cheddar, Danbo, Gouda), ha sido objeto de numerosos y detallados estudios, mientras que las capacidades proteolíticas y peptidolíticas de otras bacterias lácticas son menos conocidas (Kok y de Vos, 1994; Powell y col., 2011). Sin embargo, diversos trabajos sobre lactobacilos sugieren que su equipo enzimático es similar al de los lactococos (Kok y de Vos, 1994; Steele, 1998). En general, el sistema proteolítico de las bacterias lácticas está conformado por proteasas, que en su gran mayoría son extracelulares y se hallan unidas a la pared celular, sistemas de transporte de oligopéptidos y aminoácidos al interior celular y diversas peptidasas intracelulares (Kok y de Vos, 1994, Steele, 1998).

En cuanto a las NSLAB, ellas no contribuyen a la acidificación durante la elaboración de los quesos, tal como lo hace el fermento primario ya que no crecen bien en leche, pero participan en la proteólisis de los quesos. Estas bacterias pueden dominar la microflora durante la maduración, luego de largos períodos (McSweeney, 2004). La flora NSLAB se compone de cuatro grupos de bacterias: lactobacilos mesófilos, pediococos, enterococos y *Leuconostoc* spp. Los lactobacilos forman el grupo más frecuentemente encontrado en quesos (Beresford y col., 2003, Quiberoni y col., 2005). Debido a que los lactobacilos mesófilos no crecen bien en leche en ausencia de una fuente exógena de oligopéptidos y aminoácidos, se

supone que podrían carecer de proteinasas; sin embargo se han detectado que poseen una amplia gama de peptidasas (Williams y col., 1998).

En cuanto a la actividad lipolítica de las bacterias del ácido láctico, la misma ha sido detectada y puede considerarse baja; se ha informado actividad en *Lb. helveticus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Fox y col., 1993). Existe escasa información acerca de la actividad lipasa en este grupo de bacterias, pero algunos autores la han hallado en *Lactobacillus plantarum* y en *Streptococcus thermophilus* (Gobbetti y col., 1996; DeMoraes y Chandan, 1982). La presencia de actividad esterasa en las bacterias del ácido láctico está bien documentada en la literatura científica (Choi y col., 2004; Gobbetti y col., 1997, Oliszewski y col., 2007).

3. Tecnología quesera de elaboración y su impacto en el queso

A menudo suele mencionarse que los quesos elaborados con leche pasteurizada no alcanzan el sabor pleno y maduro que logran aquellos productos de leche cruda (Bachmann y col., 2011). Es un hecho conocido que el flavour es resultante de la interacción entre el producto y el consumidor y no un atributo intrínseco del alimento (Le Quéré, 2011), por lo cual esta percepción de sabor “pleno” y “maduro” puede variar según la cultura de los consumidores, y lo que para algunos tiene una connotación agradable – consumidores conocedores – para otros puede ser desfavorable y percibido como demasiado fuerte o atípico (consumidores poco conocedores o de “paladar infantil”). En un plano más objetivo, los quesos elaborados con leche cruda tienen sin duda un flavour más intenso que los elaborados con leche pasteurizada (Beuvier y Buchin, 2004; Collins y col., 2003), y llegan a su óptimo de maduración en un tiempo menor que los quesos elaborados con leche tratada térmicamente (Bachmann y col., 2011).

En la actualidad, muchas variedades de queso todavía se producen con leche cruda, tanto a escala artesanal como industrial, especialmente en Europa; estos quesos son productos de muy elevada calidad y alto precio cuya denominación se encuentra protegida en la mayoría de los casos; ejemplos entre los quesos de baja humedad lo constituyen: Emmental, Gruyere, Comté, Parmigiano-Reggiano y Grana Padano (Bachmann y col., 2011). Sin embargo, por razones de seguridad alimentaria, en todo el mundo la mayor cantidad de queso se produce con leche termizada o pasteurizada, con más razón teniendo en cuenta que las variedades que más inciden en la producción mundial son el Cheddar y la Mozzarella de baja humedad, ambos productos *commodities* que se elaboran con leche pasteurizada (Grappin y Beuvier, 1997; Buffa y col., 2001; Ballesteros y col., 2006).

La termización es una denominación genérica que se utiliza para describir tratamientos térmicos que van desde 57°C a 68°C durante 10 a 20s (Stepaniak and Rukke, 2003), mientras que la pasteurización se puede llevar a cabo directamente en la tina a 63-65°C durante 30 min (pasteurización discontinua o batch), lo que todavía se utiliza en queserías pequeñas, o en forma continua a temperaturas mayores a 72-75°C durante 15-30s en intercambiadores de calor de placas, método que se aplica para la casi totalidad de la leche destinada a elaboración de quesos (Kelly y col., 2008; Zamora y col. 2007).

Los tratamientos térmicos que se aplican a la leche de elaboración se realizan con el fin de mejorar la seguridad del queso, ya que la pasteurización elimina todos los potenciales patógenos excepto los esporos, y tiene el objetivo secundario de estabilizar la leche como materia prima, ya que disminuye el recuento de bacterias lácticas, principalmente las NSLAB. La pasteurización tiene asimismo otros efectos ya que induce la activación de algunas enzimas (por ejemplo la plasmina, tal como se mencionó anteriormente), y la inhibición de otras (por ejemplo la LPL), lo cual afecta las reacciones bioquímicas implicadas en la etapa de maduración y su velocidad, y tiene incidencia por lo tanto en la calidad del queso. Se cree que los efectos de la termización sobre las enzimas y las NSLAB son menores, pero el proceso elimina las bacterias psicrotrofas que dominan la microflora de la leche refrigerada y las bacterias coliformes, y contribuye a estabilizar la leche (Fox, 2000b; Grappin y Beuvier, 1997; Johnson, 2011; Kelly y col. 2008; Skeie y Ardö, 2000).

Por otro lado, la pasteurización o termización no son los únicos momentos en los que puede existir calentamiento durante la fabricación de un queso. En efecto, en los quesos de pasta cocida (por ej. Emmental, Reggianito, Grana Padano y Parmigiano Reggiano) se efectúa una etapa de calentamiento de la mezcla de suero y granos de cuajada durante el proceso de elaboración, denominada cocción, que generalmente consiste en una rampa de calentamiento lenta destinada a disminuir la humedad de los granos de cuajada y de otra rampa más rápida dirigida a obtener las características texturales finales. La primera rampa inicia luego del corte de la cuajada, momento en que se procede con la agitación de los granos y el calentamiento. Durante el calentamiento, el fermento continúa acidificando; y la combinación de agitación, calor y desarrollo de acidez tiene un efecto significativo en la sinéresis de la cuajada y en la disolución del fosfato de calcio (Lomholt y Qvist, 1999). En esta etapa se produce una reorganización de las micelas de caseína, y un ajuste de la red proteica que provoca la expulsión del suero. Cuanto mayor es la temperatura que se aplica, menor es la humedad de la cuajada. En cuanto al pH, cuanto mayor es la caída del mismo luego del corte, mayor es la cantidad de agua expulsada. Otros factores que se relacionan con la velocidad de sinéresis

tienen que ver con la presión ejercida a la cuajada, lo cual incluye el aumento de la proporción cuajada/suero durante la agitación; el mantenimiento del calor durante la agitación y la adición de sal (Steffen y col., 1993; Gobetti y Di Cagno, 2011).

Otra variedad de quesos donde existe un tratamiento térmico energético, está representada por la mozzarella, y en general por todas las variedades de pasta hilada. En este caso, la etapa de calentamiento se realiza sobre la cuajada, una vez que ya se encuentra libre de suero. La cuajada se deja en la tina o en mesas de moldeo hasta alcanzar el pH adecuado ($\sim 5,2$) y en ese momento se corta y se coloca en máquinas amasadoras que elevan la temperatura de la masa, por medio de agua y vapor, por encima de los 70°C . Cuando es sometida a este tratamiento mecánico y térmico, la matriz tridimensional de caseína se ordena linealmente formando capas, lo que le da al queso su típica textura elástica cuando está frío y filante cuando se encuentra fundido (De Angelis y Gobetti, 2011).

En la mayoría de las variedades de quesos, toda la lactosa es convertida a ácido láctico durante la elaboración. Esto implica que la relación entre el ácido láctico y los compuestos buffer (fundamentalmente la paracaseína y el fosfato de calcio) determinan el pH del queso. Para ajustar el pH sin alterar el contenido de humedad, se puede aplicar un paso de lavado. En este sentido, es posible regular la disminución de pH y lograr que no sea tan pronunciada, agregando agua a la mezcla de suero y granos cuajada, o como se realiza en la mayoría de los casos, reemplazando parte del suero por agua. Como consecuencia, la lactosa difunde desde los granos de cuajada hacia el suero diluido, debido al gradiente de concentración y la cantidad de lactosa disminuye significativamente en los granos, si bien rara vez se llega al equilibrio entre las concentraciones de lactosa en el interior de las partículas y en el suero. La menor disponibilidad de lactosa para el fermento contribuye a estabilizar el pH en valores más altos que si no se aplica la operación de lavado (Walstra y col., 1999b; Düsterhöft y col., 2011).

La curva de acidificación y el valor de pH de drenado de suero tienen una gran importancia en las propiedades de fractura del queso, ya que influyen sobre las especies químicas en las que puede encontrarse el calcio, es decir como fosfato de calcio coloidal o como calcio iónico, lo que tiene un fuerte impacto en la organización de la matriz proteica y en las propiedades físicas del queso (Johnson, 2011; Lucey, 2011). Por ejemplo, los quesos que desarrollan mucha acidez, y tienen un bajo contenido de minerales, como los quesos Cheshire, tienden a formar una estructura que consiste en agregados proteicos más que en una red tridimensional (Green y Grandison, 1993). Los quesos que desarrollan demasiada acidez o post acidificación presentan un defecto llamado arricotado (o *giesatura* en italiano) que se

debe a la falta de mineralización de la cuajada y a que las proteínas alcanzan el pH cercano al punto isoeléctrico, perdiendo la capacidad de ligar agua (Hynes et al., 1999). Además, la curva de acidificación y el pH al drenado de suero influyen sobre la retención de las enzimas en la cuajada, como ya se refirió para la plasmina (Grufferty y Fox, 1988) y también para el coagulante (Bansal y col., 2007), lo que puede influir en la proteólisis. De hecho a bajos pH se favorece la retención y acción del cuajo, y la pérdida e inhibición de la plasmina (Grufferty y Fox, 1988; Bansal y col., 2007; Hynes y col., 1999).

Otras operaciones y pre-tratamientos de la leche de quesería pueden incluir cambios con respecto a la organización de la grasa, ya que ésta también puede modificarse mediante los tratamientos mecánicos y térmicos propios de cada tecnología de elaboración condicionando las características finales de los quesos. Se ha informado que el contenido de grasa de los quesos y su estructura producen cambios en las propiedades funcionales, nutricionales, sensoriales y tecnológicas de los productos y en el progreso de la lipólisis (Guinee y McSweeney, 2006; Lopez, 2005). Karami y col. (2009) caracterizaron los cambios en la microestructura de los glóbulos grasos durante la maduración de quesos Feta; encontraron que al comienzo de la maduración los agregados de glóbulos grasos se detectaban fácilmente, y a los 40 días de maduración la textura era homogénea y ningún glóbulo era detectable. Lopez y col. (2006) estudiaron la lipólisis durante la maduración de quesos Emmental considerando la organización de la grasa y la localización preferencial de las bacterias mediante observaciones microscópicas. Los autores observaron una disgregación de los glóbulos grasos luego del prensado, con la consecuente liberación de la membrana de los glóbulos; las inclusiones de grasa libre se encontraban rodeadas de suero delimitadas por micelas de caseínas formando cadenas. Por otra parte, las colonias de bacterias se localizaron preferentemente en la interfase grasa/proteínas lo cual facilitó la accesibilidad de las enzimas lipolíticas al sustrato.

Por otro lado, existen distintos tratamientos tecnológicos que pueden aplicarse a la leche de elaboración y que también influyen en la microestructura de los quesos y en sus características finales. Un proceso ampliamente utilizado en la industria láctea es la homogeneización, que está dirigida a estabilizar la emulsión grasa en agua e impedir la separación de una capa de crema en cartones y otros envases de leche. El principio básico de la homogeneización consiste en provocar la disrupción de los glóbulos grasos mediante el pasaje de la leche a presión por un orificio de pequeño diámetro; la brusca descompresión que sigue provoca torbellinos que generan un esfuerzo de corte elevado y eventualmente cavitación, fenómenos que conllevan al estallido de los glóbulos (Walstra y col., 1999c). Durante este proceso se reduce el tamaño de las gotas de grasa, con la concomitante

formación de mayor área total de interfase grasa/agua, lo que implica la formación de una nueva membrana, llamada membrana artificial o de reposición, que consiste en restos de membrana del glóbulo, micelas de caseínas, y proteínas del suero (Wilbey, 2011). El paso de homogeneización se lleva a cabo a temperaturas superiores a 40°C para asegurar que la grasa posea cierta movilidad para formar nuevos glóbulos ya que por debajo de esta temperatura la misma comienza a cristalizar. Las propiedades físicas de la grasa en emulsión se alteran, lo cual hace que la homogeneización posea ventajas y desventajas al ser aplicadas a la elaboración de quesos (Fox, 2000b). En general, la leche destinada a quesería no se homogeneiza, ya que puede tener efectos perjudiciales en la formación de la cuajada y en la sinéresis, pero sin embargo se ha reportado que puede incrementar el rendimiento quesero (Fox, 2000c; Zamora y col., 2007). Se ha informado además que la homogeneización reduce las pérdidas de grasa en el suero al facilitar la interacción de los glóbulos con membranas artificiales con la matriz proteica. La homogeneización también favorece una mayor accesibilidad de las enzimas lipolíticas a la grasa, que cuando los glóbulos se encuentran en su estado nativo (Fox, 2000c; Kelly y col., 2008). En efecto, en quesos azules, la homogeneización de la crema se realiza para promover la hidrólisis de la grasa, una reacción deseable para esta variedad ya que su flavour se caracteriza por la formación de compuestos volátiles derivados del catabolismo de los ácidos grasos, como las metilcetonas. Además, e incrementa la blancura y la opacidad de la pasta de los quesos, lo cual es altamente deseable en quesos azules con el fin de incrementar el contraste entre el veteado azul y la blancura de la matriz (Johnson, 2011).

Uno de los quesos azules tradicionales más importantes comercialmente donde se aplica un paso de homogeneización, es el queso danés Danablu (Ardö, 2011; Fox, 2000d). Éste es un queso semiduro manufacturado con leche de vaca, donde la leche de elaboración se prepara mezclando la leche descremada pasteurizada y la crema homogeneizada. El protocolo de manufactura es similar al de Roquefort, aunque a veces se agrega clorofila para enmascarar el color amarillo de los carotenos que son propios de la leche de vaca, otorgando un queso de pasta más blanca (Fox, 2000d).

La homogeneización convencional también ha sido utilizada en la manufactura de algunas variedades de quesos reducidos en grasa dando origen a productos con mayor humedad y una textura más suave (Fox, 2000c; Mistry, 2001; Kelly y col., 2008). Tradicionalmente, la homogeneización se lleva a cabo en un rango de presiones que va desde 10 a 30 MPa. Sin embargo, en las últimas dos décadas, se han manufacturado homogeneizadores capaces de alcanzar presiones de hasta 400 MPa. Con este tipo de equipos, se logra una distribución de

tamaño de los glóbulos grasos más estrecha, una disminución en el tamaño de las micelas de caseínas y cierta desnaturalización de las proteínas del suero. Además, se produce una inactivación por destrucción física de las células bacterianas presentes en la leche. Por otro lado, a presiones mayores a 200 MPa se ha verificado la desnaturalización de la LPL probablemente como resultado del calentamiento durante el proceso de homogeneización (Huppertz, 2011). En cuanto a la enzima plasmina, se han encontrado resultados controvertidos respecto al efecto de las altas presiones de homogeneización. En este sentido, algunos autores han reportado que la actividad se mantenía inalterable (Iucci y col., 2008; Huppertz, 2011), y otros observaron la inactivación de la enzima (Hayes y Kelly, 2003; Hayes y col., 2005).

Finalmente, otros pre-tratamientos de la leche de quesería que influyen fuertemente en la calidad de los quesos son los enriquecimientos proteicos que se logran mediante tecnología de membranas, ya sea microfiltración (MF) o ultrafiltración (UF). Estas técnicas permiten aumentar el contenido de sólidos, enriqueciendo la leche de quesería en caseínas, o en caseínas y proteínas de suero según el diámetro de poro de la membrana utilizada. Por UF se puede alcanzar incluso a una concentración de sólidos similar a la del queso, obteniéndose un pre-queso que puede coagularse con pequeñas cantidades de enzima (Mistry y Maubois, 1993). Este tipo de tecnología está dirigida a aumentar el rendimiento quesero; todas ellas incrementan el contenido de lactosa y la capacidad buffer de los quesos al aumentar el contenido de caseína.

En tecnología quesera suele repetirse que la maduración se determina en la tina quesera, en el sentido de que las condiciones medioambientales que van a imperar en el interior del alimento durante la maduración, y que van a condicionar la actividad de fermentos y enzimas, se deciden mediante las diversas operaciones de la fabricación. El queso puede definirse entonces como un biorreactor, cuya composición y microestructura influyen en el desarrollo del flavour y la textura final (Green y Grandison, 1993).

4. Tecnología de elaboración de quesos Reggianito.

Los antecedentes de la variedad de queso Reggianito están constituidos por los quesos duros italianos Parmiggiano Reggiano y Grana Padano, ya que la tecnología de elaboración fue incorporada al país por los inmigrantes italianos que arribaron a Argentina a finales del siglo XIX y comienzos del XX. Asimismo, la tecnología fue modificada y adaptada a los materiales y a las condiciones medioambientales locales para dar un producto que hoy se

considera distinto, con características diferentes de las variedades originales (Zannoni y col., 1984; Candiotti y col., 2002).

Según el Código Alimentario Argentino (ANMAT 2009) el queso Reggianito se elabora con leche pasteurizada, tiene un contenido de grasa mínimo de 32% p/p (en base seca) y un contenido de humedad de hasta 36% p/p. Además, el queso debe responder a las siguientes características: la consistencia debe ser dura; la textura compacta, quebradiza y granulosa; el color blanco amarillento y ligeramente amarillento; el sabor salado y levemente picante; el olor característico y la corteza lisa, consistente, bien formada, cubierta con revestimientos apropiados, adheridos o no; podrá poseer algunos ojos pequeños o aberturas mecánicas; el peso se encuentra en un rango entre 5 a 10 kg; deberá ser madurado para lograr sus características específicas, por lo menos 6 meses para quesos de 5 a 10 kg.

Los fermentos naturales del suero son ampliamente utilizados en la producción de esta variedad (Hynes y col., 2003). Estos fermentos son ecosistemas complejos y robustos, formados por cientos de cepas entre las que pertenecen a la especie *Lb. helveticus* son mayoritarias. Si bien son fermentos tradicionales y presentan muchas ventajas como la facilidad de preparación y robustez, además de brindar tipicidad al producto, también poseen algunas desventajas, ya que las variaciones en su composición microbiológica pueden llevar a inconstancia en el perfil sensorial de los quesos (Reinheimer y col., 1996; Reinheimer y col., 1995). Es por ello que actualmente es común el uso de fermentos seleccionados de *Lb. helveticus* (Candiotti y col., 2002; Perotti y col., 2004). Usualmente, se combina la utilización de fermentos seleccionados de agregado directo, con ácidos orgánicos o acidógenos, debido a que cierta acidificación de la leche se requiere durante la elaboración, antes de la coagulación. Se utiliza la quimosina como enzima coagulante, pero algunas industrias lácteas argentinas todavía emplean coagulante bovino adulto. La etapa de cocción se lleva a cabo a una temperatura menor (~52°C) que en los quesos italianos de pasta cocida (54-56 °C): consta de una primera rampa de calentamiento a una velocidad de 1°C por minuto hasta llegar a 45°C, y finaliza con un calentamiento rápido hasta temperaturas que llegan a los 52°C. Luego de la cocción, el suero se drena y se hace presión en la cuajada para eliminar aberturas. La cuajada luego es ubicada en moldes adecuados, usualmente de acero inoxidable. El prensado se lleva a cabo durante 24 horas con volteo de las hormas. Transcurrido este tiempo, los quesos se dejan orear 24 horas y finalmente se salan por inmersión en salmuera, a razón de un día por kg de peso. La maduración se lleva a cabo en cámara a 15-18°C, con una humedad del 85% (Zalazar y col., 1999).

Objetivo general

Conocer el impacto de la actividad de enzimas nativas de la leche en la maduración de quesos duros de pasta cocida, con la finalidad de favorecer procesos bioquímicos deseables desde el punto de vista de la formación de aroma y sabor, la mejora de las propiedades texturales, y la aceleración de la maduración.

Objetivos específicos

- ❖ Detectar cambios tecnológicos que aumenten la actividad de la lipoproteína lipasa nativa de la leche.
- ❖ Encontrar los tratamientos más adecuados para incrementar la actividad residual de la plasmina, enzima proteolítica nativa de la leche.
- ❖ Aplicar las mejores estrategias halladas a la elaboración de quesos en escala laboratorio y piloto.
- ❖ Evaluar el impacto del incremento de las actividades enzimáticas de interés en la lipólisis y proteólisis durante la maduración de los quesos obtenidos.

Capítulo 1:

Implementación de modelos casearios
experimentales para el estudio de lipólisis
y proteólisis

1. Introducción

La mayoría de los quesos coagulados enzimáticamente se maduran por períodos que varían entre las dos semanas -como los quesos de alta humedad Bel Paese y Mozzarella -y más de dos años -como los quesos duros Parmigiano-Reggiano y Grana Padano. La maduración del queso es un proceso lento y por lo tanto, consume recursos económicos. Por esta razón, se han llevado a cabo numerosos estudios con el objeto de acelerar su maduración, entre los cuales se incluyen cambios en la temperatura de almacenamiento (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2000; Shiuffe y col. 2007), la adición de enzimas exógenas o fermentos atenuados (Awad y col., 2010; Mikelsone y Ciprovica, 2011), el uso de fermentos adjuntos (El Soda y col. 2000; Irigoyen y col., 2007; Milesi y col., 2008), y los tratamientos a alta presión (Trujillo y col., 1999; Zamora y col. 2007), entre otras estrategias tecnológicas (Law, 2001; El Soda y Awad, 2011).

La mayoría de las investigaciones incluye elaboraciones de queso a escala piloto, que se consideran necesarias para validar los resultados ante quienes toman decisiones en la industria quesera, ya que a menudo los estudios *in vitro* o las previsiones que arrojan los modelos no son suficientes para inspirar confianza y promover cambios tecnológicos en la industria (Hunter y col., 1997). Sin embargo, estas experimentaciones son costosas, ya sea que se lleven a cabo en plantas piloto o en facilidades industriales, y demandan grandes cantidades de insumos y materias primas, equipamiento y tiempo de experimentación y maduración de los productos. En este sentido, para estudios en etapas más preliminares, o de cuestiones que se encuentran en estadios menos cercanos a la aplicación tecnológica, se han propuesto como alternativa los sistemas modelo. Estos sistemas son versiones simplificadas de las matrices casearias reales, y permiten estudiar el impacto de diversas variables en la calidad del queso, apelando por un lado a una mayor facilidad de preparación y rapidez de maduración, pero también a la obtención de un modelo blanco o control más simple, donde el ensayo de una enzima o de un fermento pueda individualizarse y caracterizarse mejor que en un ecosistema/matriz real complejo, donde concurren múltiples reacciones, y las condiciones medioambientales pueden resultar más difíciles de controlar (Smit y col., 1995; Milesi y col., 2007; Milesi y col., 2008). Los modelos de queso controlados microbiológicamente también han sido útiles para estudiar los agentes de la maduración; en efecto, se idearon cubas con aire estéril equipadas con guantes de goma integrados para elaborar quesos en condiciones asépticas (McSweeney, 2004).

Se han propuesto varios modelos, que en general pueden clasificarse en: i) modelos líquidos, consistentes en extractos de queso estériles o no, preparados a partir de queso y

agua, con separación de la fase acuosa (Crow y col., 2001), ii) modelos de pseudocuajadas, o de queso procesado, o slurries, preparados a partir de cuajada recuperada en distintas etapas de una elaboración de queso convencional, o de queso joven procesado con sales fundentes (Farkye y col., 1995; Smit y col., 1995; Muehlenkamp-Ulate y Warthesen, 1999), y iii) quesos miniatura obtenidos en condiciones asépticas o convencionales (Fox y col., 1996; Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001; Milesi y col., 2008)

Los extractos solubles de los quesos son modelos relativamente simples y se han utilizado para estudiar el efecto de bacterias en la proteólisis y la bioformación de flavour, así como el crecimiento de cepas aisladas de queso (Neviani y col., 2009; Milesi y col., 2011; Bove y col., 2012). En este sentido, Crow y col. (2001) describieron un extracto soluble de quesos Cheddar esterilizado a alta temperatura por inyección de vapor (UHT), que utilizaron para describir el rol de numerosas cepas de NSLAB en la maduración de queso Cheddar y seleccionar aquellas de mayor interés. Milesi y col. (2011) utilizaron un modelo de extracto acuoso esterilizado por filtración para investigar la producción de péptidos y aminoácidos en quesos duros, y determinaron que el extracto de queso de 3 meses de maduración era el que mejor modelaba las transformaciones proteolíticas, con respecto al extracto de quesos jóvenes o al extracto de queso de 6 meses. El estudio permitió seleccionar cepas de *Lb. helveticus* en base a su capacidad proteolítica y peptidolítica en el extracto. Por su parte, Neviani y col. (2009) desarrollaron un extracto de Parmigiano reggiano de 24 meses de maduración, con el objetivo de cultivar bacterias aisladas de este tipo de ecosistemas; el extracto demostró ser más efectivo que otros medios de cultivo más complejos para sostener el crecimiento de las cepas lácticas de interés.

El segundo modelo ampliamente utilizado son los *slurries*, o pastas de queso, en los que se logra una mayor aproximación a las condiciones reales que en los sistemas acuosos. También en este punto se pueden agrupar las pseudocuajadas preparadas con cuajada recuperada de una elaboración de queso real en distintas etapas de la misma o apenas finalizada. Los slurries de queso han sido propuestos para evaluar rápidamente la influencia de los fermentos o enzimas. La incubación de los slurries durante cortos períodos (1-2 a 15-20 días) a mayor temperatura que la maduración se utiliza generalmente para acelerar cambios bioquímicos. Sin embargo, presentan la desventaja de que su cuerpo, textura y actividad acuosa difieren de la del queso. Una pasta de queso que ha sido patentada y muy utilizada para estudiar bacterias y enzimas es el modelo *Ch-easy*, que se funde a baja temperatura debido a que contiene polifosfatos y permite una mezcla del agente en estudio, luego se solidifica (Smit y col., 1995).

Antecedentes del uso de slurries pueden encontrarse en Farkye y col. (1995), Muehlenkamp-Ulate y Warthesen (1999), Yu y col. (2012).

Los modelos experimentales que mejor reproducen las condiciones reales de elaboración y maduración son los quesos elaborados a escala de laboratorio. Los quesos miniatura pueden elaborarse de una manera más sencilla que a escala piloto, y son reproducibles dado que la miniaturización permite lograr un mejor control de las condiciones medioambientales, inclusive mantener la asepsia del ambiente durante la preparación (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001). Numerosos estudios se han llevado a cabo en miniquesos con diferentes propósitos, entre ellos pueden citarse Shakeel Ur Rehman y col. (1998a), Hynes y col. (2000), Milesi y col. (2007, 2008 y 2009), entre otros.

En el presente trabajo se implementaron tres modelos experimentales de queso duro de pasta cocida, con el objeto de seleccionar los tratamientos propuestos en modelos simples; aquellos que resultaron seleccionados por su influencia favorable en la maduración luego fueron validados en elaboraciones a escala piloto.

Los modelos se desarrollaron completamente o se modificaron a partir de otros implementados previamente en el INLAIN (Hynes y col., 2004; Milesi y col., 2007; Mercanti y col., 2008; Milesi y col., 2011). El primero que se utilizó fue una minicuajada, en la que se ensayaron fundamentalmente condiciones de retención de la materia grasa, para ser aplicada luego en el Capítulo 2 (Mercanti y col., 2008). Posteriormente, se adaptó un modelo de quesos miniatura de pasta dura cocida que se utilizó también en el Capítulo 2 (Hynes y col., 2004). Finalmente, se diseñó y puso a punto un nuevo modelo de pseudocuajada a partir de materia prima obtenida de una elaboración convencional de queso Reggianito, que se aplicó en el Capítulo 3.

2. Materiales y Métodos

2.1 Minicuajadas

En este modelo de minicuajadas, se buscó reproducir la tecnología de elaboración de quesos duros mediante una adaptación de las distintas etapas tecnológicas que se realizan en la tina quesera por etapas experimentales en el laboratorio. Para ello se trabajó en base a un desarrollo previo de Mercanti y col (2008) que fue diseñado para quesos de leche de oveja y pasta semidura, adaptando la experimentación a las exigencias de la nueva matriz. El esquema experimental se detalla en la Figura 1.1.

Se colocaron 40 mL de leche estandarizada (3% MG) en tubos Falcon en un baño a 33°C, temperatura habitual de coagulación de quesos duros. Luego, se agregó CaCl₂ (Merck,

Darmstadt, Alemania) a una concentración final en leche de 0,02 % (p/v), se agitó manualmente y se adicionaron 90 μ L de una solución de coagulante al 1% (p/v) (100% quimosina, Maxiren 150; Gist Brocades, Francia). La dosis de coagulante es la equivalente a la que se emplea en quesos duros de pasta cocida de acuerdo a la indicación del proveedor, y a estudios previos sobre el tiempo de coagulación en estos quesos (Costabel y col., 2009). Después de 30 min, se evaluó que el coágulo había alcanzado la consistencia adecuada, y se realizaron dos cortes en la cuajada con espátulas de acero inoxidable adaptadas al diámetro de los tubos; se esperó que el coágulo se desprenda de las paredes del tubo y exuda suero. Luego los tubos se colocaron en un baño a 50°C, se redujo el tamaño de las partículas de cuajada mediante nuevos cortes, la mezcla de suero y granos de cuajada se agitó continuamente con una espátula hasta alcanzar dicha temperatura. Estas operaciones se asemejan al proceso de lirado, agitación y cocción que ocurre durante la elaboración del queso. Finalmente, se detuvo la agitación y se permitió que la cuajada se depositara en el fondo de los tubos. Los mismos se centrifugaron a 600 g durante 10 min, separándose el suero y las minicuajadas; de esta manera se imita la operación de desuerado y prensado y se busca alcanzar un tenor de humedad adecuado para el producto. Para cada experiencia en la que se utilizaron minicuajadas se realizaron 3 réplicas de elaboración. Las minicuajadas y el suero obtenido de la centrifugación se analizaron de acuerdo a los objetivos de cada experiencia. Para la implementación del modelo solamente se obtuvieron datos de contenido de grasa y humedad a los fines de validar la reproducibilidad de la técnica de preparación y que los valores cumplieran con los requerimientos mínimos para modelar un queso duro.

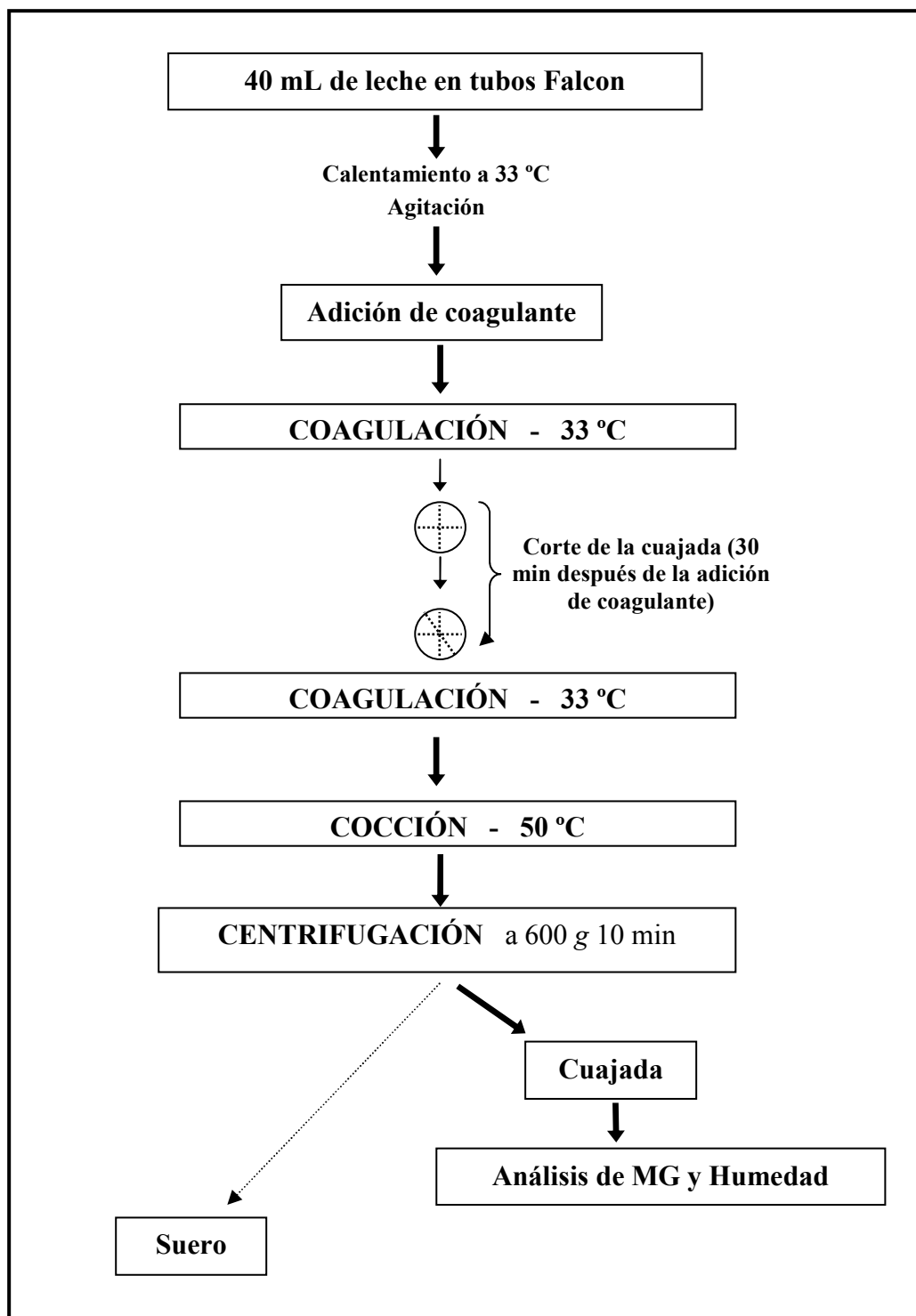


Figura 1.1. Esquema experimental de la preparación de minicujadas.

2.2 Quesos miniatura de pasta dura cocida

El modelo de quesos miniatura se utiliza habitualmente en el INLAIN específicamente adaptado a variedades de pasta blanda (Milesi y col., 2007), duro de pasta no cocida (Milesi y col., 2008) y pasta dura cocida (Hynes y col., 2004). De manera similar a este último caso, en el presente trabajo se utilizó para las elaboraciones un conjunto de 4 tinas queseras de 5L de capacidad, que se operaron en paralelo. La leche se pasteurizó a 63°C durante 20 min y se dejó enfriar en las mismas tinas, excepto en las experimentaciones que requerían uso de leche cruda. Luego de pasteurizar, se enfrió hasta una temperatura de 33°C, momento en el que se agregó CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Alemania) para alcanzar una concentración final en la leche de 0.014 % (p/v). A diferencia de Hynes y col (2004) que usaron un fermento natural de suero compuesto por cepas seleccionadas de *Lb. helveticus* desarrolladas en suero estéril, el fermento iniciador consistió en una mezcla de lactobacilos termófilos comerciales *Lb. helveticus* y *Lb. bulgaricus* (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina) y se adicionó a una concentración de 10⁶ UFC/mL de leche, junto a una cantidad suficiente de ácido láctico 1,5% (p/v) que permitiera llevar el pH de la leche hasta 6,3. De esta manera, el aporte de ácido láctico permite sustituir el suero fermento por un fermento seleccionado de bacterias liofilizadas (Meinardi y col., 2008). Se agregaron 70 mg de coagulante (Maxiren 150, Gist Brocades, Francia) por tina, que fueron suspendidos en 10 mL de agua destilada justo antes de utilizar. Una vez que se produjo la coagulación y que el gel adquirió la firmeza necesaria, se realizó un primer corte de la cuajada y se esperó a que el coágulo se desprenda de las paredes de la tina y exude suero. Luego se realizó un segundo corte, se retiró la lira de las tinas y se inició el calentamiento de la mezcla suero - partículas de cuajada. Al mismo tiempo, se agitó continuamente hasta que se llegó a una temperatura de 52°C. Finalmente, se detuvo la agitación y se permitió que la cuajada se depositara en el fondo de las tinas, para su posterior extracción y moldeo.

Los quesos obtenidos se prensaron durante la noche posterior a la elaboración, se salaron por inmersión en salmuera durante aproximadamente 12 hs (para quesos de 0,5 kg), y luego se maduraron por 90 días a 12°C. Después de 10 días de maduración, se envasaron al vacío. Para fijar este período de maduración previo al envasado en bolsas termocontraíbles, se realizó una curva de humedad vs. peso del queso utilizando dos quesos de muestra. De esta manera se fijó que, aproximadamente a los 15 días los quesos alcanzaban la masa de 350 g y una humedad de 35 %, adecuada para un queso duro. En base a ello el resto de los experimentos se dejó ese mismo período, se verificó la masa y posteriormente se envasó al vacío.

Se realizaron análisis de humedad, proteínas, materia grasa y pH a los 3 y 90 días de maduración.

2.3 Pseudocujadas

El modelo de pseudocujadas utilizado se diseñó e implementó específicamente para la presente tesis. No existen modelos similares que se hayan detectado en la bibliografía.

Las pseudocujadas se prepararon a partir de granos de cuajada y suero obtenidos de una elaboración tradicional de queso Reggianito, en el momento previo a la cocción. Se consigue de esta manera obtener un volumen elevado de cuajada y suero que, reconstituídos en alícuotas menores en la misma proporción que guardan en una fabricación tradicional, permite ensayar numerosos tratamientos como temperaturas de cocción, velocidad de cocción, lavado de cuajada, agregado de aditivos, etc.

Para obtener la materia prima para las pseudocujadas, se realizaron dos elaboraciones de queso Reggianito a escala piloto. En la Figura 1.2 se muestra un esquema del procedimiento llevado a cabo.

Un volumen de 100 L de leche cruda ($\text{pH } 6,7 \pm 0,05$) de gran mezcla, procedente de una industria láctea de la zona de Santa Fe, Argentina (Milkaut Coop. Ltda. Franck, Santa Fe) se estandarizó a 2,8% de MG y se pasteurizó a 63°C durante 30 min. Posteriormente, la leche se enfrió a 33°C y se agregó CaCl_2 para alcanzar una concentración final de 0,014%, seguido del cultivo iniciador, que consistió en una mezcla de fermentos comerciales de lactobacilos termófilos *Lb. helveticus* y *Lb. bulgaricus* (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina) en una concentración de 10^6 UFC/mL de leche, al igual que en los quesos miniatura. También en forma similar, se ajustó el pH de la leche a $\sim 6,3$ con ácido láctico (3% p/v). Después de agitar mecánicamente la leche, se agregó el coagulante (Maxiren 150, Gist Brocades, Francia) a una concentración final en leche de 0,012 g/L. Luego de 18-20 min, la cuajada se cortó hasta lograr el tamaño de grano deseado (aproximadamente la mitad del tamaño de un grano de arroz) y se comenzó a agitar la mezcla de suero-partículas de cuajada. En ese momento, se tomaron aproximadamente 6 kg de la mezcla, siempre bajo agitación. Los granos de cuajada y el suero se separaron por filtración con un tamiz metálico de 1 mm de tamaño de malla, se pesaron las dos fracciones, obteniendo una proporción de cuajada y suero de 1:4, y se conservaron congeladas por separado para su uso posterior.

Para iniciar el proceso de preparación de las pseudocujadas, las partículas de cuajada y el suero fueron descongelados y termostatizados a 33°C. Se prepararon mezclas de $\sim 500\text{g}$,

pesando la cantidad adecuada de las fracciones de suero y cuajada, de manera de mantener las proporciones originales de la tina quesera. Luego, las mezclas se incubaron a 37°C hasta que llegaron a pH 5,6 y se procedió primero con una etapa de calentamiento a 1°C/min bajo agitación constante hasta llegar a 45°C, y después con una segunda rampa de calentamiento (<1°C/min) hasta 50°C. Cuando las mezclas alcanzaron la temperatura de cocción, la agitación se detuvo. Las partículas de cuajada fueron separadas del suero por centrifugación a 2750g a 37°C (Multi RF ThermoScientific, USA) durante 20 min en tubos de 250 mL. Las pseudocuajadas así obtenidas se colocaron en heladera (4°C) durante 5 min y se salaron por inmersión en salmuera a 12°C durante 20 min. Por cada experiencia, 3 réplicas de elaboración fueron obtenidas y 2 minicuajadas fueron elaboradas en paralelo; una se analizó a los 0 días y la otra se reservó durante 7 días envasada al vacío. Se realizaron análisis de pH, humedad, proteínas.

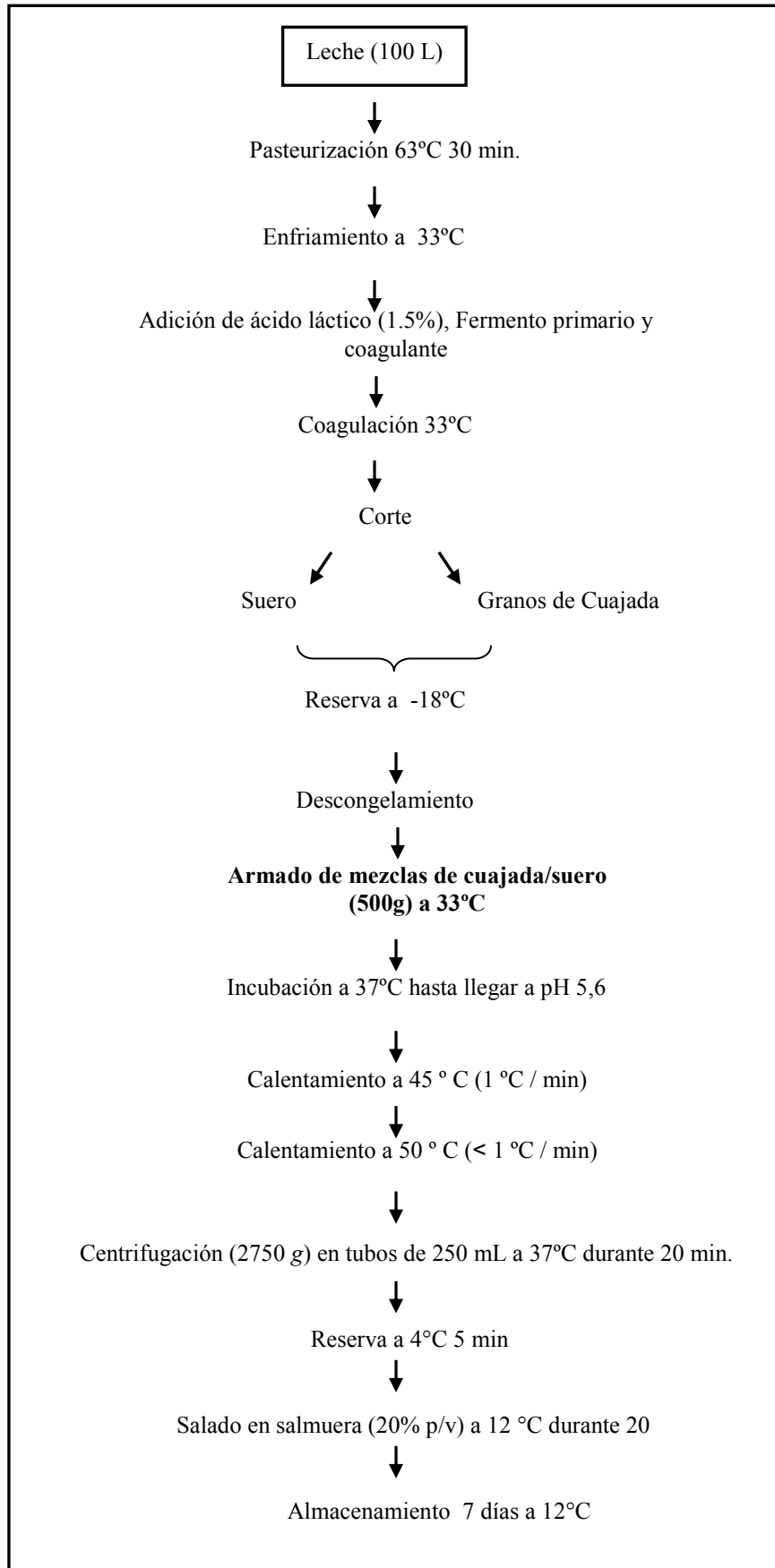


Figura 1.2. Esquema de preparación de pseudocujadas.

2.4 Análisis

pH

La determinación de pH en las muestras de queso/cuajada se realizó de acuerdo al método estándar de la APHA (Bradley y col., 1993). Para ello, se utilizó un peachímetro (Titriskop E516, Suiza) provisto de un electrodo combinado (vidrio y calomel), que se calibró con soluciones tamponadas de pH 7,00 y 4,00. La medición se realizó introduciendo el electrodo en una suspensión del queso en agua (dilución al medio). La lectura de pH se realizó una vez que se estabilizó el valor del mismo.

Humedad

El porcentaje de humedad se determinó por secado de las muestras de cuajada/queso en estufa a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta pesada constante, de acuerdo a la metodología normalizada de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF N° 4 A, 1982).

En primer lugar, se pesó un cristizador conteniendo arena tratada con ácido (alrededor de 25 g) y una varilla de vidrio, y que previamente habían sido secados a la misma temperatura del ensayo. Luego, se colocó aproximadamente 3g de cuajada/queso (pesada exacta) en el cristizador y se pesó nuevamente. La muestra se homogeneizó lo mejor posible con la arena con la ayuda de la varilla para evitar la formación de una capa que dificulte la evaporación. Se colocó en estufa a 102°C hasta pesada constante, aproximadamente 5 h. Finalmente, se registró el peso del cristizador con la muestra seca y se determinó el contenido de humedad calculando la diferencia entre el peso de la muestra húmeda y la muestra seca. El resultado se expresó como porcentaje en la masa del queso (% p/p).

Materia Grasa

El contenido de materia grasa (MG) en la cuajada/queso fue determinado por el método butirométrico de Gerber van Gulik (FIL-IDF N° 152 A 1997), empleando un butirómetro específico para queso. Se pesaron aproximadamente 2,5g de muestra (pesada exacta) y se agregó una solución de ácido sulfúrico (densidad 1,52) hasta llenar completamente el bulbo del butirómetro. Luego se adicionó 1 mL de alcohol isoamílico. Se tapó el butirómetro, se agitó suavemente, y se colocó en un baño a $60 - 70^\circ\text{C}$ para favorecer la completa disolución del queso. Por último, se centrifugó a máxima velocidad entre 5 y 10 minutos utilizando una centrífuga específica para butirómetros (Centrífuga de Gerber). Finalmente, se leyó, en la

escala, en un baño a 65°C el espacio ocupado por la grasa y este valor se utilizó para el cálculo de la MG en el queso (% p/p).

Proteínas

El contenido de proteínas totales se determinó mediante el método de Kjeldahl, de acuerdo a la norma FIL-IDF N° 20 B (1993). Se tomaron aproximadamente 0,3 g de queso (pesada exacta), que se colocaron en un tubo de digestión. Luego, se adicionaron aproximadamente 3,5 g de sulfato de potasio, 100 mg de dióxido de titanio, y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Para la mineralización de la muestra, se utilizó una unidad digestora para seis tubos, con sistema de aspiración de humos (Digestion System 6, 1007 Digester, Tekator, Suecia). Se realizó la digestión de la muestra a la máxima temperatura del equipo (420°C), hasta que el líquido se tornó transparente y límpido. La destilación de las muestras se realizó en un equipo BÜCHI Distillation Unit B-324 (Suiza). En primer lugar, se agregaron automáticamente 70 mL de hidróxido de sodio 32% (p/v) para la alcalinización del medio, y luego se inició la destilación por arrastre con vapor. Los vapores se recogieron en un erlenmeyer con 60 mL de ácido bórico 2% (p/v), que tenía adicionado un indicador con un viraje a pH 4,65, compuesto por azul de metileno (0,1% p/v) y rojo de metilo (0,15% p/v) en alcohol etílico 96%. Finalmente, se realizó en forma manual la titulación del borato de amonio formado, con una solución valorada de ácido sulfúrico 0,1 N, utilizando una microbureta de 5,00 mL de capacidad.

Para expresar el resultado en g % de proteínas totales, se multiplicó el valor obtenido de nitrógeno total por el factor 6.38, que corresponde a las proteínas provenientes de productos lácteos.

2.4 Resultados y Discusión

Con respecto a la elaboración de las minicujadas, el tiempo de coagulación y las características del coágulo fueron adecuados, y de manera sencilla se pudo obtener un modelo repetitivo para evaluar la retención de MG en una matriz casearia. Los porcentajes de humedad y MG promedio fueron de 54.66 ± 1.3 y 22.01 ± 1.0 respectivamente. En la presente tesis, este modelo se aplicó para determinar si la fracción grasa tratada mecánicamente causaba algún tipo de detrimento en la coagulación y en la capacidad de retener la MG, con el fin de corroborar si el tratamiento era factible de ser aplicado en la elaboración de quesos.

En cuanto a los quesos miniatura, éstos se utilizaron para un análisis más profundo de los efectos de los tratamientos sobre la MG. Para evaluar su reproducibilidad se realizaron análisis de contenido humedad, proteína y MG (Tabla 1.1) a los 3 y 90 días de maduración. Se observó que los valores de humedad disminuyeron ligeramente con el tiempo como consecuencia de la evaporación durante el almacenamiento en cámara de maduración. Los valores fueron similares a los informados para este tipo de quesos tanto en los productos convencionales (Candiotti y col., 2002), como los miniaturizados (Hynes y col., 2004). Al final de la maduración los valores se encontraron de acuerdo con los requerimientos del Código Alimentario Argentino para quesos duros tipo Reggianito (ANMAT, 2009). Existen estudios donde se describe la obtención de quesos miniatura de composición similar a las variedades de quesos simuladas. Shakeel-Ur-Rheman y col. (1998b) implementaron un protocolo para la manufactura de quesos Cheddar miniatura utilizando 200 mL de leche que se maduraron durante cuatro meses. Los niveles de humedad, proteína y pH a los 2 y 4 meses fueron similares a los encontrados en quesos controles elaborados a escala piloto (20 L). Hynes y col. (2000) describieron el diseño de un modelo de queso miniatura tipo “Saint Paulin” de pasta lavada elaborados con 400 mL de leche. Los valores de materia seca y pH también se encontraron dentro del rango reportado para ese tipo de queso. Milesi y col. (2008) utilizaron un modelo de queso Cheddar miniatura (partiendo de 200 mL de leche) y de queso cremoso argentino (2000 mL) para estudiar la influencia del proceso de elaboración, las condiciones de maduración y el fermento primario sobre la viabilidad y la actividad proteolítica de un fermento adjunto. Los autores encontraron que la composición de los quesos era la típica para esas variedades, y les fue posible realizar un seguimiento de la proteólisis durante la maduración.

Existen varios trabajos donde se ha estudiado la lipólisis en quesos comerciales y en quesos elaborados a escala piloto (O’Mahony y col., 2006; Berard y col., 2007; Lopez y col. 2006; Hickey y col. 2007; Voigt y col. 2012); y también se han obtenido muy buenas aproximaciones en el estudio de la influencia de variables tecnológicas en los perfiles de lipólisis de quesos miniatura. Morales y col. (2006) estudiaron el efecto del agregado de un fermento sobre la liberación de ácidos grasos libres durante 14 días de maduración en quesos semi-blandos miniatura de 250 g. Di Cagno y col. (2006) utilizaron un modelo de queso Caciotta miniatura basado en el modelo descrito por Shakeel-Ur-Rheman y col. (1998b) para quesos Cheddar con el objeto de seleccionar fermentos adjuntos según sus actividades

proteolíticas y lipolíticas. En cuanto a variedades de quesos argentinos, no se ha reportado el estudio de perfiles lipolíticos en quesos miniatura.

Tabla 1.1. Valores de contenido de humedad, proteína y materia grasa y pH en miniquesos.

%	3 días	90 días
Humedad	44,85 ^a ± 1,01	34,50 ^b ± 1,4
Proteínas	39,51 ^a ± 0,4	28,85 ^a ± 0,58
MG	26,08 ^a ± 1,14	35,15 ^b ± 1,31
pH	5,30 ^a ± 0,05	5,35 ^a ± 0,07

^{a,b}Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

Respecto a las pseudocujadas, se realizaron experimentos de tipo control, que asemejaban los valores de pH de drenado de suero y la rampa de temperatura de cocción de un queso estándar. Las muestras se almacenaron durante 7 días, un período breve pero destinado a evaluar los primeros cambios que tienen lugar durante la maduración. En estas muestras, se analizó el contenido de humedad, proteínas y pH. Para estos parámetros, no se obtuvieron diferencias significativas con el tiempo de almacenamiento (ver Tabla 1.2). Aunque ligeramente mayores a los de un queso maduro, los valores de humedad fueron inferiores a los obtenidos para las minicujadas coaguladas directamente en tubos falcon, lo cual probablemente se debe a la acidificación por el fermento, al corte en tina –más eficiente que el corte con espátula en tubos de ensayo - y a la centrifugación a mayor fuerza g. El modelo de pseudocujada desarrollado permitió obtener una simulación de las condiciones reales de la elaboración de un queso, ya que se utilizó como materia prima el suero y los granos de cuajada de una elaboración a escala piloto. La matriz obtenida representa correctamente un estadio temprano de maduración de este tipo de quesos, y a la vez permite manipular de manera relativamente sencilla distintas variables tecnológicas de la elaboración y evaluar su impacto sobre la acción proteolítica de la enzima plasmina. En la bibliografía se han reportado estudios del sistema plasmina en quesos comerciales maduros (Richardson y Pearce, 1981; Rampilla y Raja 1998), en modelos de quesos Cheddar miniatura (Somers y Kelly, 2002; Milesi y col., 2008) y en cuajadas coaguladas ácidamente (Choi y col., 2006; Farkye y Fox, 1991). Además existen estudios sobre proteólisis en modelos de cuajadas ácidas y slurries;

los cuales difieren en mayor medida de la composición real de un queso (Choi y col. 2006; Farkye y Fox 1991; Farkye y col., 1995; Muehlenkamp-Ulate y col., 1999; Yu y col., 2012). Choi y col. (2006) obtuvieron cuajadas con un 90% de humedad, y un 3% de proteínas. Farkye y col. (1995) obtuvieron slurries de quesos Cheddar de 57,70 % de humedad, 16,50% de grasa, 23,18% de proteína; el modelo propuesto por Milesi y col. (2008) obtuvo ~61 % de humedad, y un 18% de proteínas. La pseudocuajada implementada en el presente capítulo presenta por lo tanto ventajas sobre los citados modelos.

Tabla 1.2. Valores de contenido de humedad, proteína, materia grasa y pH de pseudocuajadas

%	0 días	7 días
Humedad	38.44 ^a ± 0.52	37.79 ^a ± 0.67
Proteínas	30.22 ^a ± 1.56	30.53 ^a ± 1.14
pH	5.60 ^a ± 0.14	5.38 ^a ± 0.11

^{a,b}Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

2.5 Conclusiones

En el presente trabajo se implementaron tres sistemas modelo, representativos de quesos de pasta dura. Cada uno de ellos se destinó a ensayos in vitro o en miniatura para evaluar el impacto de cambios tecnológicos particulares en la actividad de enzimas y la bioquímica de la maduración.

Se obtuvieron matrices alimentarias de composición reproducible y conocida, que se aplicaron en las experiencias que se describen en los capítulos siguientes.

Capítulo 2:

**Influencia del pre-tratamiento de la leche
de elaboración en la lipólisis de quesos
duros de pasta cocida**

1. Introducción

Se entiende por lipólisis, a la hidrólisis enzimática de los triacilglicéridos (TG) que dan origen a los ácidos grasos libres (AGL), al glicerol y a los mono y diacilglicéridos (McSweeney y Sousa, 2000). Los ácidos grasos libres son precursores de reacciones catabólicas que conducen a la formación de una gran gama de compuestos aromáticos, tales como los ésteres, las metilcetonas, lactonas y alcoholes secundarios; además, los ácidos grasos libres de cadena corta contribuyen directamente al flavour del queso.

En la leche, la hidrólisis enzimática no se produce espontáneamente, debido a que la enzima nativa lipoproteína lipasa (LPL) y los sustratos se encuentran compartimentalizados: en efecto, los TG se hallan dentro de glóbulos grasos rodeados por una membrana y la LPL se encuentra asociada a la fase proteica.

En quesos, la lipólisis puede ser producida por varios agentes enzimáticos: la LPL, el cuajo (en caso de utilizar cuajo en pasta con lipasas activas), los fermentos lácticos primarios, los fermentos secundarios de hongos o bacterias si los hubiera, la microflora no perteneciente al fermento (NSLAB) y las lipasas exógenas potencialmente agregadas (Collins y col, 2003).

Los procesos físicos aplicados en la leche antes de la elaboración de quesos (agitación mecánica, bombeo, homogeneización) pueden disminuir la acción protectora de la membrana del glóbulo graso y favorecer la lipólisis (Evers 2004a; Werner y col., 1993). Además, los tratamientos térmicos dirigidos a la pasteurización o termización de la leche y a la cocción de la cuajada pueden inducir cambios en la actividad de las enzimas, modificar la microbiota y provocar cambios bioquímicos afectando el flavor y la calidad global del producto (Lawrence y col., 1993).

En este contexto, existe escasa evidencia científica sobre los efectos de variables tecnológicas aplicadas en la elaboración de quesos duros de pasta cocida sobre la lipólisis y su influencia en las características del producto final. El objetivo del presente capítulo fue identificar los tratamientos tecnológicos más favorables: tratamiento térmico, agitación, bombeo, y homogeneización para pre-tratar la leche de elaboración con el fin de incrementar la lipólisis en quesos duros de pasta cocida en vistas a acelerar la maduración e intensificar el flavor típico. Para ello, se ensayaron i) tratamientos físicos de agitación y bombeo a distintas temperaturas, dirigidos a evaluar el daño en la membrana del glóbulo graso en mezclas de crema y leche descremada preparadas a distintos porcentajes de grasa ii) elaboración de minicujadas con la leche pre-tratada, para conocer la eficacia de la retención de la grasa

tratada en la matriz láctea iii) elaboración de miniquesos, con el fin de evaluar el tratamiento térmico, el tratamiento físico de agitación y la homogeneización de la leche sobre la lipólisis.

2. Selección del tratamiento físico

El objetivo de esta experiencia fue seleccionar un tratamiento físico adecuado para tratar la leche de elaboración, de manera de generar modificaciones en la estructura de la materia grasa con el fin de incrementar la accesibilidad de la misma a las enzimas lipolíticas.

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Diseño experimental

Se empleó un diseño factorial de tres factores por tres niveles para evaluar el daño causado por distintos pre-tratamientos sobre los glóbulos grasos de la leche (Tabla 2.1). Los factores fueron: temperatura (F1: 5, 15 y 45°C), contenido de grasa (F2: 5%, 15% y 30% MG) y tratamiento mecánico (F3: ausencia de tratamiento, bombeo y agitación mecánica), que se aplicaron sobre mezclas de crema – leche descremada. Los ensayos se realizaron por duplicado, y las mezclas no tratadas se referenciaron como los controles de los pre-tratamientos.

Para evaluar el deterioro de los glóbulos se analizó la grasa libre.

Tabla 2.1. Diseño experimental para la selección del tratamiento físico.

Factor ensayado ^a	Niveles		
	N1	N2	N3
F1	5°C	15°C	45°C
F2	5% MG	15% MG	30% MG
F3	Ausencia de tratamiento	Bombeo	Agitación mecánica

Factor ensayado: F1: Temperatura; F2: Contenido de grasa de las mezclas, F3: Tratamiento mecánico

2.1.2. Preparación y pre-tratamiento de las mezclas de crema-leche descremada

En la Figura 2.1 se muestra el esquema experimental. Un volumen de 40 L de leche cruda de gran mezcla (pH 6.60 ± 0.05) procedente de una industria láctea de Santa Fe (Milkaut SA,

Franck, Argentina) fue centrifugada a 500 g (Alfa Laval, Lund, Suecia) a un caudal de 40 L/h y a 40°C, para obtener leche descremada (<0.1 % MG) y crema (>40 % MG). Utilizando estas fracciones se prepararon las mezclas con distintos porcentajes de grasa por balance de masa, que se trataron a las temperaturas de consigna (Tabla 2.1). El tratamiento de bombeo se realizó por recirculación en una bomba centrífuga (Dison, Santa Fe, Argentina) a 3L/min durante 8 min, y para la agitación mecánica se empleó una licuadora industrial (Metvisa, Brusque SC, Brasil) a 2800 rpm durante 2 min. Estas condiciones operativas, que corresponden a los niveles del factor tratamiento físico, fueron establecidas en ensayos preliminares (cuyos resultados se presentan en la Sección 2.2 del presente capítulo).

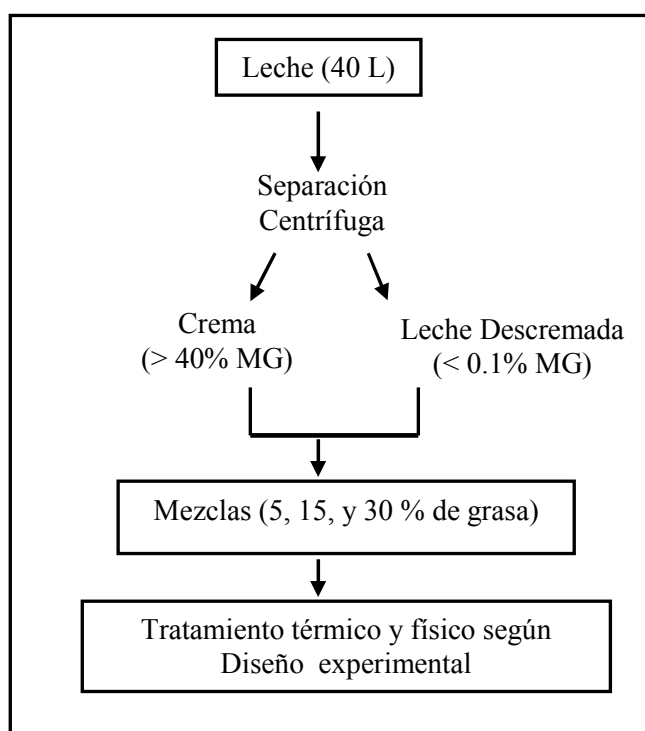


Figura 2.1. Esquema experimental para la preparación y el pre-tratamiento de mezclas de crema – leche descremada.

2.1.3 Análisis

Grasa libre

La grasa libre fue evaluada en las mezclas controles y tratadas. El término grasa libre es usado para denotar un parámetro que se correlaciona con el daño a los glóbulos grasos, ya que corresponde a la grasa no emulsionada. Sin embargo, es un término controvertido ya que se cree que la grasa libre *per se* no puede existir por más de unas fracciones de segundos antes de que se recubra por material tensoactivo presente en el plasma de la leche (Walstra y col., 1999d). En nuestro trabajo, la grasa libre obtenida por centrifugación fue utilizada como un parámetro definido por el método de medición, con el fin de comparar las diferentes muestras entre sí y de esta manera inferir la extensión del daño a la membrana del glóbulo graso. El método de separación centrífuga se basa en la diferencia de densidad que existe entre la grasa que se encuentra libre y la que está rodeada por la membrana del glóbulo graso (Evers 2004a).

Las muestras se calentaron en un baño a 40°C durante 15 min y se agitaron por inversión. En tubos de 50 mL de capacidad se colocaron 40 mL de muestra que se mantuvieron en baño a 60°C durante 15 min. Los tubos se centrifugaron a 600 g por 10 minutos y se colocaron nuevamente a 60°C durante 5 min. Finalmente, las muestras tratadas se compararon con las controles midiendo la altura de la capa de grasa libre liberada con un calibre Vernier. Las muestras se clasificaron usando una escala de tres puntos variando desde muy débil / apenas perceptible (una altura de menos de 5 mm), pasando por una liberación media (5-7 mm) hasta la liberación máxima de grasa libre (mayor a 7 mm).

Microscopía de contraste de fases

La microscopía se llevó a cabo en muestras de grasa libre y de la interfase crema-grasa libre, ambas obtenidas luego del análisis de grasa libre por centrifugación. La observación se efectuó a 1000 x, colocando una gota de muestra en un portaobjetos. Las muestras tratadas se compararon con los controles.

Grasa total en leche

El contenido de MG en la leche fue determinado por el método de Gerber (Bradley y col., 1992). Antes de tomar la muestra, la leche se calentó a 40°C y se agitó para que la MG se distribuya homogéneamente. A continuación, se enfrió en un baño hasta 20°C.

Se colocaron 10 mL de ácido sulfúrico 90% p/p ($d=1,82$) en un butirómetro específico para leche. Luego se tomó la muestra de leche a 20°C utilizando una pipeta de 11,1 mL, y se

agregó al butirómetro lentamente para evitar una reacción violenta. Se adicionó 1 mL de alcohol isoamílico y se tapó el butirómetro con un tapón de goma, agitando hasta lograr una disolución completa. Se centrifugó durante 5 min (centrífuga de Gerber), se termostatóizó durante 5 min a 65°C y se leyó el contenido de grasa en la escala graduada.

Grasa total en crema

El contenido de MG en la crema fue determinado por el método de Gerber de manera similar al mencionado anteriormente para el análisis de leche, sólo que se utilizó un butirómetro específico para crema en el que se pesaron 5 g de una muestra a 20°C en una copa específica para butirómetros, se agregaron 10 mL de ácido sulfúrico 90 % p/p, 5 mL de agua y 1 mL de alcohol isoamílico.

Estas determinaciones se realizaron por duplicado.

2.2 Resultados

Selección de las condiciones operativas del tratamiento mecánico

Con respecto al tratamiento mecánico, las mezclas (2 L) fueron agitadas a 2800 rpm, y se ensayaron distintos períodos de tratamiento, en un rango de 2 a 5 min. Tiempos mayores a 3 minutos, a temperaturas menores de 15°C y con porcentajes de MG mayores al 15%, provocaron la desestabilización total de la emulsión con inversión de fases (emulsión de agua en grasa). Períodos de 2 min a la misma velocidad con 1 min de descanso (1 min de agitación, 1 minuto de descanso, y finalmente 1 minuto de agitación nuevamente) permitieron niveles de grasa libre moderados/altos, reproducibles, y sin inversión de fases por lo cual se seleccionaron para el resto de los experimentos.

En cuanto al bombeo, se testearon distintos tiempos de recirculación, de 2 a 10 minutos, a un caudal constante de 3 L/min. Los tratamientos de bombeo mayores a 8 minutos causaron un daño excesivo a la membrana de glóbulo graso, lo cual se evidenció con una muy elevada liberación de grasa libre en mezclas de más de 15% de grasa tratadas a 15°C o a temperaturas menores. Además, cuando el tiempo de bombeo era elevado se producía un espumado excesivo que ocasionaba problemas, debido al ingreso de aire al sistema. En efecto, a pesar de que el equipo fue acondicionado para evitar la entrada de aire y la consecuente formación de espuma, a tiempo prolongado de tratamiento esto resultaba difícil de mantener y el ingreso de aire finalmente ocurría.

Pre-tratamiento de las mezclas

Los resultados del análisis de grasa libre se muestran en la Tabla 2.2. Entre todas las condiciones ensayadas, las mezclas que presentaron mayor liberación de grasa libre -lo que a su vez indica mayor daño a la membrana del glóbulo graso- fueron las de mayor contenido de MG.

Tabla 2.2: Grasa libre en las mezclas de crema – leche descremada luego de la aplicación de los distintos tratamientos.

Temperatura	Tratamiento Mecánico ²	Contenido de grasa de la mezcla ¹		
		5 %MG	15% MG	30 % MG
5°C	A	–	++	+++
	B	–	+	++
15°C	A	–	+	++
	B	–	+	+
45°C	A	–	–	–
	B	–	–	–

¹ Grasa libre: - no se observó grasa libre; +Mínima liberación de grasa libre; ++ Liberación intermedia de grasa libre +++ Máxima cantidad de grasa libre.

² Tratamiento mecánico: A: agitación; B: bombeo.

Con respecto a la temperatura, la mayor liberación de grasa libre se produjo entre 5 y 15 °C. La combinación de temperatura – contenido de MG que produjo la mayor cantidad de grasa libre fue 5°C y 30% de MG.

La agitación mecánica fue el procedimiento más reproducible de los dos tratamientos físicos ensayados, y el que produjo una mayor liberación de grasa. Además, los tiempos de tratamiento resultaron menores y la manipulación más simple.

En síntesis, las condiciones más apropiadas para tratar la mezcla fue a 5°C y 30% MG, bajo agitación mecánica a 2800 rpm durante 2 min.

En la Figura 2.2 (A, B, y C) se observan imágenes tomadas al microscopio óptico de muestras de 30 % MG agitadas a 5°C. Se muestran una mezcla control, la interfase de crema / grasa libre de una mezcla tratada y la grasa libre de una muestra tratada, respectivamente. En

la interfase, se observaron glóbulos agregados, mientras que en la grasa libre, sólo se apreciaron algunos restos del material de membrana de los glóbulos.

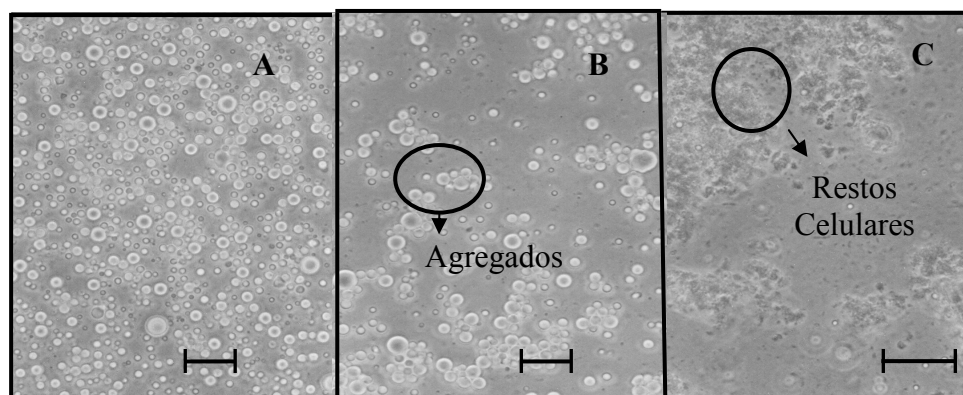


Figura 2.2. Observación microscópica de mezclas de 30 % MG control y agitada a 5 °C. (A) Mezcla control, (B) Interfase grasa libre/crema de la mezcla tratada, (C) Fase de grasa libre de la mezcla tratada.

3. Aplicación del tratamiento seleccionado en un modelo de minicujadas

El objetivo de esta etapa fue evaluar la factibilidad de aplicar el tratamiento físico seleccionado en la elaboración de minicujadas estudiando la retención de la MG tratada en la matriz casearia.

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Preparación de minicujadas

Las minicujadas se prepararon en tubos Falcon, con 40 mL de leche estandarizada al 3% de MG, obtenida por dilución con leche descremada de la mezcla tratada (30% MG) por el procedimiento seleccionado (5°C, agitación mecánica a 2800 rpm durante 2 min). La mezcla sin tratar se diluyó de manera similar y se utilizó para la preparación de minicujadas controles. La elaboración comenzó con la etapa de coagulación a 33°C, seguida por el corte de la cuajada, una etapa de cocción hasta 50°C, y la separación del suero por centrifugación; de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 2.1 del Capítulo 1, que modela el proceso estándar de elaboración de quesos tipo Reggianito. Se determinó la grasa total y la humedad en las minicujadas recién elaboradas, y el contenido de grasa libre y de grasa total en el suero. Se obtuvieron cuatro réplicas de minicujadas.

3.1.2 Análisis

Grasa total en minicujadas

Se empleó el método butirométrico de Gerber van Gulik según la técnica detallada en la Sección 2.3 del Capítulo 1.

Grasa total en suero

Se analizó por el método butirométrico de Gerber, y se procedió de manera similar a la leche, utilizando un butirómetro específico para suero. En este caso se adicionaron 20 mL de ácido sulfúrico al 90% p/p, 22 mL de suero, y 2 mL de alcohol isoamílico.

Humedad

El porcentaje de humedad se determinó por secado, según la técnica descrita en la Sección 2.3 del Capítulo 1.

Estos análisis se hicieron por duplicado.

Análisis Estadístico

Para los parámetros estudiados, se calcularon el promedio y la desviación estándar y aplicó un análisis de variancia (ANOVA) de una vía para detectar diferencias significativas entre los tratamientos analizados y el método de la mínima diferencia significativa (LSD) para comparar las medias con un 95% de confianza. Para ello se utilizó el software de análisis SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

3.2 Resultados

Preparación de minicujadas

Durante el procedimiento de elaboración, se observó que el tiempo de coagulación y las características del coágulo fueron similares para todas las minicujadas. La humedad y el contenido de grasa de las minicujadas elaboradas con mezclas tratadas no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) cuando se compararon con las muestras controles (Tabla 2.3); los valores promedios fueron 56 % para la humedad y 22% para la MG, lo cual es apropiado para cuajadas recién elaboradas.

En cuanto al contenido de grasa en las muestras de suero, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras tratadas y controles; los valores medios fueron $0,45 \pm 0,03$ % y $0,50 \pm 0,02$ % para las muestras tratadas y controles, respectivamente.

Estos resultados demostraron que el pre-tratamiento de la leche en vistas a aumentar la lipólisis sería factible de ser aplicado en quesos duros, por lo cual se avanzó a ensayar la elaboración de quesos.

Tabla 2.3: Contenido de humedad y grasa de minicuajadas elaboradas con mezclas tratadas y controles.

	Tratadas	Controles
Humedad %	55,9 ± 2,7	56,0 ± 1,6
Grasa %	22,0 ± 2,5	21,8 ± 3,0

4. Influencia del pre-tratamiento de la leche (tratamiento térmico y agitación mecánica) sobre la lipólisis y producción de compuestos volátiles en quesos duros miniatura

El objetivo de esta etapa fue valorar la influencia de la intervención seleccionada para el pre-tratamiento de la leche en la lipólisis y la producción de compuestos volátiles en quesos duros, en vistas a acelerar la maduración o intensificar el sabor picante. Asimismo, se determinó la influencia del tratamiento térmico.

4.1 Materiales y Métodos

4.1.1 Diseño experimental

Se evaluó la influencia de dos factores a dos niveles cada uno sobre la lipólisis y la producción de compuestos volátiles: en primer lugar se ensayó el pre-tratamiento seleccionado en las experiencias anteriores, consistente en la agitación mecánica de una mezcla de 30% de MG a 5°C, 2800 rpm durante 2 min, con posterior dilución a 3% de MG, comparado con una mezcla similar no agitada; en segundo lugar se incluyó como factor el tratamiento térmico de la leche. Para este último se trabajó a dos niveles, uno de ellos consistió en la pasteurización *batch* estándar (63 °C, 30 min) y el otro fue la sanitización no térmica de la leche por afloramiento espontáneo de la crema. Los cuatro tratamientos ensayados se muestran en la Tabla 2.4. Por cada uno de ellos, se realizaron dos réplicas de elaboración en días distintos con diferente leche, lo cual arrojó un total de 4 quesos por cada tratamiento (ver Sección 4.1.3).

Tabla 2.4: Diseño experimental utilizado en la evaluación de la influencia del pre-tratamiento de la leche en la lipólisis y formación de compuestos volátiles de miniquesos.

Tratamiento Térmico (F1)		
Agitación Mecánica (F2)	Pasteurización	Afloramiento
Mezcla Agitada	PA	AfA
Mezcla No-Agitada	PN	AfN

PA: Quesos elaborados con leche pasteurizada y mezcla agitada, PN: Quesos elaborados con leche pasteurizada y mezcla no agitada, AfA: Quesos elaborados con leche aflorada y mezcla agitada, AfN: Quesos elaborados con leche aflorada y mezcla no agitada.

4.1.2 Pre-tratamiento de la leche

Un volumen de 40 L de leche cruda se utilizó para preparar mezclas de 30% de MG, tal como se describió en la Sección 2.1.2. Las mismas se agitaron mecánicamente durante 2 minutos trabajando a 5°C. Para corroborar la eficacia de los tratamientos, se incluyeron muestras controles que consistieron en mezclas no tratadas. Se tomaron muestras de las mezclas agitadas (A) y no agitadas (N) para el análisis de grasa libre.

En cada caso, la leche de elaboración fue obtenida por dilución de la mezcla hasta un 3% de MG con leche descremada. La leche descremada fue obtenida por separación centrífuga (ver Sección 2.1.2) o por afloramiento (durante 12 h a 12°C). El primer procedimiento se utilizó para la elaboración de quesos en los cuales se aplicó la pasteurización (P), y el segundo para los quesos elaborados con leche no tratada térmicamente y sanitizada por afloramiento (Af).

Para el procedimiento de afloramiento o descremado natural, 40 L de leche se termostataron a 40°C en tina, y se colocaron en una batea a 12°C durante 12 h; la crema aflorada se descartó y se recogió por la parte inferior la leche descremada (~ 1 % MG). Este proceso se adaptó del que se utiliza comúnmente en la elaboración de quesos italianos, como el Parmigiano Reggiano y Grana Padano, en los cuales la leche es parcialmente descremada durante 8-12 hs. La leche se coloca en vasijas de separación poco profundas durante la noche, y la grasa aflora naturalmente en la superficie; la leche descremada se recoge desde el fondo (Battistotti y Corradini, 1993). Durante este proceso, no sólo se logra el descremado parcial de la leche sino que también se consigue una reducción del contenido microbiano de

aproximadamente un orden logarítmico, dependiendo de la época del año (Zannoni y Nanni, 1982).

4.1.3 Elaboración de quesos

El proceso de elaboración de quesos Reggianito se adaptó a escala laboratorio, obteniéndose quesos miniatura. Para ello, se empleó un conjunto de 4 tinas queseras de 5L de capacidad, que se operaron en paralelo. Para el caso de los quesos elaborados con leche pasteurizada, la materia prima se pasteurizó a 63°C durante 30 min y se dejó enfriar en las mismas tinas. Se realizaron 2 réplicas de elaboración por cada tratamiento, en días distintos, de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 2.3 del Capítulo 1. Durante la elaboración, se tomaron muestras de sueros para análisis de grasa libre y total.

Los quesos obtenidos se salaron por inmersión en salmuera durante aproximadamente 12 hs (para quesos de 0,5 kg), y luego se maduraron por 90 días a 12°C y 85% de humedad. Se envasaron al vacío a los 15 días y se extrajeron muestras a los 3 y a los 90 días, de acuerdo al método normalizado de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF N° 50 C, 1995), que se almacenaron a -18°C hasta su análisis.

4.1.4 Análisis

Grasa libre y total

Se determinó en las mezclas agitadas (A) y no agitadas (N), y en el suero obtenido de las elaboraciones, en el cual se valoró además la grasa total según la técnica descrita en la Sección 2.1.3 del presente Capítulo.

Composición química global y pH

Se determinaron al principio (3 días) y al final de maduración (90 días) por técnicas normalizadas que se detallaron en la Sección 2.3 del Capítulo 1.

Contenido de Nitrógeno Soluble (NS-pH 4.6)

La proteólisis se evaluó a los 90 días de maduración mediante la determinación del nitrógeno soluble a pH 4.6. En primer lugar, se obtuvo una suspensión del queso en citrato de sodio. Para ello, se tomaron 10 g de la muestra y se homogeneizaron en mortero con 20 mL de solución de citrato de sodio 0,5 M. La suspensión homogénea se trasvasó a un vaso de precipitado adicionando agua destilada hasta completar un volumen de aproximadamente 90

mL. Se agregó gota a gota una solución de HCl 20% v/v a la suspensión, bajo agitación mecánica, hasta alcanzar un valor de pH de 4,6. Una vez que dicho valor se estabilizó, se centrifugó a 900 g durante 10 minutos, obteniéndose dos fracciones, una soluble y otra insoluble.

La fracción soluble se trasvasó a un matraz de 100 mL, se enrasó y se homogeneizó. Se tomaron 10 mL para la determinación del contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl, realizando la digestión y destilación de forma similar a lo mencionado en el análisis de nitrógeno total (Sección 2.4 del Capítulo 1). El contenido de nitrógeno de esta fracción, representa el nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6) (Gripon y col., 1975, Bernal y col., 2001). El resultado se expresó como proporción del nitrógeno total (%).

Análisis de Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres (AGL) desde C_{4:0} hasta C_{18:2} fueron extraídos y cuantificados por cromatografía gaseosa (CG) en muestras de quesos al inicio y al final de la maduración (3 y 90 días, respectivamente). La determinación se realizó según Perotti et al. (2005), con ligeras modificaciones. Se procesaron 4g de muestra y se realizó una extracción en caliente con 100 mL de hexano en un extractor sólido-líquido (extractor tipo Twyselmann), a pH < 3. Se agregaron los ácidos grasos enántico (C_{7:0}) y margárico (C_{17:0}) a la mezcla de extracción como estándares internos.

Finalizada la etapa de extracción, la materia grasa disuelta en el hexano se concentró hasta 20 ml y se agregaron 20 mL de alcohol isopropílico y 15 mL de agua. Con el objeto de aislar los AGL de los TG se efectuó por titulación con NaOH 0,1N en 2 fases

Con el objeto de aislar los AGL de los TG, se realizó una valoración con NaOH 0,1 N en dos fases. La materia grasa disuelta en el hexano se concentró hasta 20 mL y se agregaron 20 mL de alcohol isopropílico, 15 mL de agua y gotas de fenofaleína. El exceso de NaOH se verificó por el viraje del indicador en la fase acuosa-alcohólica e indicó el pasaje completo de los AGL (en forma de sales) hacia la misma. La solución acuosa se evaporó a sequedad y se procedió con la esterificación.

Los AGL esterificados fueron analizados por triplicado en un cromatógrafo de gases modelo 9000 con software Turbochrom v4.0, equipado con un inyector split-splitless operado en modo split (equipado con un liner de 92 mm de altura y 4 mm de diámetro interno), un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de sílice fundida PE-Wax (polietilenglicol, 60 m x 0.25 mm x 0.25 um), todo de Perkin Elmer (Massachussets, USA).

Las condiciones operativas fueron las siguientes: se mantuvo la temperatura inicial del horno a 75°C durante 1.5 min, se incrementó hasta 150°C a razón de 8°C/min y se mantuvo 10 min, y finalmente se llegó a la temperatura final de 245°C a razón de 10°C/min que se mantuvo constante durante 15 min. El inyector se termostató a 250°C y el detector a 300°C. Se utilizó N₂ como gas carrier fijándose el caudal en 3mL/min. y la relación de split en 1:50. Las concentraciones de los 10 ácidos grasos libres analizados se expresaron en µmol AGL/100 g grasa.

Compuestos volátiles por GC/FID-MS

Para aislar y concentrar los compuestos volátiles, se utilizó un dispositivo manual SPME equipado con una fibra Stable Flex DVB/CAR/PDMS de 1 cm x 50/30µm. Las muestras de los quesos se pesaron en viales de vidrio de 30 mL, los cuales se sellaron herméticamente con un séptum y un precinto de aluminio. Los viales se termostataron a 40±1 °C durante 10 minutos y luego la fibra se expuso al headspace durante 15 min. Después de transcurrido el tiempo la fibra se retiró del vial y se desorbió en el inyector del GC (equipado con un liner de 92 mm de altura y 0,75 mm de diámetro interno) durante 5 minutos. La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C y se operó en modo splitless.

El mismo instrumento y columna descritos para el análisis de AGL se utilizaron para obtener información del área de los picos de los compuestos volátiles (expresados en unidades arbitrarias). El programa de temperatura del horno inició a 45°C durante 4 min, se incrementó hasta 150°C a 8 °C/min y se mantuvo 3 min, y finalmente se llegó a la temperatura final de 250°C a razón de 10°C/min que se mantuvo durante 5 min. Se utilizó N₂ como gas carrier fijándose un caudal de 3 mL/min, y la temperatura del detector fue de 300°C.

Paralelamente al análisis cromatográfico por GC-FID de los compuestos aislados en las muestras, se realizó la identificación de los mismos empleando un GC acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS Shimadzu QP-5000), el cual cuenta con una trampa iónica (equipo perteneciente al CCT CONICET Santa Fe). El espectro de masas se obtuvo con un impacto de ionización de 70 eV. El rango de masas escaneado fue de 42 300 m/z (velocidad de escaneado 250 amu/seg). La identificación de los compuestos volátiles fue llevada a cabo mediante una búsqueda bibliográfica en librería de espectros (NIST-62) y el uso de estándares de referencia (Sigma Aldrich, Italia). Los resultados se expresaron como las áreas de los picos en unidades arbitrarias. Los análisis se realizaron por duplicado al final de la maduración.

Análisis microbiológico

El recuento total de flora láctica termofílica en los quesos a los 3 y 90 días se realizó en placas de agar leche descremada (APC-leche) luego de 48 h de incubación a 37°C (Candioti et al., 2002).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se utilizó el software SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Los datos de composición, AGL y compuestos volátiles se analizaron por ANOVA de dos vías, utilizando el modelo lineal general y comparando las medias con el método de la mínima diferencia significativa (LSD) con un 95% de confianza.

4.2 Resultados

Eficiencia del tratamiento mecánico

El tratamiento de agitación produjo daño a la membrana de los glóbulos grasos y la liberación de la grasa compartimentalizada en los glóbulos, lo que fue confirmado por el análisis de grasa libre. En efecto, la grasa libre sólo se encontró en las mezclas tratadas con agitación mecánica (mezclas A). La capa liberada tuvo una altura de entre 7,8 – 8,9 mm. Los resultados fueron similares a los obtenidos en las experiencias preliminares, descritas en la Sección 2.2 del presente Capítulo.

Con respecto a la retención de grasa en la matriz de la cuajada, no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) en el contenido de grasa total del suero de las muestras de los quesos N y A; siendo los valores $0,45 \pm 0,03$ y $0,50 \pm 0,02\%$, respectivamente. Esta observación implica que el tratamiento mecánico no incrementó las pérdidas de grasa en el suero. Sin embargo, el análisis de grasa libre en las muestras de suero mostró algunas diferencias no cuantificables: algunas gotas de grasa libre aparecieron en la superficie del suero de los quesos A luego de la centrifugación, las cuales no fueron observadas en la superficie del suero de los quesos N.

Composición global, recuentos microbianos y proteólisis

Los tratamientos influyeron sobre la composición global a los 3 y a los 90 días de maduración de manera similar; en la Tabla 2.5 se muestran los resultados encontrados.

Tabla 2.5. Composición de los quesos y proteólisis a los 3 y a los 90 días de maduración. Interacción y significancia de los efectos principales.

Tratamiento Térmico (F1)	Leche Pasteurizada (P)		Leche Aflorada (Af)		Significancia de los efectos		
	No- Agitado (N)	Agitado (A)	No- Agitado (N)	Agitado (A)	F1	F2	F1xF2
Agitación Mecánica (F2)							
Humedad (%) (3 días)	44,85 ± 1 ^a	45,32 ± 1 ^a	39,95 ± 1,6 ^b	40,50 ± 0,3 ^b	*	NS	NS
Humedad (%) (90 días)	34,5 ± 1,4 ^a	34,7 ± 0,8 ^a	31,2 ± 1,5 ^b	31,6 ± 0,5 ^b	*	NS	NS
MG (BS) %	47,27 ± 1,28 ^b	47,58 ± 2,14 ^b	50,40 ± 1,87 ^a	45,98 ± 1,19 ^b	NS	*	*
P(BS) %	44,09 ± 1,80 ^c	44,19 ± 1,16 ^c	44,48 ± 1,48 ^b	47,93 ± 0,68 ^a	*	*	*
pH (3 días)	5,30 ± 0,05 ^a	5,35 ± 0,08 ^a	5,40 ± 0,03 ^a	5,36 ± 0,07 ^a	NS	NS	NS
pH (90 días)	5,35 ± 0,07 ^a	5,36 ± 0,11 ^a	5,41 ± 0,05 ^a	5,46 ± 0,12 ^a	NS	NS	NS
NS/NT (%) (90 días)	12,08 ± 0,83 ^b	12,13 ± 0,49 ^b	14,44 ± 1,05 ^a	14,02 ± 1,38 ^a	*	NS	NS

Los valores son promedios ± desviación estándar. MG (BS): materia grasa en base seca. P (BS): proteína en base seca. F1: Factor 1. F2: Factor 2.

^{a,b,c} Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

* indica efecto significativo ($p < 0.05$), NS indica diferencia no significativa.

El contenido de humedad de todos los quesos decreció durante la maduración, lo que se esperaba debido al proceso de evaporación anterior al envasado al vacío. No hubo diferencias significativas en el contenido de humedad ($p > 0,05$) entre los quesos AfN y AfA y entre los quesos PN y PA, lo cual sugiere que el tratamiento mecánico aplicado no causó diferencias en la retención de agua en la cuajada. Una tendencia contraria se verificó cuando se estudió el tratamiento térmico: quesos elaborados con leche pasteurizada (PN y PA) presentaron un contenido de humedad significativamente superior ($p < 0,05$) a los quesos elaborados con leche aflorada (AfN y AfA).

Los quesos AfN mostraron los % de MG más altos ($p < 0,05$). Los otros tipos de quesos (PA, PN y AfA) presentaron valores menores y similares ($p > 0,05$), evidenciándose una interacción entre los factores probablemente debido a una combinación de tratamiento térmico y agitación mecánica.

Con respecto al contenido de proteínas, los resultados son consistentes con los valores de humedad y de grasa: los quesos P presentaron un porcentaje menor de proteínas que los quesos A, y se detectó una interacción significativa entre los factores.

En cuanto al pH, los valores de los quesos fueron similares ($p > 0,05$) y no hubo diferencias con el tiempo de maduración.

El % NS/NT alcanzado a los 90 días en los quesos elaborados con leche aflorada fue significativamente superior ($p < 0,05$) a los quesos elaborados con leche pasteurizada. No se observó influencia del factor agitación mecánica.

En relación a los recuentos de flora láctica, se alcanzó un máximo de 10^8 UFC /g a los 3 días para todos los quesos, valor que decreció en un orden logarítmico durante la maduración. Estos resultados sugieren que el descremado natural resultó aceptable para reducir la carga inicial de las bacterias lácticas presentes. Los recuentos pueden ser atribuidos mayoritariamente al starter, ya que alcanzaron valores similares en todos los quesos.

Lipólisis en quesos

El nivel de lipólisis expresado como los Ácidos Grasos Libres Totales ($\mu\text{mol AGLT} / 100$ g de grasa) se incrementó durante la maduración, como consecuencia del aumento en la concentración de los AGL individuales.

Por otro lado, no hubo diferencias ($p > 0,05$) entre los valores medios de los AGLT de los quesos en los 4 tratamientos ensayados (PN, PA, AfN y AfA), para los 2 tiempos de maduración estudiados. En la Tabla 2.6 se muestran los valores individuales y los AGLT de los quesos a los 3 y a los 90 días de maduración. Para visualizar la tendencia encontrada en los perfiles, en la Figura 2.3 se muestran los gráficos de dispersión de los valores medios obtenidos para cada AGL.

Tabla 2.6. Perfil de ácidos grasos libres ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$ grasa) de quesos de 3 y 90 días de maduración. Interacción y significancia de los efectos principales.

Tratamiento Térmico (F1)	Leche Pasteurizada (P)		Leche Aflorada (Af)		Significancia de los efectos		
	No- Agitado (N)	Agitado (A)	No- Agitado (N)	Agitado (A)	F1	F2	F1xF2
3 días							
AGL							
C _{4:0}	85 ± 8	71 ± 8	69 ± 11	94 ± 13	NS	NS	NS
C _{6:0}	39 ± 8	31 ± 1	33 ± 4	44 ± 15	NS	NS	NS
C _{8:0}	40 ± 10	35 ± 5	37 ± 11	45 ± 14	NS	NS	NS
C _{10:0}	81 ± 21	71 ± 12	79 ± 36	94 ± 38	NS	NS	NS
C _{12:0}	84 ± 20	78 ± 13	77 ± 41	92 ± 38	NS	NS	NS
C _{14:0}	293 ± 54	283 ± 9	256 ± 73	318 ± 135	NS	NS	NS
C _{16:0}	745 ± 127	723 ± 65	682 ± 124	815 ± 200	NS	NS	NS
C _{18:0}	246 ± 20	244 ± 24	266 ± 29	309 ± 41	NS	NS	NS
C _{18:1}	616 ± 133	624 ± 9	617 ± 83	744 ± 214	NS	NS	NS
C _{18:2}	125 ± 52	123 ± 30	123 ± 5	144 ± 24	NS	NS	NS
Total	2576 ± 454	2283 ± 141	2240 ± 417	2700 ± 731	NS	NS	NS
90 días							
C _{4:0}	180±25 ^b	207±14 ^b	353±87 ^a	301±24 ^a	*	NS	NS
C _{6:0}	155±25 ^c	162±5 ^c	278±1 ^a	199±31 ^b	*	NS	*
C _{8:0}	83±11	93±22	117±6	89±1	NS	NS	NS
C _{10:0}	124±22	138±47	164±12	139±10	NS	NS	NS
C _{12:0}	136±20	152±53	144±7	128±7	NS	NS	NS
C _{14:0}	519±15	476±49	504±9	472±6	NS	NS	NS
C _{16:0}	1142±15 ^a	1132±72 ^a	1069±25 ^b	1012±39 ^b	*	NS	NS
C _{18:0}	324±28	357±30	328±67	333±41	NS	NS	NS
C _{18:1}	1068±28	1070±87	925±128	941±32	NS	NS	NS
C _{18:2}	230±6 ^a	238±20 ^a	165±45 ^b	178±9 ^b	*	NS	NS
Total	3960±196	4024±398	4048±387	3794±201	NS	NS	NS

Los valores son promedios ± desviación estándar.

^{a,b,c} Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

* indica efecto significativo ($p < 0.05$), NS indica diferencia no significativa.

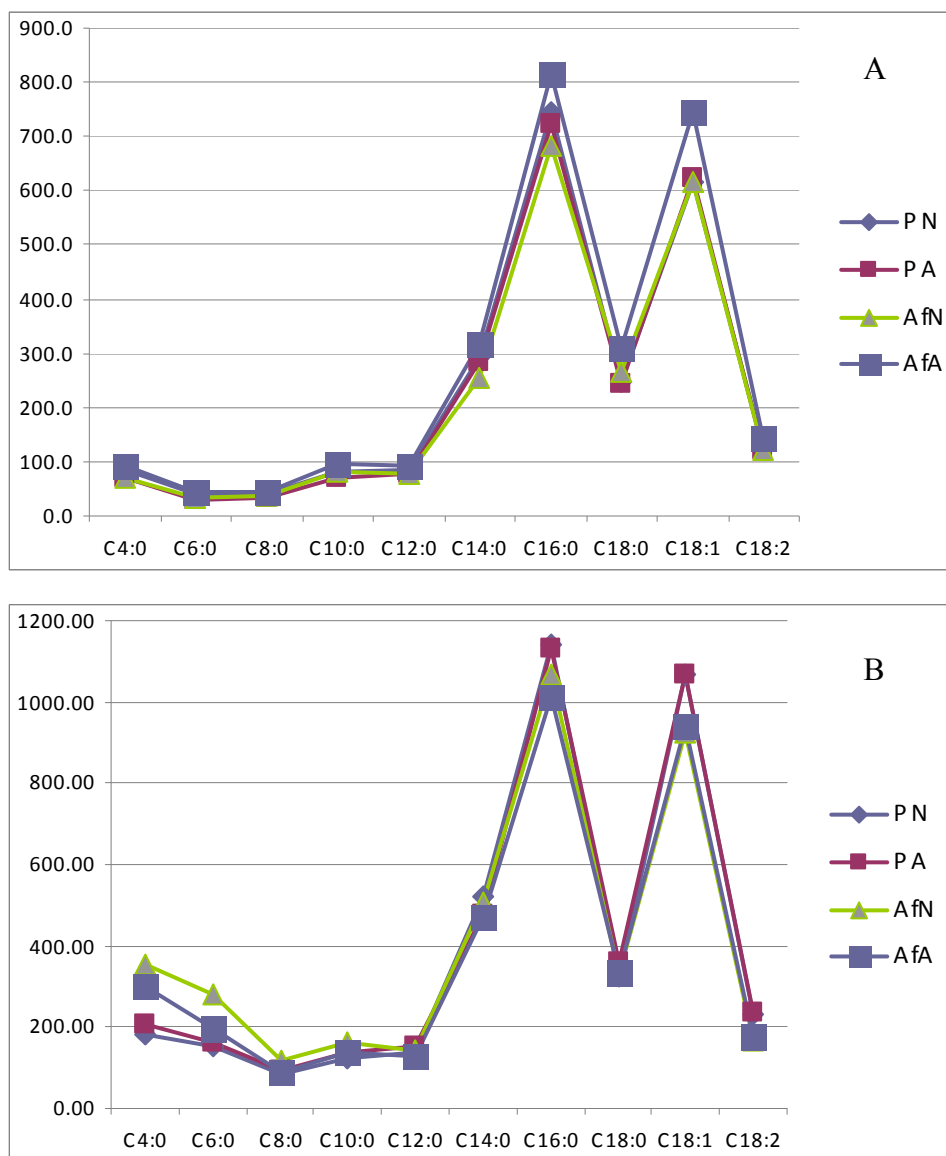


Figura 2.3. (A) y (B). Perfil de ácidos grasos libres a los 3 y 90 días de maduración.

A los 3 días de maduración, no se detectó una influencia de los factores estudiados sobre la concentración de los distintos AGL.

A los 90 días de maduración, la temperatura afectó significativamente las concentraciones de los AGL C_{4:0} y C_{6:0}, encontrando valores más altos en los quesos Af que en los quesos P. Para C_{6:0}, la interacción entre la agitación mecánica y el tratamiento térmico fue significativa: los quesos AfN tuvieron la mayor concentración de este ácido, seguidos por los quesos AfA; y los menores valores se encontraron en los quesos PN y PA ($p < 0,05$).

En cuanto a la agitación mecánica de la leche, la misma no influyó significativamente sobre las concentraciones de la mayoría de los ácidos grasos libres, para los dos niveles pertenecientes al factor tratamiento térmico (Af y P).

Para evaluar si los grupos de AGL (de cadena corta, media y larga) fueron preferentemente afectados por los factores estudiados, se calcularon sus proporciones. Estas proporciones darían una buena indicación de la especificidad de las enzimas hacia un sustrato en particular.

Los porcentajes de AG de cadena corta ($C_{4:0} - C_{8:0}$) en quesos Af fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores que en los quesos P, pero no se encontraron diferencias relacionadas a la agitación mecánica (Figura 2.4). Los porcentajes de los ácidos grasos de cadena media ($C_{10:0} - C_{12:0}$) fueron similares entre todos los quesos (Figura 2.5). Para los ácidos grasos de cadena larga ($C_{14:0} - C_{18:2}$), los valores se incrementaron cuando se aplicó el tratamiento térmico ($p < 0,05$) y la agitación mecánica no tuvo influencia en este grupo (Figura 2.6).

Por otro lado, se calculó el incremento de los grupos de ácidos grasos (Tabla 2.7) con el tiempo de maduración, encontrando que el incremento de los ácidos grasos de cadena corta fue afectado significativamente por la temperatura y por la agitación.

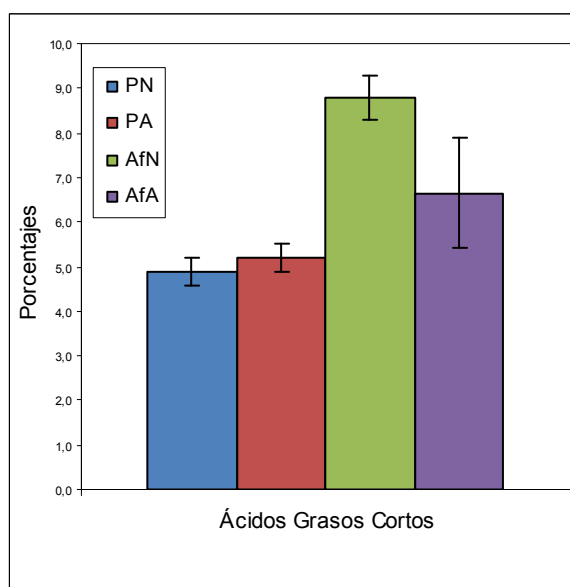


Figura 2.4. Proporción de ácidos grasos de cadena corta (%) en quesos de 90 días de maduración.

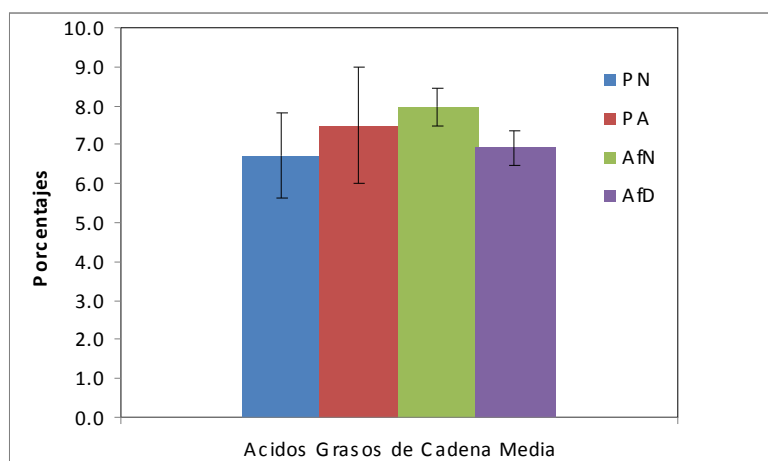


Figura 2.5. Proporción de ácidos grasos de cadena media (%) en quesos de 90 días de maduración.

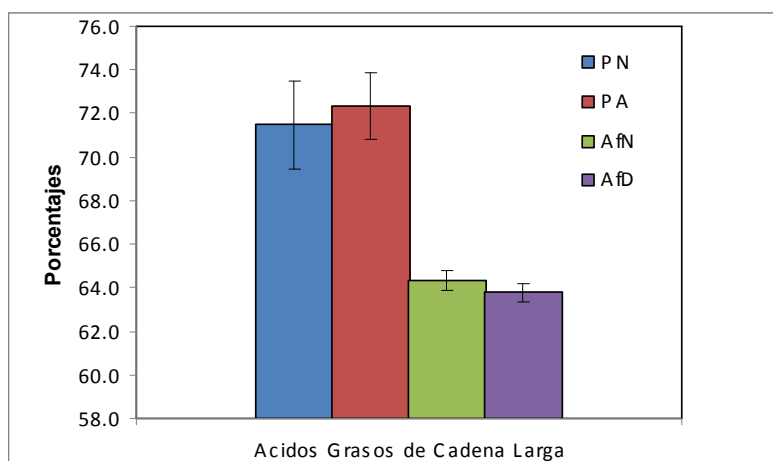


Figura 2.6. Proporción de ácidos grasos de cadena larga (%) en quesos de 90 días de maduración.

Tabla 2.7. Incremento de los ácidos grasos de cadena corta, media, larga y los AGLT en el tiempo de maduración.

Tratamiento Térmico (F1)	Leche Pasteurizada (P)		Leche Aflorada (Af)		Significancia de los efectos		
	No- Agitado (N)	Agitado (A)	No- Agitado (N)	Agitado (A)	F1	F2	F1xF2
Agitación Mecánica (F2)							
C _{4:0} – C _{8:0}	252±15	314± 7	609± 54	407± 97	*	*	*
C _{10:0} – C _{12:0}	94± 0.1	99±16	97± 18	118± 5	NS	NS	NS
C _{14:0} – C _{18:2}	1257±308	1277± 138	1036± 103	1021± 6	NS	NS	NS
AGLT	1602±323	1742± 220	1808± 91	1557± 80	NS	NS	NS

Los valores son promedios ± desviación estándar.

^{a,b,c} Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente (p<0,05).

* indica efecto significativo (p<0,05), NS indica diferencia no significativa.

Compuestos Volátiles

Un total de 26 compuestos volátiles fueron identificados por SPME/FID/MS: 7 cetonas, 12 alcoholes, 4 ésteres, 3 aldehídos, 7 ácidos, 1 terpeno y 2 hidrocarburos aromáticos (Tabla 2.8). La mayoría de los compuestos identificados se encontraron en todos los quesos.

El análisis ANOVA de dos vías arrojó que el tratamiento térmico fue prácticamente el único factor que afectó la producción de los compuestos. En este sentido, la ausencia de tratamiento térmico tuvo un efecto positivo basado en el área de los picos de algunos compuestos volátiles derivados de los ácidos grasos (2-heptanona, 2-heptanol, 2-pentanol, hexanoato de etilo, butanoato de etilo, ácidos butanoico y hexanoico), del citrato (3-hidroxi 2-butanona, 2,3-butanediol, 2-butanona y 2-butanol) y de los aminoácidos (2-metil 1-propanol y 3-metilo 1-butanol).

Tabla 2.8. Compuestos volátiles en quesos a los 90 días de maduración expresados (Áreas en Unidades Arbitrarias). Significancia de los efectos principales y su interacción.

Tratamiento Termico (F1)	Leche Pasteurizada (P)		Leche Aflorada (Af)		Significancia de los efectos		
Agitación Mecánica (F2)	No- Agitado (N)	Agitado (A)	No- Agitado (N)	Agitado (A)	F1	F2	F1xF2
<i>Cetonas</i>							
2-propanona	178±4 ^a	171±1 ^a	71±42 ^b	76±35 ^b	*	NS	NS
2-butanona	50±3 ^c	42±0.2 ^c	96±15 ^b	139±9 ^a	*	*	*
2,3-butanodiona	268±39	397±79	288±93	324±67	NS	NS	NS
2-hexanona	30±3 ^a	31±1 ^a	14±2 ^b	11±1 ^b	*	NS	NS
2-heptanona	213±19 ^b	309±31 ^a	380±31 ^a	365±21 ^a	*	NS	*
3-hidroxi 2-butanona	170±25 ^c	139±25 ^c	242±22 ^b	310±8 ^a	*	NS	*
2-nonanona	36±3 ^c	73±9 ^b	127±12 ^a	71±9 ^b	*	NS	*
<i>Alcoholes</i>							
2-propanol	35±1 ^{bc}	26±4 ^c	40±8 ^{ab}	50±3 ^a	*	NS	*
Etanol	2209±29 ^{db}	1640±213 ^{dc}	4093±393 ^{ab}	3295±117 ^{ac}	*	*	NS
2-butanol	n.d	n.d	17±1 ^a	29±14 ^a	*	NS	NS
2-metil 1-propanol	18±1 ^a	11±2 ^a	43±3 ^b	43±22 ^b	*	NS	NS
2-pentanol	116±11 ^b	122±2 ^b	214±78 ^a	290±29 ^a	*	NS	NS
1-butanol	nd	n.d	23±4 ^a	31±3 ^a	*	NS	NS
3-metil 1-butanol	203±26 ^b	109±18 ^b	340±57 ^a	343±32 ^a	*	NS	NS
1-pentanol	20±2 ^a	16±0.8 ^b	14±0.6 ^b	15±1 ^b	*	NS	*
2-heptanol	60±8 ^b	57±3 ^b	103±6 ^a	123±9 ^a	*	NS	NS
1-hexanol	29±8 ^a	30±4 ^a	12±2 ^b	14±1 ^b	*	NS	NS
2-nonanol	nd	n.d	20±1 ^a	18±5 ^a	*	NS	NS
2,3-butanediol	11±1 ^c	7±0.2 ^c	153±10 ^b	189±14 ^a	*	NS	*

Ésteres

Etil acetato	18±3	24±12	27±3	16±0.6	NS	NS	NS
Etil butanoato	158±8 ^b	193±11 ^b	339±56 ^a	282±15 ^a	*	NS	NS
Etil hexanoato	14±0.2 ^b	28±4 ^b	396±186 ^a	141±11 ^a	*	NS	NS
Isoamil butanoato	nd	n.d	38±6 ^a	42±1 ^a	*	NS	NS

Aldehídos

Acetaldehído	51±6 ^a	48±4 ^a	15±9 ^b	27±15 ^b	*	NS	NS
2-metil butanal	17±2 ^a	13±3 ^a	26±5 ^b	27±6 ^b	*	NS	NS
3-metil butanal	104±15	79±16	124±24	125±29	NS	NS	NS

Ácidos

Etanoico	699±31 ^b	762±21 ^b	1207±41 ^a	1189±11 ^a	*	NS	NS
2-metil propanoico	nd	n.d	221±6 ^a	201±12 ^a	*	NS	NS
Butanoico	1411±19 ^c	2190±8 ^b	4265±318 ^a	2713±288 ^b	*	NS	*
3-metil butanoico	59±10 ^a	50±6 ^a	24±7 ^b	23±0.4 ^b	*	NS	NS
Hexanoico	751±79 ^b	1125±23 ^b	1955±136 ^a	1132±245 ^b	*	NS	*
Octanoico	87±9 ^{cb}	118±5 ^c	211±4 ^a	126±24 ^b	*	*	*
Decanoico	nd	nd	42±6 ^a	28±5 ^a	*	NS	NS

Otros compuestos

p-xileno	nd	n.d	40±4 ^a	37±9 ^a	*	NS	NS
m-xileno	15±0.3 ^b	17±0.4 ^b	171±19 ^a	177±1 ^a	*	NS	NS
D-limoneno	nd	n.d	17±3 ^a	20±0.4 ^a	*	NS	NS

Áreas de los picos en unidades arbitrarias (valores medios ± desviación estándar).

F1: Tratamiento térmico aplicado a la leche.

F2: Agitación Mecánica de la leche.

Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

* indica efecto significativo ($p < 0,05$), NS indica diferencia no significativa.

Con respecto a las cetonas, la 2-heptanona y la 2-nonanona fueron encontradas en todos los quesos, pero fueron significativamente mayores en los quesos Af. Los niveles de 2,3-butanodiona (diacetilo) fueron similares en todos los quesos ($p > 0,05$), pero el producto de su reducción, la 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) fue mayor en los quesos Af que en los quesos P. Además, los valores más altos de 2,3-butanediol, 2-butanona y 2-butanol se encontraron en los quesos Af.

En el grupo de los alcoholes, el etanol fue el compuesto más abundante, y fue afectado significativamente por ambos factores ($p < 0,05$), encontrándose los valores más altos en quesos Af. De manera similar, los quesos Af tuvieron un mayor contenido de alcoholes secundarios (2-pentanol, 2-heptanol y 2-nonanol), ramificados (2-metil 1-propanol y 3-metil 1-butanol) y de los ésteres hexanoato de etilo, butanoato de etilo y butanoato de isoamilo.

Con respecto a los ácidos identificados, los ácidos saturados de cadena lineal y número par de átomos de carbono (desde C_2 a C_{10}) fueron más abundantes en los quesos Af. El ácido 2-metil propanoico fue mayor en quesos Af que en quesos P, pero lo contrario fue observado para el ácido 3-metil butanoico.

Sólo tres aldehídos fueron identificados, dos de los cuales fueron ramificados: 2-metil butanal y 3-metil butanal. Como fue observado para la mayor parte de los compuestos volátiles, los niveles de estos aldehídos fueron mayores en los quesos Af. Sin embargo, el contenido de acetaldehído fue mayor en quesos P que en quesos Af.

Por otro lado, el análisis estadístico indicó que hubo una interacción significativa entre los factores estudiados para algunos compuestos derivados de la grasa, como la 2-heptanona, 2-nonanona y los ácidos butanoico, hexanoico y octanoico. Las áreas de los picos fueron mayores en los quesos AfN que en los quesos AfA, pero en los quesos P el tratamiento de agitación tuvo un efecto positivo, obteniéndose valores más altos en los quesos PA que en los quesos PN. En este sentido, la disponibilidad de la grasa y los AGL liberados podrían haber afectado las reacciones bioquímicas en las cuales son sustratos preferenciales.

5. Influencia de la homogeneización en la lipólisis de quesos duros miniatura (5L)

De las experiencias anteriores, pudo apreciarse que el pre-tratamiento de la leche de elaboración por agitación tuvo un impacto muy bajo en la lipólisis, ya que sólo en algunos casos fue significativo y siempre interaccionando con el tratamiento térmico. Por ello, se decidió incluir una experiencia donde el tratamiento de desestabilización del glóbulo graso

fuera más energético. Se planteó la homogeneización parcial de la fracción grasa de la leche y se estudió su efecto en la composición, proteólisis y en el perfil de lipólisis de quesos duros.

5.1 Materiales y Métodos

5.1.1 Diseño experimental

Se utilizó el modelo de queso a pequeña escala utilizado en la experiencia anterior estudiando el factor homogeneización a dos niveles: mezcla de 20% MG sometida a homogeneización y sin homogeneizar, originando 2 tratamientos. Las mezclas se diluyeron con leche descremada para preparar leche de elaboración al 3% MG. Se elaboraron quesos controles (C) con mezcla no homogeneizada y quesos experimentales con mezcla homogeneizada (H). Se realizaron 2 elaboraciones por cada tratamiento en distintos días con distinta leche, obteniéndose 4 quesos controles (C) y 4 experimentales (H). Dado que en todas las experiencias anteriores se destacó la importancia del tratamiento térmico, en esta etapa sólo se utilizó leche cruda.

5.1.2 Preparación de la leche de elaboración

La Figura 2.7 muestra el esquema experimental. Un volumen de 40 L de leche cruda ($\text{pH } 6.7 \pm 0.05$) de gran mezcla se descremó por centrifugación siguiendo el procedimiento detallado anteriormente (Sección 2.1.2).

Las fracciones de crema y leche descremada se utilizaron para preparar una mezcla al 20% de materia grasa, que se homogeneizó a 9 MPa a 45°C (Homogeneizador 31M-3TA, Gauling Corporation, Estados Unidos). También se preparó una mezcla al 20% MG que no se homogeneizó y se utilizó como control. Para corroborar la eficiencia del tratamiento, se realizó el análisis de grasa libre y se observó la distribución de tamaño de los glóbulos grasos por microscopía de contraste de fases.

Con las mezclas homogeneizada y control y con leche descremada, se preparó leche de elaboración al 3% de MG que se reservó durante 12 horas a 12°C; la misma se utilizó en la elaboración de quesos controles y experimentales.

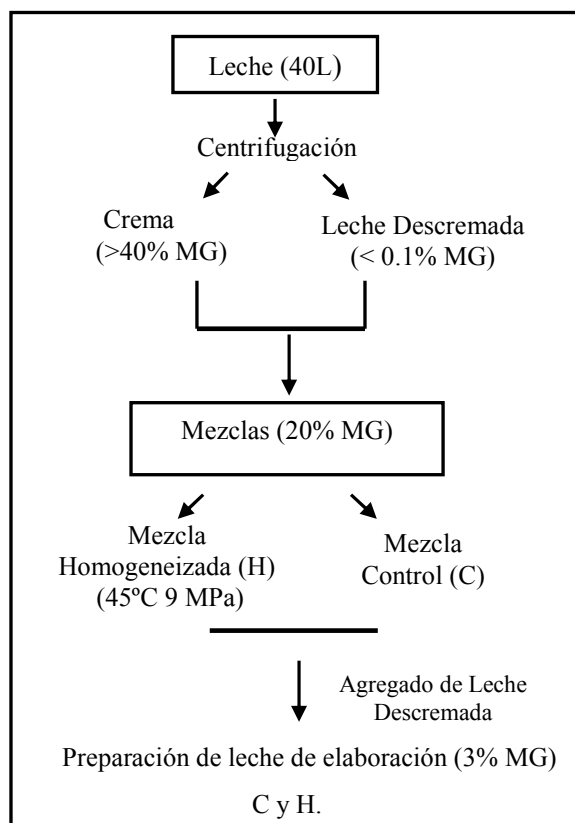


Figura 2.7. Esquema experimental.

5.1.3 Elaboración de quesos

Se utilizó la tecnología de elaboración para quesos Reggianito adaptada a escala de laboratorio descrita en la Sección 2.3 del Capítulo 1. Los quesos se maduraron durante 90 días a 12°C y 80 % de humedad, y a los 15 días se envasaron al vacío. Se tomaron muestras a los 3 y a los 90 días de maduración para su análisis.

5.1.4 Análisis

Microcopia de contraste de fases

Las mezclas controles y experimentales (20 % MG) se observaron microscópicamente de acuerdo a lo descrito en la Sección 2.1.3 del presente Capítulo. Para ello, se realizó una dilución 1:4 de las mismas con el fin de facilitar la visualización en el microscopio.

Determinación de grasa libre

Se evaluó la liberación de grasa libre en las mezclas tratadas y experimentales, según la técnica presentada en la Sección 2.1.3 del presente Capítulo.

Análisis de composición química global de los quesos

El pH, contenido de proteínas y materia grasa, se determinaron al principio (3 días) y al final de maduración (90 días) por técnicas normalizadas que se detallaron en la Sección 2.3 del Capítulo 1.

Contenido de Nitrógeno Soluble (NS-pH 4.6)

Se evaluó a los 90 días, según la técnica descrita en la Sección 4.1.4.

Análisis de Ácidos grasos libres

Los ácidos grasos libres (AGL) desde C_{4:0} hasta C_{18:2} presentes en las muestras de quesos controles y experimentales al inicio y al final de la maduración (3 y 90 días, respectivamente) fueron analizados según el procedimiento descrito en la Sección 4.1.4 del presente Capítulo. Las concentraciones se expresaron en $\mu\text{mol AGL}/100 \text{ g grasa}$.

Análisis microbiológico

El recuento total de flora láctica termofílica se realizó a los 3 y 90 días según lo descrito en la Sección 4.1.4.

Análisis estadístico

Se utilizó el software SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Para los parámetros estudiados, se calcularon el promedio y la desviación estándar y aplicó un análisis de variancia (ANOVA) de una vía para detectar diferencias significativas entre los tratamientos analizados, y el método de la mínima diferencia significativa (LSD) para comparar las medias con un 95% de confianza.

5.2 Resultados

Pre-tratamiento de la leche de elaboración

De acuerdo con el diseño experimental, se prepararon mezclas al 20% de MG (C y H), que se diluyeron con leche descremada para preparar la leche de elaboración (3% MG) y se reservaron durante 12 horas a 12°C con el propósito de facilitar el contacto entre las enzimas lipolíticas y su sustrato.

El tratamiento de homogeneización utilizado fue efectivo: se corroboró que no hubo pérdidas de grasa libre (Figura 2.8), y se observó una disminución del tamaño de los glóbulos (Figura 9).

Asimismo se observó visualmente una ligera diferencia de color entre las muestras experimental y control; las muestras experimentales resultaron más blancas ya que la presencia de una mayor cantidad de glóbulos pequeños provoca una mayor dispersión de la luz (Fig. 2.8 A). Se verificó además la ausencia de grasa libre en ambas muestras (Fig. 2.8 B).

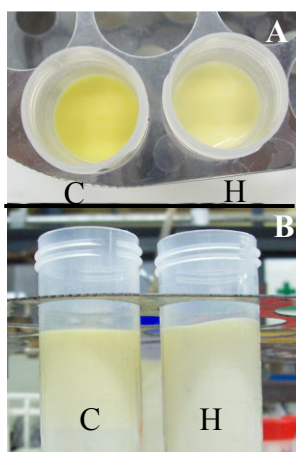


Figura 2.8. Grasa libre en mezclas homogeneizada (H) y control (C).

En la Figura 2.9 (A) y (B) se muestran las fotografías de las observaciones microscópicas de una muestra homogeneizada y control, respectivamente. En (A) se observa la presencia de glóbulos menores a $2\ \mu\text{m}$ y de glóbulos formando *clusters*, mientras que en (B) se observa un amplio rango de tamaño en la distribución de los glóbulos, lo cual es característico de la grasa de leche en su estado nativo (Kontkanen y col., 2011).

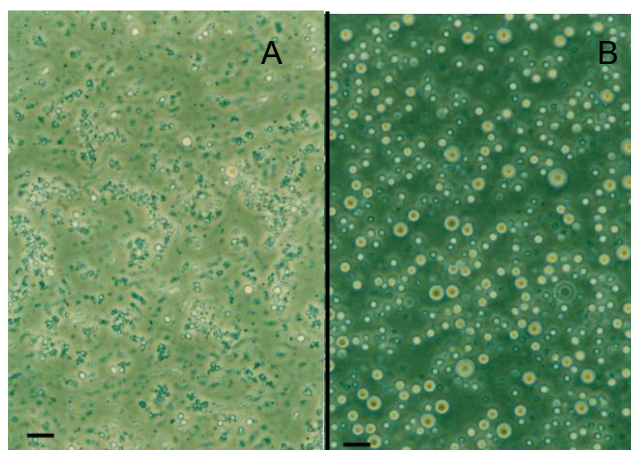


Figura 2.9. Microscopía óptica. (A) mezcla al 5% de MG homogeneizada, (B) mezcla al 5% de MG control. Las líneas representan 10 μm .

Composición global, recuento microbiano y proteólisis

En la Tabla 2.7 se muestran los valores de composición de los quesos controles y homogeneizados a los 3 y a los 90 días de maduración.

Con respecto al contenido de humedad, al igual que en la experiencia anterior, se observa una disminución del mismo con el tiempo de maduración, como consecuencia de la evaporación durante el almacenamiento en cámara de maduración, previa al envasado al vacío. No se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos para los quesos C y H.

En cuanto al contenido de proteínas y de grasa, no hubo diferencias entre los tratamientos. La homogeneización tampoco afectó el nivel de proteólisis a los 90 días ($p > 0,05$).

Tanto al inicio como al final de maduración los quesos H tuvieron menores valores de pH que los controles ($p < 0,05$).

Tabla 2.9. Efecto de la homogeneización de la leche en la composición de los quesos proteólisis a los 3 y a los 90 días de maduración.

Factor Homogeneización	Control (C)	Homogeneizado (H)	Significancia del Efecto
Humedad (%) (3 días)	42,40 ± 2,57	43,95 ± 0,62	NS
Humedad (%) (90 días)	31 ± 2,0	32 ± 1	NS
MG (BS) %	50,64± 1,85	49,35± 4,45	NS
P(BS) %	46,04 ±1,10	44,86 ±1,73	NS
pH (3 días)	5,42±0,03	5,3±0,04	*
pH (90 días)	5,4 3 ± 0,05 ^a	5,07 ± 0,06b	*
NS-4,6/NT (90 días)	15,82 ± 2,07	13,48±0,23	NS

Los valores son promedios ± desviación estándar.

^{a,b,c} Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

* indica efecto significativo ($p < 0,05$), NS indica diferencia no significativa.

En cuanto a los recuentos de flora láctica, y de manera similar a lo encontrado en la experiencia anterior (Sección 4.1.5), se alcanzó un máximo de 10^8 UFC /g a los 3 días para todos los quesos y decreció un orden logarítmico durante la maduración.

Lipólisis

En la Figura 2.10 (A) y (B) y en la Tabla 2.8 se muestran los perfiles de ácidos grasos libres de quesos C y H a los 3 y a los 90 días de maduración.

A los 3 días, los 10 ácidos grasos libres estudiados presentaron mayores concentraciones ($p < 0,05$) en los quesos H que en los quesos C (Fig. 2.10 A)

A los 90 días las concentraciones se igualaron para la mayoría de los ácidos grasos ($p > 0,05$), solamente se observa que la concentración de los ácidos grasos $C_{16:0}$ y $C_{18:0}$ fueron superiores ($p < 0,05$) en los quesos H (Fig. 2.10 B).

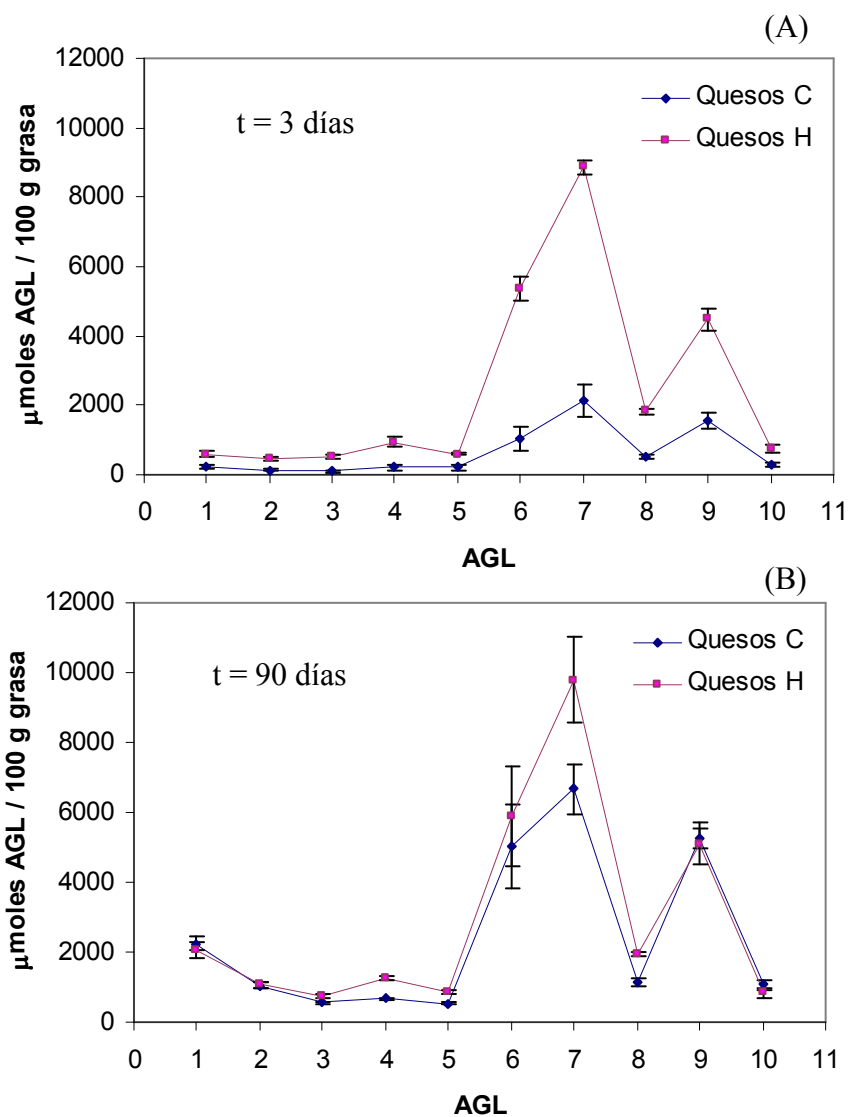


Figura 2.10 (A) y (B). Perfil de ácidos grasos libres en quesos experimentales a los 3 y 90 días de maduración respectivamente.

Tabla 2.8. Concentraciones ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$ grasa) de AGL en quesos a los 3 y 90 días de maduración.

	Control (C)	Homogeneizados (H)	Control (C)	Homogeneizado (H)
	3 días		90 días	
AGL				
C _{4:0}	244±52 ^a	604±113 ^b	2245±203 ^a	2033±226 ^a
C _{6:0}	136±33 ^a	453±56 ^b	1056±72 ^a	1057±69 ^a
C _{8:0}	105±26 ^a	510±75 ^b	561±19 ^a	731±45 ^b
C _{10:0}	202±74 ^a	933±135 ^b	682±26 ^a	1261±79 ^b
C _{12:0}	208±87 ^a	601±53 ^b	538±51 ^a	860±60 ^b
C _{14:0}	1029±168 ^a	5363±357 ^b	5036±1187 ^a	5898±1430 ^a
C _{16:0}	2123±315 ^a	8867±218 ^b	6678±720 ^a	9795±1241 ^b
C _{18:0}	513±21 ^a	1836±93 ^b	1129±111 ^a	1956±55 ^b
C _{18:1}	1574±225 ^a	4478±337 ^b	5256±305 ^a	5101±586 ^a
C _{18:2}	288±51 ^a	747±114 ^b	1058±155 ^a	837±125 ^a
Total	6428±882 ^a	24397±275 ^b	24244±2248 ^a	29535±3494 ^a

Los valores son promedios \pm desviación estándar.

^{a,b,c} Para cada tiempo de maduración, los valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

* indica efecto significativo ($p < 0.05$), NS indica diferencia no significativa.

En la Figura 2.11 se muestra la evolución de los niveles de lipólisis de los quesos controles y experimentales durante la maduración, observándose que el efecto del tiempo sólo fue significativo para los primeros.

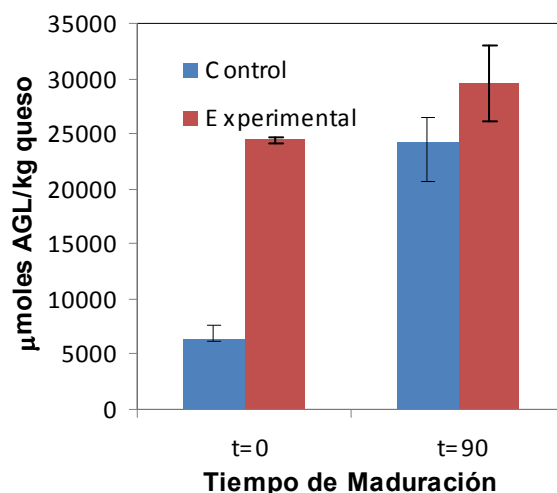


Figura 2.11. Niveles de lipólisis en quesos controles y experimentales en función del tiempo de maduración.

En la Figura 2.12 (A) y (B) se observa en detalle el perfil de los ácidos grasos cortos y medios a los 3 y 90 días de maduración respectivamente. A los 3 días, los quesos H presentaron mayores concentraciones ($p < 0,05$) para todos los ácidos, y en los mismos se observó que el ácido graso más abundante fue el $C_{10:0}$. En los quesos controles las concentraciones de los distintos ácidos fueron similares. A los 90 días, se observó una diferenciación en el perfil, ya que el ácido graso más abundante en quesos C y H fue el $C_{4:0}$. Los ácidos grasos $C_{4:0}$ y $C_{6:0}$ presentaron valores similares en quesos C y H, y los ácidos $C_{8:0}$, $C_{10:0}$ y $C_{12:0}$ mostraron concentraciones significativamente ($p < 0,05$) superiores en los quesos H.

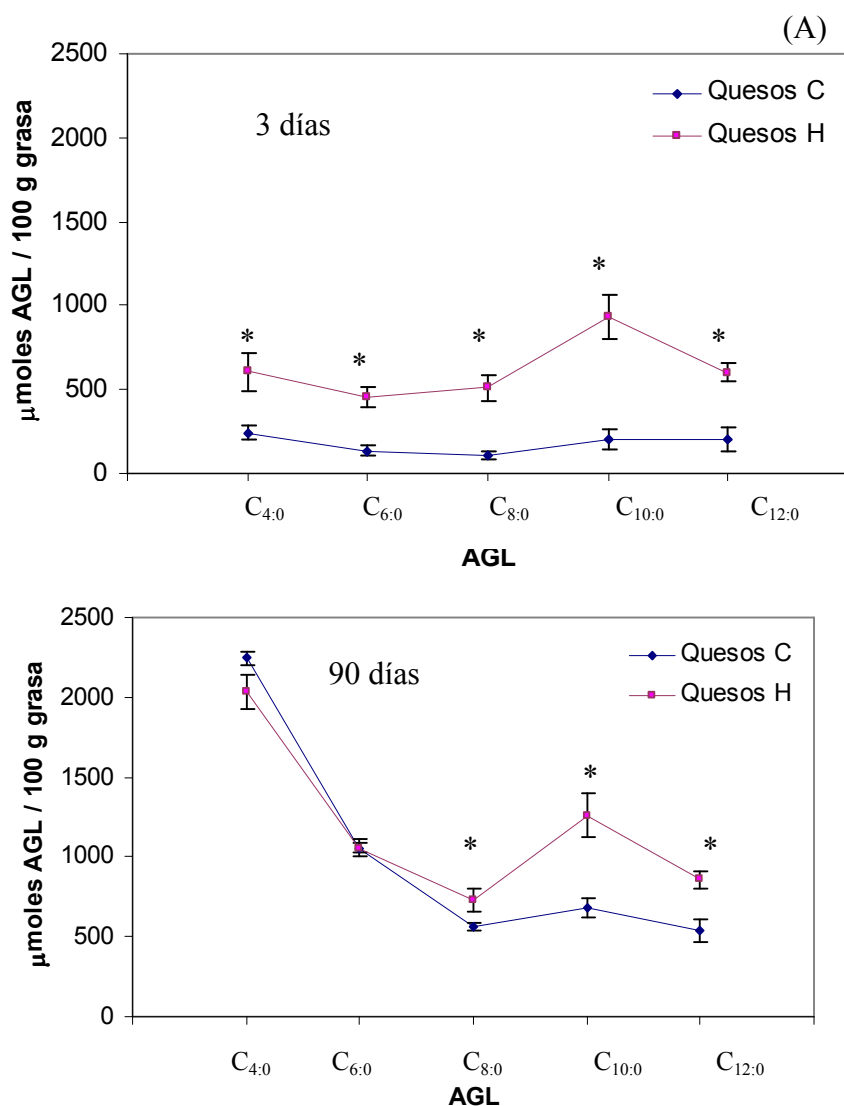


Figura 2.12 (A) y (B). Concentraciones de ácidos grasos cortos y medios en quesos controles y experimentales a los 3 y 90 días de maduración respectivamente. (*) Indica diferencia significativa $p < 0.05$).

6. Discusión

En este capítulo se ensayaron dos métodos de pre-tratamiento de la leche de quesería para disminuir la compartimentalización de los TG y las enzimas lipolíticas y lograr la aceleración de la lipólisis: la agitación mecánica y la homogeneización. Además, se evaluó la influencia del tratamiento térmico.

En el primer caso, se demostró que las mezclas con mayor contenido de grasa presentaban un mayor daño a la membrana de glóbulo graso, ya que se detectaron mayores

cantidades de grasa libre en comparación con los controles. Estas observaciones van en el mismo sentido que las informadas por otros autores, que indican que al aumentar el contenido de grasa, la leche y la crema son más susceptibles al daño mecánico (Hinrichs y Kessler 1997; Wiking y col., 2003).

Con respecto a la temperatura, el mayor deterioro de la membrana del glóbulo graso se evidenció entre 5 y 15 °C. Se conoce que a bajas temperaturas la grasa comienza a cristalizar, lo cual conduce a una deformación del glóbulo que puede provocar cambios estructurales en la membrana, incluso perforarla (Evers 2004b). Este efecto sería potenciado cuando la grasa se somete a un esfuerzo físico (bombeo o agitación), lo cual produciría la liberación de grasa libre, la agregación de los glóbulos o la coalescencia parcial de los mismos (Walstra y col., 1999d). Estos antecedentes se tuvieron en cuenta para diseñar el experimento precisamente con vistas al deterioro controlado de la membrana, y los resultados demostraron que se logró el objetivo perseguido.

El segundo método ensayado para favorecer el contacto TG/LPL fue la homogeneización. Este tratamiento se incluyó para intensificar el efecto de la desestabilización de la membrana del glóbulo graso. A diferencia del tratamiento mecánico, existen antecedentes de la aplicación de homogeneización a leche para quesería con el propósito de acelerar la lipólisis (Johnson, 2011), aunque este no es el propósito principal d

e la tecnología de homogeneización en la industria láctea. Generalmente, no se emplea como un pre-tratamiento de la leche para elaboración de quesos, debido a que la alteración que se induce en la estructura física de la grasa en emulsión puede provocar cambios en las propiedades de coagulación y disminuir la sinéresis de la cuajada (Zamora y col. 2007; Kelly y col. 2008). Sin embargo, en ciertos tipos de quesos como por ejemplo los quesos azules, se puede aplicar una etapa de homogeneización para favorecer la lipólisis e incrementar la blancura de la pasta (Werner y col., 1993). En particular, los quesos Danablu son quesos azules elaborados con leche de vaca, que revisten gran importancia comercial. En la tecnología de elaboración de los mismos la crema se homogeneiza antes de la pasteurización, luego la leche se estandariza y se inoculan el fermento y los esporos de *Penicillium roqueforti* (Fox, 2000d).

En sus aplicaciones tradicionales, la homogeneización no debe llevarse a cabo sobre mezclas de más del 12% de MG para obtener productos fluidos de baja viscosidad (Huppertz y Kelly, 2006), ya que por encima de esa proporción es probable que se formen *clusters* (conglomerados de glóbulos que comparten material de membrana, en general micelas de caseína, debido a la escasez de material proteico para cubrir la nueva interfase formada). El

objetivo del tratamiento de homogeneización en esos casos es diferente al buscado en este trabajo. En efecto, normalmente se aplica homogeneización para favorecer la estabilidad de la emulsión grasa en un producto lácteo disminuyendo el tamaño de los glóbulos y unificando la distribución de tamaño característica de la grasa cuando se encuentra en su estado nativo (Kontkanen y col., 2011). Por el contrario, en la presente experiencia se buscó incrementar la lipólisis favoreciendo el contacto TG - enzimas lipolíticas, lo cual se corroboró con la observación microscópica, en la cual se constató una disminución del tamaño de los glóbulos y la formación de *clusters*. Éstos no serían perjudiciales, debido a que posibilitan el contacto de la grasa con componentes del sistema proteico donde se encuentra enlazada la LPL; por otro lado, la homogeneización podría incluso contribuir a la retención de la grasa en el gel proteico. En este sentido, cabe señalar que en el presente trabajo no se observaron mayores pérdidas de grasa en el suero de los quesos elaborados con leche homogeneizada, aunque la composición de los miniquesos indicó que hubo una retención ligeramente mayor de la grasa nativa en quesos elaborados con leche cruda.

La composición global de los quesos miniatura a los 3 días de iniciada la maduración fue similar a la reportada previamente para quesos Reggianito (Candioti y col., 2002). A los 90 días de maduración, los miniquesos elaborados en la presente tesis cumplían con los requerimientos de legislación argentina para quesos Reggianito (Código Alimentario Argentino, ANMAT, 2009): un valor máximo de humedad de 35,9% y un mínimo de materia grasa en base seca de 32% para queso maduro.

Con respecto al tratamiento térmico, los quesos elaborados con leche pasteurizada presentaron valores significativamente superiores de humedad ($p < 0,05$) que los quesos elaborados con leche sanitizada por afloramiento. En este sentido, se conoce que los tratamientos térmicos podrían afectar la habilidad de coagulación, la capacidad de retener agua de las proteínas y el equilibrio salino de la leche, dependiendo del perfil tiempo/temperatura aplicado (Fox y col., 1993). Sin embargo, la simple aplicación de una pasteurización de baja no parece ser causa suficiente para explicar esta divergencia, ya que es un tratamiento suave que no debería causar problemas de deshidratación del gel. Las discrepancias podrían deberse a mínimas diferencias de agitación/velocidad de cocción durante la elaboración en paralelo. A manera de ejemplo, entre quienes estudiaron este efecto puede citarse que Barron y col. (2007) no encontraron diferencias en quesos Idiazabal elaborados con leche de oveja cruda y pasteurizada (72°C 20 s). De igual manera, Atasoy y Turkoglu (2008) no detectaron diferencias en el porcentaje de humedad de quesos elaborados con leche cruda, leche calentada a 65°C por 20 min y a 72°C durante 5 min.

Los quesos de leche cruda y crema nativa fueron los que retuvieron mejor la materia grasa, de acuerdo al contenido de grasa en el extracto seco, demostrando que existió interacción entre los factores estudiados. Asimismo, los quesos elaborados con leche agitada cruda fueron los de mayor contenido en proteínas, lo que es consistente con los otros cambios detectados en grasa y humedad. Las diferencias en composición de los quesos sugieren que, si bien no se hallaron pérdidas significativamente mayores de grasa en el suero de los quesos obtenidos con leche tratada, hubo un efecto fisicoquímico sobre los geles, que se tradujo en una mejor retención de la grasa nativa.

Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre el contenido de humedad de los quesos elaborados con leche homogeneizada, con respecto a sus controles. De esta manera, también en este aspecto la homogeneización demostró ser un tratamiento de desestabilización más adecuado que la agitación mecánica, al permitir la obtención de productos similares a los controles, sin alteraciones en su composición. Estos resultados difieren de los alcanzados por Brito y col. (2003), quienes encontraron un aumento en el contenido de humedad al utilizar leche o crema homogeneizada, en comparación con quesos controles, y Michalski y col. (2003, 2004, 2007) que observaron que una disminución en el tamaño de los glóbulos (ya sea por selección mediante microfiltración o por la aplicación de un paso de homogeneización) incrementaba la humedad en quesos Camembert y Emmental. Estos autores han adjudicado las diferencias a una mayor dificultad para la sinéresis de los geles que contienen grasa homogeneizada (Kelly y col., 2008), a un incremento en la capacidad de retener agua debido al aumento de la superficie total expuesta por la disminución del tamaño de los glóbulos y a la formación de membranas artificiales proteicas (Michalsky y col., 2007; Johnson, 2011). En el caso del queso Danablu, que utiliza una etapa de homogeneización en su tecnología, no se han reportado dificultades con respecto al control de la cantidad de humedad en el producto (Ardo, 2011). Es necesario tener en cuenta que las variables tecnológicas (cinética de acidificación, temperatura de cocción, agitación y salado) que se aplican durante la elaboración de cada variedad de quesos influyen conjuntamente sobre la estructura del gel y la retención de grasa y agua. En el caso del queso Reggianito, se trata de una variedad de baja humedad y pasta cocida, donde la cuajada se somete a mayor temperatura y agitación que en el caso de quesos blandos. No existen trabajos previos de quesos duros de pasta cocida elaborados con leche homogeneizada.

En la presente tesis no se llevaron a cabo estudios pormenorizados de la microbiota de los quesos miniatura, limitándose a verificar que los recuentos de bacterias lácticas totales fueran similares en los momentos de muestreo. Los métodos de sanitización de la leche, aún en los

productos de leche cruda, fueron los que se proponen para quesos duros italianos y que se realizan habitualmente en ese país para obtener productos comerciales (Battistotti y Corradini, 1993). La validez de esta aproximación pudo comprobarse, ya que los recuentos fueron siempre comparables entre quesos de leche cruda y leche pasteurizada, y ninguno de los quesos mostró defectos como aberturas no deseadas o rajaduras, u off flavour a la hora de los muestreos.

El índice de maduración (NS 4,6/NT) fue otro indicador de que todas las muestras resultaron comparables, ya que se mantuvieron dentro de lo adecuado para quesos Reggiano (Candioti y col., 2002; Wolf y col., 2010). Se observó que este índice fue significativamente superior en quesos elaborados con leche cruda, respecto al obtenido para quesos elaborados con leche pasteurizada, lo que indicaría una mayor actividad proteolítica de la flora láctica nativa. Los valores encontrados en los quesos elaborados con leche cruda son inferiores a los reportados para quesos duros italianos tipo grana (Parmigiano Reggiano y Grana Padano) los cuales se elaboran con leche cruda y se maduran durante períodos más largos (18-24 meses). En estos quesos la proteólisis es más profunda y el índice de maduración llega a un 32-34 %; los agentes proteolíticos son las bacterias provenientes del fermento natural del suero y las proteinasas nativas de la leche (Battistotti y Corradini, 1993). Por su parte, Grappin y Beuvier (1997) hicieron una revisión de los efectos de la pasteurización en la proteólisis de quesos suizos, Cheddar, Manchego y St. Paulin, y reportaron que en la mayoría de los casos no se alcanzaron a detectar cambios en la fracción de NS a pH 4,6 pero el contenido de nitrógeno en la fracción soluble luego de la precipitación con ácido tricloroacético 12% (NS-TCA) y con ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-PTA) era mayor en quesos elaborados con leche cruda que en leche pasteurizada. Estos resultados demostraron una fuerte actividad aminopeptidasa de las bacterias lácticas presentes en los quesos elaborados con leche cruda. En efecto, la fracción NS-TCA indica la presencia de péptidos medianos y pequeños, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados más pequeños como aminas, úrea y amonio; mientras que la fracción NS-PTA sólo incluye péptidos muy pequeños, aminoácidos y compuestos nitrogenados de menor tamaño exceptuando aminoácidos dibásicos y amonio.

Los estudios del presente capítulo se centraron en el avance de la lipólisis en los quesos miniatura controles e intervenidos mediante alguna de las dos estrategias elegidas.

Al final de la maduración, los quesos miniatura de la primera experiencia alcanzaron niveles de AGLT comparables a los obtenidos por Perotti y col. (2005), Shiufe y col. (2007) y Wolf y col. (2010) para quesos Reggiano. Además, se llegó a un 0,9 % de hidrólisis de los triglicéridos totales, el cual se encontró dentro del rango reportado (0,7 – 0,8 %) por los

mencionados autores. Los niveles de lipólisis hallados fueron inferiores a los de otras variedades de queso de mayor tiempo de maduración, en los que intervienen también bacterias lácticas, como por ejemplo los quesos duros italianos. En este sentido, los niveles de lipólisis que se informaron para quesos Parmigiano Reggiano de 24 meses de maduración son de 7661 $\mu\text{moles}/100\text{ g}$ grasa (Caboni y col., 1988), aproximadamente el doble de los encontrados en este trabajo. No solamente el valor total es diferente, sino también el perfil, ya que si bien en el Parmigiano Reggiano la mayoría de los AGL estaba en mayor concentración que en los quesos miniatura de este estudio, los niveles de ácidos grasos de cadena corta fueron similares. Esta diferencia puede interpretarse como favorable a la aceleración de la maduración ya que son precisamente estos ácidos los que intervienen de manera directa en el flavour picante, y en los quesos miniatura estuvieron presentes en tan sólo 90 días, a valores comparables con los productos de 24 meses.

Se constató que la lipólisis de todos los quesos se incrementó durante la maduración: la concentración de todos los AGL estudiados aumentó de 3 a 90 días. La tendencia ha sido demostrada para la mayoría de las variedades de quesos, y da cuenta de que la grasa se encuentra accesible a la acción de las enzimas presentes en la matriz casearia a lo largo de la maduración (Atasoy y Türkoğlu, 2009; Hickey y col., 2007; Malacarne y col., 2009; O'Mahony y col., 2006; Werner y col., 1993; Voigt y col., 2012). Perotti y col (2008) caracterizaron perfiles de lipólisis de quesos Reggianito elaborados en planta piloto, que maduraron durante 180 días, en los cuales también se llevó a cabo una pasteurización baja. Los autores encontraron que la concentración de todos los AGL se incrementaron con el tiempo: los valores de AGLT aumentaron 800 mg/kg de queso. En el presente trabajo, se observó un incremento similar, de aproximadamente 900-1000 mg/kg. Por su parte, Sihufe y col. (2007) también informaron un aumento de los AGLT en quesos Reggianito comerciales durante un periodo de maduración de 180 días, con valores comparables a los informados en el presente trabajo; en efecto, se observó un incremento en AGLT de 600 mg/kg. Por otro lado, en algunos trabajos no se reportó un aumento de lipólisis durante la maduración de quesos. Türkoğlu (2011) estudió la lipólisis en quesos Orgü de 90 días de maduración elaborados con leche cruda y leche pasteurizada (72°C durante 15s) y halló que sólo los primeros experimentaron un incremento del nivel de lipólisis durante la maduración, al igual que Buffa y col (2001) para quesos de cabra elaborados con leche cruda y pasteurizada. En estos casos los autores atribuyeron las diferencias a la acción de la microbiota nativa y la LPL.

A diferencia de lo sucedido con el tiempo de maduración, los factores estudiados en la primera experiencia no influyeron sobre el incremento de los AGLT: el nivel de lipólisis promedio global se incrementó de manera similar durante la maduración de todos los quesos, hayan sido elaborados con leche cruda o pasteurizada, y con tratamiento mecánico de agitación o no.

En cuanto al perfil de los AGL, los ácidos grasos más abundantes en todos los quesos miniatura fueron palmítico, mirístico, esteárico y oleico; lo cual se corresponde con lo publicado previamente por otros autores para queso Reggianito (Perotti y col. 2005, Wolf y col., 2010). A los 90 días de maduración se observó un efecto significativo del tratamiento térmico en el perfil. Cuando se calcularon las proporciones de cada grupo de ácidos grasos, sólo los ácidos grasos cortos ($C_{4:0}$ – $C_{8:0}$) fueron significativamente afectados, siendo mayor la proporción en los quesos elaborados con leche sanitizada por afloramiento. Este incremento puede ser atribuído tanto a la acción de la LPL como a las enzimas lipolíticas microbianas. Se conoce que las enzimas lipolíticas (lipasas y esterases) son un grupo ubicuo de enzimas que catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles a diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos y glicerol. Las lipasas actúan en la interfase lípido-agua en emulsiones mostrando preferencia por sustratos insolubles en agua, como por ejemplo triglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena larga. Además, estas enzimas pueden tener una especificidad, tanto posicional como hacia el sustrato. En particular, la LPL no exhibe preferencia durante la hidrólisis de una mezcla de triglicéridos pero muestra una marcada especificidad sobre las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos; los ácidos grasos $C_{4:0}$ y $C_{6:0}$ se encuentran esterificados casi completamente en la posición sn-3 (Collins y col., 2003; MacGibbon y Taylor, 2006). Por su parte, las esterases se distinguen de las lipasas porque hidrolizan las uniones éster en triglicéridos únicamente en soluciones acuosas y muestran preferencia hacia sustratos solubles en agua. Es por ello que actuarían sobre triglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena corta (Hickey y col., 2007). La actividad esterasa en bacterias del ácido láctico está bien documentada y se conoce que actúan preferentemente sobre mono o diglicéridos (Holland, 2005).

El efecto negativo del tratamiento térmico sobre la producción ácidos grasos libres ha sido informado previamente por varios autores. Beuvier y col. (1997) estudiaron los ácidos grasos volátiles (C_4 y C_6) en quesos suizos elaborados con leche cruda, pasteurizada, microfiltrada, y leche pasteurizada mezclada con el retentado de la microfiltración; la concentración de los AGL fue superior en los quesos elaborados con leche cruda, lo cual fue atribuido a la actividad de la microbiota nativa. Pinna y col. (1999) evaluaron la extensión de

la lipólisis en quesos Fiore Sardo elaborados con leche cruda y termizada. Según sus resultados, el tratamiento térmico ocasionó una disminución de los ácidos grasos de cadena corta. Albenzio y col. (2001) estudiaron la lipólisis de quesos semiduros Canestrato Pugliese (65 días de maduración) elaborados con leche de oveja cruda y pasteurizada; encontraron que la concentración de AGLT fue mayor en los primeros. En particular, se observó un incremento en la concentración de $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{10:0}$ y $C_{18:2}$. Los autores establecieron que las diferencias podrían deberse a la actividad lipasa y esterasa de la microbiota, específicamente de las NSLAB. Similares resultados fueron encontrados por Shakeel-Ur-Rehman y col. (2000), quienes reportaron una lipólisis considerablemente mayor en quesos Cheddar elaborados con leche cruda y en quesos elaborados con mezclas de leche pasteurizada y leche cruda, que en quesos manufacturados con leche pasteurizada. Los autores también sugirieron que las NSLAB fueron responsables de las diferencias encontradas, habida cuenta de la actividad esterasa en NSLAB aisladas de quesos Cheddar.

El factor tratamiento físico (agitación mecánica) no influyó significativamente sobre las concentraciones de la mayoría de los ácidos grasos libres. Sin embargo, para $C_{6:0}$ se encontró una interacción entre el factor tratamiento mecánico y la temperatura a los 90 días de maduración. No existen trabajos publicados acerca del efecto de la agitación mecánica aplicada a la leche sobre la lipólisis en quesos, sin embargo se ha estudiado que la temperatura y la disrupción de la membrana del glóbulo graso modificarían la organización de la materia grasa en la matriz del queso, lo cual no sólo posibilitaría la accesibilidad de la LPL a su sustrato sino que, favorecería la localización de las bacterias en la interfase grasa / proteínas propiciando posiblemente la acción de las lipasas microbianas (Lopez y Briard-Bion 2007).

Una tendencia completamente diferente se encontró para los quesos elaborados con leche homogeneizada. Se observó un aumento inicial significativo de la concentración total promedio de los ácidos grasos libres con respecto a los quesos controles. En este sentido, a los 3 días en los quesos controles se había hidrolizado un 1.6 % del total de triglicéridos, y en los quesos elaborados con leche homogeneizada, un 6 %. Luego, a lo largo de la maduración todos los quesos llegaron a aproximadamente un 6% de hidrólisis. Estos valores son elevados y comparables con los observados en quesos madurados con hongos: en quesos Camembert se ha reportado un 5-10 % de hidrólisis, en quesos azules hasta un 20% habiéndose informado entre un 18-25% de hidrólisis en quesos daneses (Collins y col., 2003). El incremento de los AGLT con el tiempo de maduración sólo fue significativo para los quesos controles, ya que en los quesos elaborados con leche homogeneizada se llegó a los niveles máximos de

lipólisis en los primeros días y luego se estabilizaron; los valores totales promedio de AGL de quesos homogeneizados y controles se igualaron hacia el final de la maduración.

Estos resultados indican que la estrategia de aumento de contacto grasa – enzimas lipolíticas fue exitosa para acelerar la reacción enzimática de lipólisis, lo que se produjo al inicio de la maduración, pero este aumento de contacto después no se traduce en niveles incrementados de hidrólisis de los TG. El hecho de que en los quesos controles la lipólisis aumente con el tiempo da cuenta de que las enzimas estuvieron activas durante la maduración; y aunque no es posible saber si la formación de AGL fue continua en estos quesos, el comportamiento observado en los quesos experimentales muestra un límite en la reacción de lipólisis. Fue evidente que la accesibilidad a la grasa es un factor limitante para el progreso de la hidrólisis de los triglicéridos, pero la extensión de la misma también dependería de la preservación de la actividad de las enzimas durante la maduración. Varios autores han informado que la actividad lipolítica durante la maduración de quesos se mantiene constante. Alvenzio y col. (2001) estudiaron la actividad lipolítica en quesos Canestrato Pugliese elaborados con leche de oveja cruda y pasteurizada, y observaron que la misma se mantenía constante durante 63 días de maduración en ambos casos, siendo la actividad en quesos elaborados con leche cruda levemente superior a la obtenida para quesos elaborados con leche pasteurizada; los autores adjudicaron las diferencias a la actividad de las enzimas de las bacterias NSLAB. Svensson y col. (2006) también determinaron la actividad lipolítica en quesos Idiazabal comerciales y elaborados en planta, y observaron que la se mantenía constante hasta los 180 días de maduración en todos los casos. En cuanto a la LPL, no hay estudios de su actividad en quesos, pero se conoce que es susceptible a la inhibición por producto por lo que la acumulación de ácidos grasos libres no favorece su acción (Deeth y Fitz-Gerald, 2006). Además, la enzima se inactiva por calor, acidez, luz ultravioleta, agentes oxidantes y congelamiento prolongado. Aún en la glándula mamaria a 37°C la LPL se inactiva lentamente, por lo que la leche contiene una mezcla de enzima activa e inactiva.

Varios autores han reportado una lipólisis temprana en quesos elaborados con leche homogeneizada, ya sea utilizando una homogeneización convencional a 18-20 MPa o una homogeneización a alta presión alcanzando valores de hasta 350 MPa. Es necesario aclarar que la homogeneización a alta presión (HPH por sus siglas en inglés: high pressure homogenization) ocasiona modificaciones estructurales en las proteínas (micelas de caseína y proteínas del suero) y la reducción en el tamaño de los glóbulos de grasa a aproximadamente 200 nm obteniendo una distribución de tamaño más estrecha que cuando se emplea la homogeneización convencional, en la cual el tamaño medio se encuentra en 500 nm

(Michalski y col., 2003; Huppertz y Kelly, 2006). Asimismo, se ha comprobado que tanto la homogeneización convencional como la HPH favorecen la formación de complejos caseína-grasa (Mistry, 2001; Zamora y col., 2012), un efecto detectado en la presente tesis mediante la observación de clusters.

Brito y col. (2003) informaron un aumento en la lipólisis en quesos Chanco (queso semiblando de origen chileno que se madura durante 21 días) reducidos en grasa, preparados con distintos porcentajes de materia grasa homogeneizada (17,6 MPa) en comparación con quesos sin homogeneizar. Estos autores encontraron un aumento de lipólisis a medida que se incrementaba la fracción de glóbulos homogeneizados. Michalski y col. (2004) observaron un aumento en la lipólisis en quesos Emmental de 52 días de maduración elaborados con una proporción de leche cruda homogeneizada (3MPa) respecto a quesos controles. Estos autores hallaron que el incremento del nivel de lipólisis era exagerado, ya que los quesos homogeneizados presentaron defectos sensoriales, lo cual no se verificó en quesos elaborados con glóbulos nativos en el mismo rango de tamaño. Vannini y col. (2008) estudiaron los patrones de lipólisis de quesos Pecorino Romano madurados durante 21 días, que se elaboraron con leche de oveja cruda, termizada y tratada con homogeneización de alta presión (100 MPa). Los autores encontraron que el tratamiento de homogeneización indujo una lipólisis temprana, al igual que el tratamiento de termización, y que sólo en los quesos elaborados con leche cruda las concentraciones de los AGL se incrementaron durante la maduración. Otro aspecto a tener en cuenta es que la liberación acelerada de ácidos grasos libres en leche tratada con alta presión podría sugerir una activación de la LPL (Buffa y col., 2001).

En el perfil de ácidos grasos cortos y medios se observó una influencia significativa de la homogeneización aplicada a la leche de elaboración. A los 3 días, estos ácidos presentaron mayores concentraciones ($p < 0,05$) en los quesos elaborados con leche homogeneizada, siendo el $C_{10:0}$ el ácido graso más abundante. En los quesos controles las concentraciones de estos ácidos fueron similares entre sí. A los 90 días, se observó una diferenciación en el perfil con respecto al inicial, ya que el ácido graso más abundante en quesos controles y homogeneizados fue el $C_{4:0}$. Los ácidos grasos $C_{4:0}$, $C_{6:0}$ y $C_{8:0}$ presentaron valores similares en quesos controles y experimentales, y $C_{10:0}$ y $C_{12:0}$ mostraron concentraciones significativamente superiores en los quesos homogeneizados. Al igual que el aumento inicial de lipólisis encontrado en los quesos homogeneizados, estas diferencias en los ácidos grasos en particular se explican en la mayor accesibilidad lograda para las enzimas lipolíticas a su

sustrato, especialmente la LPL que se encuentra activa en quesos de leche cruda, y en la presente tesis, favorecida por la incubación de 12 horas antes del inicio de la caseificación.

Las concentraciones de ácidos grasos libres encontradas en los quesos controles de las dos experiencias realizadas durante esta tesis fueron significativamente diferentes. Los quesos de la segunda experiencia mostraron niveles promedio de AGLT superiores a las muestras de quesos elaborados con leche sanitizada por afloramiento y crema nativa. Esta diferencia no es sorprendente ya que en el segundo caso se incluyó una etapa de mantenimiento de la leche - tratada y control- por 12 horas a 12°C antes de elaborar el queso. Dicha etapa se implementó precisamente para facilitar el contacto entre las enzimas y su sustrato. Se conoce que el nivel inicial de lipólisis de la leche de quesería puede ser variable e influir en la lipólisis de los quesos elaborados. En efecto, la leche cruda tiene una alta actividad lipolítica debido a la presencia de la LPL y otras enzimas microbianas, pero la hidrólisis sólo ocurre bajo ciertas circunstancias. Por ejemplo, en condiciones de transporte y almacenamiento normales, sólo se evidencia un pequeño incremento en la cantidad de AGL; pero si la leche se agita por turbulencias como las ocasionadas por el transporte en cañerías y se produce espumado la lipólisis puede incrementarse (Deeth y Fitz-Gerald, 2006). Hickey y col. (2007) estudiaron la lipólisis en leche cruda, pasteurizada (72°C 15s) y termizada (65°C 15 s) y la compararon con la lipólisis de los respectivos quesos recién elaborados (tipo Cheddar). Hallaron que la leche cruda contenía mayores cantidades de AGL, al igual que los quesos elaborados con la misma; lo cual fue atribuido a la acción de la LPL debido al bajo recuento microbiano presente en la leche cruda. Varios autores han determinado la concentración de ácidos grasos libres en quesos elaborados con leche cruda, con resultados de gran variación. Voigt y col. (2012) estudiaron quesos Cheddar elaborados con leche cruda madurados durante 180 días, y encontraron un nivel de lipólisis de 2066 mg/kg de queso, mientras que Atasoy y Türkoglu (2008) analizaron quesos Urfa (90 días de maduración) y detectaron 915 mg AGLT /kg queso.

Finalmente, en el presente capítulo también pudo caracterizarse la formación de compuestos volátiles en las muestras de la primera experiencia. La mayor parte de los compuestos volátiles identificados puede provenir de más de una vía metabólica, y sus precursores pueden ser tanto ácidos grasos liberados en la lipólisis como aminoácidos derivados de la proteólisis o hidratos de carbono (lactosa, citrato y lactato) (McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2003; Le Quéré y Molimard, 2003; McSweeney, 2011). En particular, los ácidos grasos libres son precursores de reacciones catabólicas que conducen a la producción de metilcetonas, lactonas, ésteres, alcanos y alcoholes.

Muchos autores han estudiado el efecto de la pasteurización sobre el perfil de compuestos volátiles, junto con otros factores, como por ejemplo el tipo de fermento (Barron y col., 2007; Bouton y col., 2009; Buchin y col., 1998; Gómez-Ruiz y col., 2002; Hickey y col., 2007; Ortigosa y col., 2001). La influencia del tratamiento térmico sobre la producción de compuestos volátiles se relaciona probablemente con la reducción de los microorganismos presentes en la leche, y la consecuente disminución de las reacciones metabólicas en los quesos (Buchin y col., 1998; Ortigosa y col., 2001). Sin embargo, la actividad de la enzima nativa de la leche en los quesos elaborados con leche cruda y la mayor disponibilidad de precursores como los ácidos grasos de cadena corta encontrados en el presente estudio no pueden ser excluidos como una fuente incrementada de compuestos volátiles. Las cetonas con número impar de átomos de carbono son compuestos importantes en algunos tipos de quesos, especialmente en quesos madurados con hongos; pero también se encuentran en menores concentraciones en quesos duros (Le Quére y Molimard, 2003; Molimard y Spinnler, 1996; Qian y Reineccius, 2003). En particular, la 2-heptanona y la 2-nonanona, que se originan de la β -oxidación de los ácidos grasos libres (ácidos octanoicos y decanoicos, respectivamente) por el metabolismo microbiano (Collins y col., 2003), fueron significativamente mayores en los quesos de leche no pasteurizada, y los efectos del tratamiento de agitación mecánica y el tratamiento térmico combinados también mostraron una influencia significativa.

Los niveles de 2,3-butanodiona (diacetilo) fueron similares en todos los quesos ($p > 0,05$), pero el producto de su reducción, la 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) fue mayor en los quesos de leche cruda que en los quesos de leche pasteurizada. La acetoína puede reducirse a 2,3-butanediol, luego a 2-butanona y finalmente a 2-butanol. La producción de diacetilo y acetoína y su reducción a 2,3-butanediol es generalmente atribuida a la microflora láctica del fermento; sin embargo se cree que la reducción posterior a 2-butanona y a 2-butanol es el resultado de la actividad de bacterias NSLAB (Ortigosa y col. 2001). En el presente trabajo, los valores más altos de 2,3-butanediol, 2-butanona y 2-butanol fueron encontrados en los quesos de leche cruda tanto los que habían sufrido agitación mecánica como los que contenían crema nativa. Para estos compuestos, la agitación también jugó un rol significativo ya sea combinada con el tratamiento térmico o también en forma independiente. Estos resultados se encuentran en concordancia con trabajos previos de quesos de leche cruda (Buchin y col., 1998; Ortigosa y col., 2001), pero no existen antecedentes sobre la influencia del tratamiento mecánico en los compuestos volátiles.

En el grupo de los alcoholes, el etanol fue el compuesto más abundante, lo cual se esperaba, debido a que es un compuesto mayoritario habitual en la fracción volátil del queso,

que proviene de la fermentación de la lactosa (McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2003; Le Quéré y Molimard, 2003; Thierry y Hannon, 2011).

Los alcoholes de mayor longitud de cadena se forman por la reducción de los grupos carbonilos; los aldehídos son reducidos a alcoholes primarios y las cetonas a alcoholes secundarios, por dos mecanismos posibles: la reducción enzimática por microorganismos como hongos y la reducción química debido a la disminución del potencial redox del queso durante la maduración (McSweeney y Sousa, 2000; Collins y col., 2003; Le Quéré y Molimard, 2003; Le Quéré, 2011).

El contenido más alto de alcoholes secundarios (2-pentanol, 2-heptanol y 2-nonanol) fue encontrado en los quesos de leche sanitizada por cremado natural, lo cual estuvo en concordancia con los valores más altos de las metilcetonas encontrados en los mismos. Similar tendencia mostraron los alcoholes ramificados (2-metil 1-propanol y 3-metil 1-butanol) derivados del catabolismo de los aminoácidos. Estos resultados estuvieron de acuerdo con lo hallado por Barron y col. (2007). Para ambos grupos de alcoholes, el factor agitación mecánica no mostró influencia significativa.

Los ésteres contribuyen significativamente al flavour de los quesos, especialmente los ésteres etílicos, debido a su bajo límite de percepción y al aroma frutal. El hexanoato de etilo, butanoato de etilo y butanoato de isoamilo son los ésteres que se relacionan fundamentalmente al proceso de lipólisis; su síntesis depende de la biodisponibilidad de precursores, por ejemplo alcoholes y ácidos (Liu y col., 2004; Holland y col., 2005). En los quesos de leche cruda, donde los niveles de etanol, 3-metil-1-butanol, ácido butírico y hexanoico fueron los mayores, también presentaron los niveles más altos de sus correspondientes ésteres.

Con respecto a los ácidos identificados, los ácidos saturados de cadena lineal y número par de átomos de carbono (desde C₂ a C₁₀) fueron más abundantes en los quesos elaborados con leche sanitizada por afloramiento, en concordancia con los mayores niveles de ácidos grasos de cadena corta determinados en el análisis de lipólisis. Se conoce que los ácidos ramificados (2-metil propanoico y 3-metil butanoico) se producen por el metabolismo de los aminoácidos (Urbach, 1995, Marilley y Casey, 2004). En este trabajo, el ácido 2-metil propanoico fue mayor en quesos elaborados con leche cruda que en quesos de leche pasteurizada, pero lo contrario fue observado para el ácido 3-metil butanoico.

Sólo tres aldehídos fueron identificados, dos de los cuales eran ramificados: 2-metil butanal y 3-metil butanal, producidos por la degradación de aminoácidos (Urbach, 1995). Como se encontró para la mayor parte de los compuestos volátiles, los niveles de estos

aldehídos fueron mayores en los quesos de leche cruda. Sin embargo, el contenido de acetaldehído fue más elevado en quesos de leche pasteurizada que en quesos de leche cruda. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Ortigosa y col. (2001) y Barron y col. (2007).

7. Conclusiones

A lo largo de este capítulo se evidenció que un incremento en el contacto entre triglicéridos y enzimas lipolíticas favoreció la producción de ácidos grasos libres en tiempos menores a los habituales. Para lograr este efecto, el mejor pre-tratamiento de la leche fue la homogeneización. La ausencia de tratamiento térmico demostró tener una influencia principal en la actividad lipolítica presente en el queso. En condiciones que favorecieron la compartimentalización enzima-sustrato y el mantenimiento de la actividad lipolítica, se produjeron cantidades incrementadas de compuestos volátiles derivados de la grasa.

Capítulo 3:

**Efecto del pH, la temperatura de cocción
y el lavado de la cuajada sobre la actividad
de plasmina en pseudocuajadas modelo**

1. Introducción

Durante la maduración del queso, la hidrólisis inicial de las caseínas es producida por el coagulante residual y la enzima nativa de la leche plasmina, lo cual resulta en la formación de péptidos largos y medianos que luego son degradados por las enzimas proteasas y peptidasas del fermento primario, del fermento secundario si lo hubiese y de la microflora no perteneciente al fermento (Visser, 1993; Yvon y Rijnen, 2001). Los péptidos y aminoácidos libres pueden contribuir en forma directa al sabor de fondo del queso (Sousa y col., 2001), o actuar como precursores de compuestos volátiles que impactan fuertemente en el flavour (McSweeney y Sousa, 2000; Williams y col. 2001; Smit y col., 2005).

La plasmina es una serina proteasa, cuyo pH y temperatura óptimos son 7,5 y 37°C, respectivamente. En la leche, la enzima hidroliza preferentemente la β -caseína liberando γ -caseínas (Rampilli y Raja, 1998). La caseína α_2 también se ha señalado como un sustrato preferencial de la plasmina (Le Bars y Gripon, 1993). La estabilidad de la enzima al calor es relativamente alta, ya que se requiere una temperatura de 80°C durante 10 min para producir su inactivación (Sommers y Kelly, 2002; Kelly y col., 2006). La plasmina pertenece a un sistema complejo que incluye la enzima activa, su precursor inactivo plasminógeno, los activadores del plasminógeno y dos inhibidores: el inhibidor de la plasmina y los inhibidores de los activadores del plasminógeno (Grufferty y Fox, 1988; Kelly y col., 2006). La inactivación selectiva de los componentes del sistema plasmina debido a factores tecnológicos durante la elaboración de quesos puede conducir a cambios en la actividad de la enzima. Algunos autores han estudiado la influencia de diversos factores en la actividad de plasmina y la extensión de la proteólisis en quesos, que incluyen la temperatura, el pH, el salado, el agregado de plasmina exógena y de activadores del plasminógeno. Estas investigaciones se desarrollaron en modelos de quesos Cheddar miniatura (Watkinson y col., 2001; Somers y Kelly, 2002; Milesi y col., 2008), en cuajadas no maduras (Choi y col., 2006) y en quesos elaborados con distintas tecnologías (Rampilli y Raja, 1998).

A pesar de que se conocen aspectos generales sobre la influencia de la plasmina en la proteólisis de quesos, existe poca información que relacione la tecnología de elaboración de quesos duros de pasta cocida, con la actividad de esta enzima en el queso y su impacto en la proteólisis. En este contexto, en el presente capítulo se estudiará el efecto del pH de drenado de suero, la temperatura de cocción de la cuajada, y la incorporación de una etapa de lavado de la cuajada, sobre la actividad de la enzima plasmina y su contribución a la proteólisis en pseudocujadas modelo.

El estudio se prolongó durante 7 días de almacenamiento de las pseudocujadas. Este tiempo fue elegido en base a trabajos previos sobre muestras comerciales de quesos Reggianito, Pategrás y Cremoso, en los cuales se detectó que las principales diferencias de actividad de plasmina se daban en los primeros días de maduración (Vélez y col., 2010 y 2012). En este sentido, se encontró que la actividad de plasmina se mantuvo constante durante la maduración en quesos Reggianito, a diferencia de lo hallado en quesos Cremoso y Pategrás, para los cuales la actividad disminuyó en los primeros días y luego se mantuvo sin modificaciones.

2. Materiales y Métodos

2.1. Diseño experimental

Se realizaron tres experiencias separadas, en las que se evaluó el efecto de tres factores en forma independiente, uno por cada experiencia (Tabla 3.1.). Se estudió la influencia del pH de drenado del suero, la temperatura de cocción (T) y la incorporación de una etapa de lavado de la cuajada, sobre la actividad de plasmina, la composición y la proteólisis de pseudocujadas modelo. El pH de drenado de suero se ensayó a 3 niveles: 4,6; 5,6 y 6,4, mientras se mantenía fija la temperatura de cocción de 50°C. La temperatura de cocción se estudió a 2 niveles, 50 y 56°C, a un pH de 5,6. Finalmente, el lavado de la cuajada se ensayó a dos niveles: sin incluir el paso de lavado e incorporando el paso de lavado, a una temperatura de cocción de 50°C y a un pH de 5,6. En cada experiencia se obtuvieron tres réplicas de elaboración de pseudocujadas.

Tabla 3.1. Diseño experimental

Experiencia	Variables fijas	Factor ensayado	Niveles		
			N1	N2	N3
1	pH 5,6	Temperatura	50°C	56°C	-
2	T 50°C	pH de drenado de suero	4,6	5,6	6,4
3	pH 5,6, T 50°C	Lavado de cuajada	Si	no	-

2.2. Preparación de pseudocujadas

La materia prima necesaria para preparar las pseudocujadas se obtuvo de dos elaboraciones a escala piloto de quesos Reggianito, realizadas dos días diferentes con distinta leche. En cada ocasión se utilizó leche cruda de gran mezcla procedente de una industria

láctea de la zona de Santa Fe, Argentina (Milkaut Coop. Ltda. Franck, Santa Fe). Las pseudocujadas se prepararon según el protocolo general descrito en el Capítulo 1, (Sección 2.3) con algunas modificaciones según el tratamiento ensayado (Figura 3.1). Las mezclas de suero-granos de cuajada se incubaron a 37°C hasta que alcanzaron el pH de consigna o target, de acuerdo con el diseño experimental (ver tabla 3.1). Luego, se calentaron a 1°C/min bajo agitación constante hasta llegar a 45°C. En el caso de las pseudocujadas en las que se incorporó la etapa de lavado, el suero se reemplazó totalmente con agua destilada (a 45°C, pH 5,5). Luego de alcanzar 45°C, todas las mezclas fueron calentadas más rápidamente (<1°C/min) hasta 50 o 56°C, de acuerdo con el tratamiento ensayado. Cuando las mezclas alcanzaron la temperatura de cocción deseada, la agitación se detuvo. Las partículas de cuajada fueron separadas del suero por centrifugación. Por cada experiencia, se obtuvieron 3 réplicas de elaboración, cada una de ellas constaba de dos pseudocujadas elaboradas en paralelo: una se analizó a los 0 días y la otra se almacenó durante 7 días a 12°C envasada al vacío para modelar una primera etapa de maduración. Se realizaron análisis de composición, proteólisis (NS pH 4,6/NT, electroforesis y perfiles peptídicos) y se determinó la actividad de la enzima plasmina y su precursor plasminógeno en las cuajadas de 0 y 7 días.

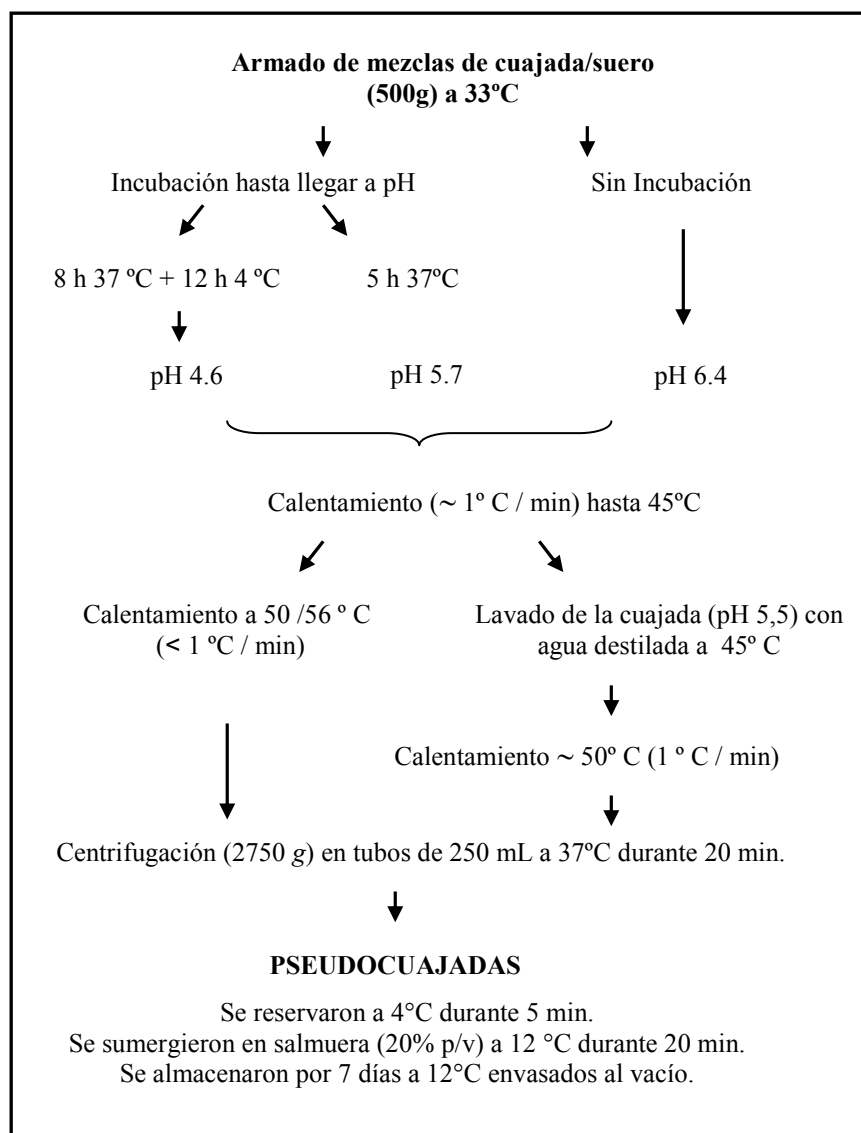


Figura 3.1. Procedimiento empleado en la preparación de pseudocujadas.

2.3. Determinaciones analíticas

pH, contenido de humedad y proteína

Los análisis se realizaron de acuerdo a las metodologías descritas en la Sección 3.1.2 del Capítulo 2, y la Sección 2.3 del Capítulo 1.

Actividad de plasmina

La actividad de la enzima se determinó según la técnica fluorométrica de Richardson y Pearce (1981), con algunas modificaciones. La misma se basa en la liberación del producto fluorescente 7-amino-4-metil cumarina (AMC) por acción de la plasmina sobre el péptido cumarínico no fluorescente N-succinyl-L-alanyl-L-phenylalanil-L-lysyl-7-amido-4-methyl

cumarina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos). La intensidad de fluorescencia se monitoreó durante 30 minutos en intervalos de 5 minutos en un espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi F-2000, Japón) con longitudes de onda de excitación y emisión de 380 y 460 nm respectivamente.

La muestra (3,9 g) de cuajada se pesó en un tubo Falcon, se le adicionaron 35 ml de citrato de sodio 0,1 M y se homogeneizó en Ultraturrax (IKA, T-25, Estados Unidos; equipado con un útil de dispersión S25N-18G) durante 2 min (1 minuto de agitación a 9200 rpm, 1 minuto de descanso, 1 minuto de agitación a 9200 rpm). Luego, la suspensión se centrifugó a 23900 g durante 20 min a 4°C, y la fracción soluble localizada entre la capa superior de grasa y el precipitado (caseína) fue filtrado a través de un filtro Whatman N° 1.

La medida de actividad se llevó a cabo por duplicado en cubetas de cuarzo, adicionando 50 µL de filtrado a 825 µL de buffer Tris (pH 7,5) y la mezcla fue incubada durante 5 min a temperatura ambiente (25°C). La reacción se inició con el agregado de 225 µL de sustrato (5 mg del péptido cumarínico se disolvieron en 1,33 mL de dimetil sulfóxido y 5,33 mL de buffer Tris 50 mM a pH 7,5).

Para determinar la actividad derivada del plasminógeno, se utilizó la enzima activadora uroquinasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos). Para ello se tomó como referencia la concentración utilizada por Rampilli y Raja (1998), preparando una solución de uroquinasa de 15 U/mL en buffer Tris (pH 7,5). Se incubaron 10 µL de esta solución con 200 µL del filtrado durante 30 min a 37 °C. Luego se procedió con la medida de la actividad descrita anteriormente.

Se realizaron gráficas de intensidad de fluorescencia vs. tiempo de reacción para cada muestra, y la pendiente obtenida se relacionó con la pendiente de una curva de calibración. La curva se realizó midiendo la intensidad de fluorescencia de soluciones de AMC de concentraciones conocidas. La actividad enzimática se expresó por gramo de queso en base seca, y se la definió como nmoles de 7-amido-4metil- cumarina (AMC) liberados por min a pH 7,5 y 25°C.

Nitrógeno soluble a pH 4.6 (NS-pH 4.6)

El contenido de nitrógeno en la fracción soluble a pH 4,6 se determinó por el método de Kjeldahl y se expresó como proporción (%) del nitrógeno total (llamado índice de maduración), evaluado por el mismo método. La metodología se describe en la Sección 4.1.4 del Capítulo 2.

Electroforesis (Urea-PAGE)

El residuo insoluble a pH 4,6 se analizó por electroforesis Urea-PAGE. Se utilizó una cuba vertical Mini-Protean II (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos), con una fuente de poder modelo 1000/500 (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos) aplicando un sistema de gel discontinuo (Andrews, 1983). Se empleó una concentración de acrilamida de 4% para el gel de apilamiento, y de 7,5% para el gel de separación (Hynes y col., 1999). Los geles se colorearon con solución de Coomassie Blue R-250 al 0,2% (p/v) en ácido acético, etanol y agua destilada (1,6:4:4) durante 1 h (Blakesley y Boezi, 1977), y luego se decoloraron mediante repetidos lavados con solución decolorante, compuesta por ácido acético, etanol y agua destilada (1:2,5:6,5).

Perfiles peptídicos por RP-HPLC

Para la obtención de los extractos solubles de queso, se homogeneizaron 5g de queso con 15 mL de agua destilada en un mortero. La suspensión se trasvasó a un tubo Falcon y se termostató a 40°C durante 1 h. Luego, se centrifugó a 3000 g durante 30 min, y se filtró a través de un filtro Whatman N° 42. El filtrado se ajustó a un volumen final de 25 mL. Las muestras se filtraron a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Millex, Millipore, San Pablo, Brasil), y un volumen de 60 µL del filtrado se inyectó en el cromatógrafo. El equipamiento utilizado consistió en una bomba cuaternaria, en un desgasificador en línea y un detector UV-Visible, todo perteneciente a Perkin Elmer (serie 200, Massachusetts, Estados Unidos). La adquisición de los datos se realizó por medio de una interfase analógica conectada a una computadora con el software Turbochrom® (Perkin Elmer, Norwalk, Estados Unidos). Se empleó una columna analítica tipo Aquapore OD-300 C18, de 220 x 4,6 mm, con un tamaño de partícula de 7 µm y un tamaño de poro de 300 Å (Perkin Elmer). La detección se llevó a cabo a 214 nm, la temperatura de la columna se mantuvo a 40°C, y la separación se realizó con un gradiente lineal de acetonitrilo en agua, según lo detallado en Hynes y col. (2003).

Estos análisis se realizaron por duplicado.

2.4. Análisis estadístico

Para cada experiencia, los datos de composición química, NS-pH 4.6, y actividad enzimática se analizaron mediante ANOVA de una vía comparando las medias con el método de la mínima diferencia significativa (LSD) con un porcentaje de confianza del 95%. Se empleó el programa estadístico SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos).

3. Resultados

3.1. Composición de las pseudocujadas

En la Tabla 3.2 se pueden observar los valores de pH, el contenido de humedad y proteínas de las pseudocujadas elaboradas de acuerdo a los distintos tratamientos.

Para los dos tiempos de maduración, las pseudocujadas mostraron una composición similar ($p>0,05$) desde el punto de vista de su contenido de proteínas y de humedad para todos los tratamientos ensayados.

En cuanto al pH seleccionado para el drenado del suero, el mismo se mantuvo constante durante los 7 días en las pseudocujadas obtenidas a pH 5,6 y 4,6. En las pseudocujadas donde el suero se drenó a pH 6,4, se observó una disminución significativa de pH ($p<0,05$).

Con respecto a la temperatura de cocción, la misma no afectó significativamente al pH medido a los dos tiempos estudiados.

Por otro lado, el lavado de la cuajada no influyó en los valores de pH al tiempo inicial, pero a los 7 días el pH fue significativamente superior en las pseudocujadas lavadas ($p<0,05$).

Tabla 3.2. Valores de pH, humedad y proteína de pseudocujadas elaboradas a distintos pH, temperaturas de cocción, y empleando un paso de lavado de cuajada.

pH consigna	pH medido		Humedad		Proteína (%)	
	0 días	7 días	0 días	7 días	0 días	7 días
4,6	4,65 ± 0,07 ^{Aa}	4,60 ± 0,14 ^{Aa}	38,29 ± 0,34 ^{Aa}	37,31 ± 0,28 ^{Aa}	28,44 ± 0,34 ^{Aa}	29,83 ± 0,47 ^{Aa}
5,6	5,60 ± 0,14 ^{Ba}	5,38 ± 0,11 ^{Ba}	38,44 ± 0,52 ^{Aa}	37,79 ± 0,67 ^{Aa}	30,22 ± 1,56 ^{Aa}	30,53 ± 1,14 ^{Aa}
6,4	6,4 ± 0,02 ^{Ca}	6,05 ± 0,07 ^{Cb}	39,59 ± 0,58 ^{Aa}	39,00 ± 0,71 ^{Aa}	28,15 ± 0,98 ^{Aa}	28,39 ± 0,01 ^{Aa}
Temp. de cocción						
50°C	5,60 ± 0,14 ^{Aa}	5,38 ± 0,11 ^{Aa}	38,44 ± 0,52 ^{Aa}	37,79 ± 0,67 ^{Aa}	30,22 ± 1,56 ^{Aa}	30,53 ± 1,14 ^{Aa}
56°C	5,68 ± 0,18 ^{Aa}	5,50 ± 0,28 ^{Aa}	37,68 ± 0,36 ^{Aa}	36,98 ± 0,38 ^{Aa}	30,91 ± 1,06 ^{Aa}	31,71 ± 0,52 ^{Aa}
Lavado						
Si	5,70 ± 0,15 ^{Aa}	5,73 ± 0,14 ^{Aa}	39,82 ± 0,72 ^{Aa}	39,28 ± 0,77 ^{Aa}	32,50 ± 0,4 ^{Aa}	32,75 ± 0,57 ^{Aa}
No	5,60 ± 0,14 ^{Aa}	5,38 ± 0,11 ^{Bb}	38,44 ± 0,95 ^{Aa}	37,86 ± 0,49 ^{Ba}	30,22 ± 1,56 ^{Aa}	30,53 ± 1,14 ^{Aa}

^{a,b,c} Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente (p<0.05).

^{A,B,C} Valores en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente (p<0.05).

3.2 Actividad del sistema plasmina – plasminógeno en pseudocujadas

A tiempo cero y a 7 días de almacenamiento, el pH de drenado del suero y el lavado de la cuajada fueron los dos factores tecnológicos que afectaron la actividad de la plasmina en las pseudocujadas (Tabla 3.3).

La actividad de la enzima en pseudocujadas en las que se drenó el suero a pH 4,6 y a pH 5,6 mostró valores similares entre sí e inferiores a los obtenidos en pseudocujadas cuyo pH de drenado fue 6,4 ($p < 0,05$).

En cuanto al lavado de la cuajada, este paso afectó positivamente a la actividad de plasmina, obteniéndose valores significativamente mayores ($p < 0,05$) cuando se incorporó la etapa de lavado.

Con respecto a la temperatura, este factor no tuvo impacto en los niveles ensayados, ya que no se encontraron diferencias en la actividad de plasmina en las pseudocujadas obtenidas aplicando cocción a 50 y 56°C.

El tiempo de conservación de las pseudocujadas tampoco influyó significativamente en la actividad de plasmina en ninguno de los tratamientos estudiados: la actividad se mantuvo constante ($p > 0,05$) durante los 7 días de almacenamiento.

Por otro lado, a los 7 días de almacenamiento, la actividad de plasminógeno fue significativamente superior a pH 6,4 ($p < 0,05$) que a pH 5,6 y 4,6, siendo las actividades determinadas a estos dos valores menores de pH, similares entre sí. A los cero días no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las actividades estudiadas a distintos pH para el plasminógeno. En cuanto a la temperatura de cocción, para los dos tiempos estudiados, los valores de actividad del precursor inactivo plasminógeno a 50 y 56°C fueron similares. Asimismo, a 56°C se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de la actividad con el tiempo de almacenamiento, lo cual no se correspondió con un incremento en la actividad de la enzima libre plasmina. Dicha disminución no se evidenció a 50°C.

Tabla 3.4. Actividad de plasmina y plasminógeno en pseudocujadas a los 0 y 7 días de almacenamiento.

pH	Actividad de Plasmina		Actividad Plasminógeno	
	0 días	7 días	0 días	7 días
4,6	3,82 ± 0,2 ^{Aa}	3,66 ± 0,26 ^{Aa}	1,97 ± 0,20 ^{Aa}	1,32 ± 0,26 ^{Aa}
5,6	4,91 ± 0,58 ^{Aa}	4,99 ± 0,50 ^{Aa}	2,52 ± 0,72 ^{Aa}	1,93 ± 0,30 ^{Aa}
6,4	7,14 ± 0,81 ^{Ba}	8,98 ± 1,04 ^{Ba}	2,57 ± 0,03 ^{Aa}	2,84 ± 0,11 ^{Ba}
Temp, Cocción				
50°C	4,91 ± 0,58 ^{Aa}	4,99 ± 0,50 ^{Aa}	1,97 ± 0,20 ^{Aa}	1,32 ± 0,46 ^{Aa}
56°C	5,10 ± 0,42 ^{Aa}	4,03 ± 0,50 ^{Aa}	2,50 ± 0,25 ^{Aa}	1,09 ± 0,31 ^{Ab}
Lavado				
Si	8,05 ± 1,29 ^{Aa}	8,88 ± 0,65 ^{Aa}	2,13 ± 0,85 ^{Aa}	2,59 ± 0,40 ^{Aa}
No	4,91 ± 0,58 ^{Ba}	4,99 ± 0,50 ^{Ba}	2,52 ± 0,72 ^{Aa}	1,93 ± 0,30 ^{Aa}

^{a,b,c} Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

^{A,B,C} Valores en la misma columna con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0.05$).

3.3 Proteólisis

N soluble a pH 4,6 y electroforesis

En la Figura 3.2 se muestra el contenido de NS a pH 4,6/ NT de las pseudocujadas de los distintos tratamientos, a 0 y 7 días de almacenamiento. Se puede observar que el tiempo influyó en algunos casos. En efecto, hubo un incremento significativo ($p < 0,05$) del índice de proteólisis en las pseudocujadas elaboradas a pH 4,6 y en las pseudocujadas en las que se lavó la cuajada.

Por otro lado, para cada tiempo de maduración, los valores de los distintos tratamientos fueron similares ($p > 0,05$).

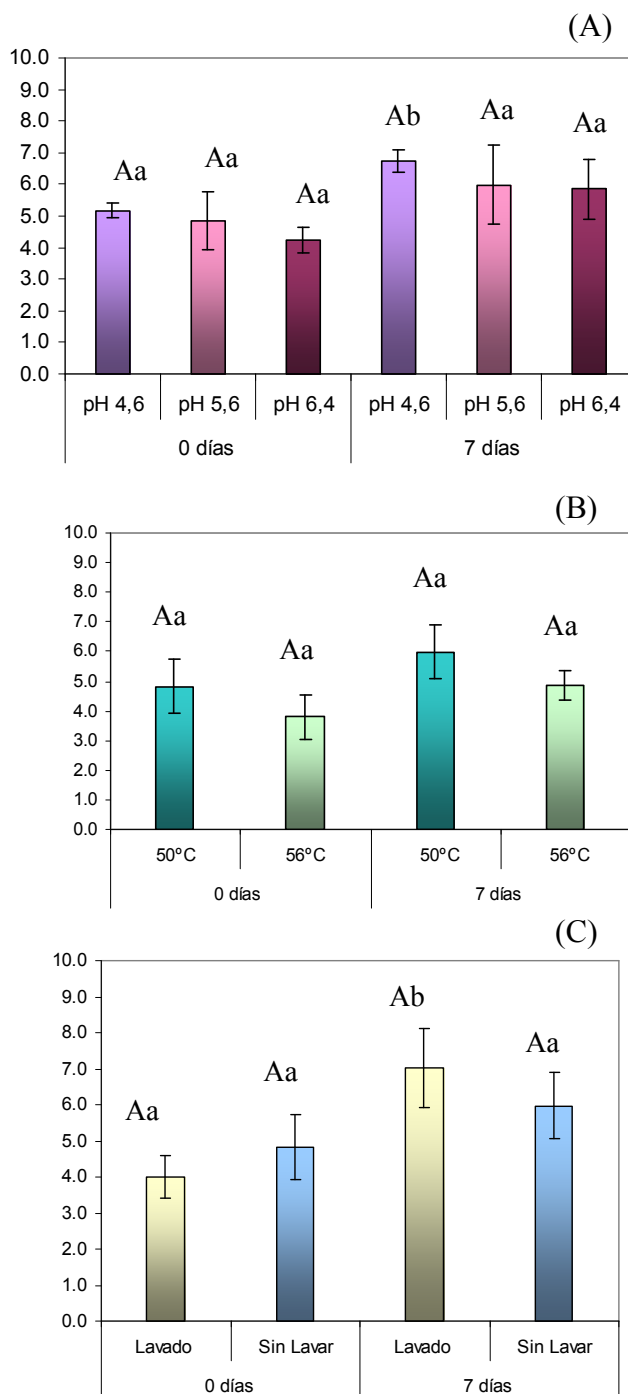


Figura 3.2. Contenido en NS a pH 4,6/NT de pseudocajadas a 0 y 7 días de almacenamiento. (A) Elaboradas a pH 4,6, 5,6 y 6,4 (T 50°C). (B) Elaboradas a 50 y 56°C (pH 5,6). (C) Elaboradas en presencia y ausencia de un paso de lavado.

^{A,B,C} Valores medios en el mismo día de almacenamiento con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$) entre tratamientos. ^{a,b,c} Valores medios del mismo tratamiento con distinto superíndice difieren significativamente con el tiempo de almacenamiento.

En la Figura 3.3 se muestra la electroforesis urea-PAGE de la fracción insoluble a pH 4,6 de pseudocuajadas provenientes de las tres experiencias realizadas. Se incluye una elaboración de cada experiencia como ejemplo, ya que las tres elaboraciones obtenidas mostraron resultados similares.

Con respecto a la influencia de los factores estudiados sobre la hidrólisis de la β -caseína (sustrato preferencial de la plasmina), no se han encontrado diferencias en la intensidad de las bandas correspondientes a esta caseína y a los productos de su hidrólisis por acción de la plasmina, las γ -caseínas.

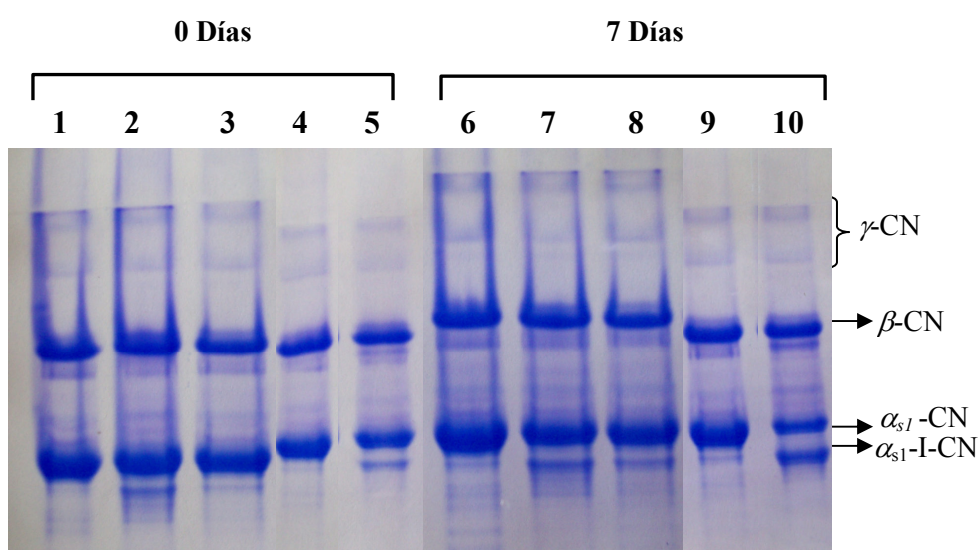


Figura 3.3. Urea-Page de pseudocuajadas. Se muestra una elaboración como ejemplo, de réplicas que arrojaron resultados similares. Calles 1 y 6: pseudocuajadas de 0 y 7 días, pH de drenado de suero 6,4, temperatura de cocción 50°C. Calles 2 y 7: pseudocuajadas de 0 y 7 días, pH de drenado de suero 4,6, temperatura de cocción 50°C. Calles 3 y 8: pseudocuajadas de 0 y 7 días, pH de drenado de suero 5,6, temperatura de cocción 50°C. Calles 4 y 9: pseudocuajadas de 0 y 7 días, pH de drenado de suero 5,5, temperatura de cocción 56°C. Calles 5 y 10: pseudocuajadas de 0 y 7 días, pH de drenado de suero 5,6, temperatura de cocción 50°C, con lavado.

La disminución del pH tuvo un efecto positivo sobre la hidrólisis de la caseína α_{s1} . Este factor fue el de más impacto en la hidrólisis de las caseínas evidenciada por electroforesis. A tiempo cero, en las pseudocujadas en las que se efectuó el drenado de suero a pH 4,6 (calle 2) se observó tempranamente la banda correspondiente al péptido α_{s1} -I-CN (f24-199), también denominado α_{s1} -I; mientras que la misma fue muy tenue en las cuajadas de pH 5,6 (calle 3), y no se detectó en las muestras que sufrieron el tratamiento a pH 6,4. Luego de 7 días de almacenamiento, el péptido se detectó en los dos tratamientos de menor pH, es decir, 4,6 y 5,6 (calles 7 y 8), mientras que la hidrólisis no se verificó en las de pH 6,4 (calle 6).

Con respecto al efecto de la temperatura de cocción, a tiempo cero no se observaron diferencias en la hidrólisis de las caseínas entre las pseudocujadas tratadas a 50 y a 56 °C (calles 3 y 4), pero a los 7 días, las pseudocujadas que habían recibido tratamiento a 50°C (calle 8) presentaron mayor producción de α_{s1} -I-CN que aquellas sometidas a 56°C (calle 9).

En cuanto al lavado de la cuajada, a tiempo cero se observó una intensidad de banda levemente inferior correspondiente al péptido α_{s1} - I en las pseudocujadas elaboradas sin lavado (Calle 3), respecto a las elaboradas con la etapa de lavado (Calle 3); y a los 7 días las intensidades de banda fueron similares (Calles 8 y 10).

Perfiles peptídicos

En las Figuras 3.4, 3.5 y 3.6 se presenta a modo de ejemplo un perfil de péptidos solubles correspondiente a cada experiencia; los cromatogramas obtenidos a partir de las cuajadas réplicas de elaboración fueron similares.

Se encontraron notorias diferencias entre los perfiles de péptidos solubles de las pseudocujadas elaboradas con diferente pH de drenado de suero (Fig. 3.4), que se intensificaron en las muestras de 7 días de almacenamiento. A cero días, las mayores variaciones se observaron en la zona del cromatograma definida por el intervalo de tiempo de retención comprendido entre 5 y 35 minutos (zona inicial), mientras que a los 7 días, las variaciones se extendieron hasta los 80 minutos. En efecto, en los perfiles obtenidos a pH 6,4 se observaron muy pocos péptidos en la zona inicial comparados con los otros tratamientos realizados a menor pH; los picos mayoritarios, que se presentaron en la zona final del cromatograma (entre 65 y 80 minutos), mostraron un incremento durante la maduración. Por el contrario, al comienzo del almacenamiento, los picos mayoritarios en los perfiles de menor pH (4,6 y 5,6) se presentaron en la zona inicial del

cromatograma, observándose que los picos fueron mayores en los perfiles de pH 4,6 en comparación con los de pH 5,5. A los 7 días, se observó un incremento en los picos de los cromatogramas para ambos tratamientos, sobre todo de aquellos presentes en el rango de tiempo de retención entre 5 y 60 minutos.

Los perfiles peptídicos también fueron afectados por la temperatura de cocción, tal como se observa en la Figura 3.5. Las diferencias más notorias se observan hasta los 55 min. Al inicio del almacenamiento, se observó una mayor cantidad de picos a 50°C que a 56°C, y el incremento en el tiempo fue más significativo a 50°C.

Por último, se observaron modificaciones en los perfiles debido al lavado de la cuajada (Figura 3.6). Al inicio de la maduración, los picos en los perfiles de las pseudocuajadas en las que se les aplicó una etapa de lavado fueron en general un poco menores, lo que puede ser consecuencia de una pérdida de los péptidos debido al lavado de la cuajada. Sin embargo, en las pseudocuajadas elaboradas con o sin lavado, las áreas de los picos de la zona inicial de los perfiles se incrementaron durante el tiempo de almacenamiento, alcanzando áreas similares en ambos tratamientos. Asimismo, se observaron algunas diferencias entre los perfiles de las pseudocuajadas con y sin lavado en la zona de mayores tiempos de retención (entre 60 y 80 min). En las pseudocuajadas sin lavado, esta zona tuvo una ligera disminución en el área de los picos durante el almacenamiento, mientras que en las pseudocuajadas con lavado se observó un incremento en el área de los picos de esta zona.

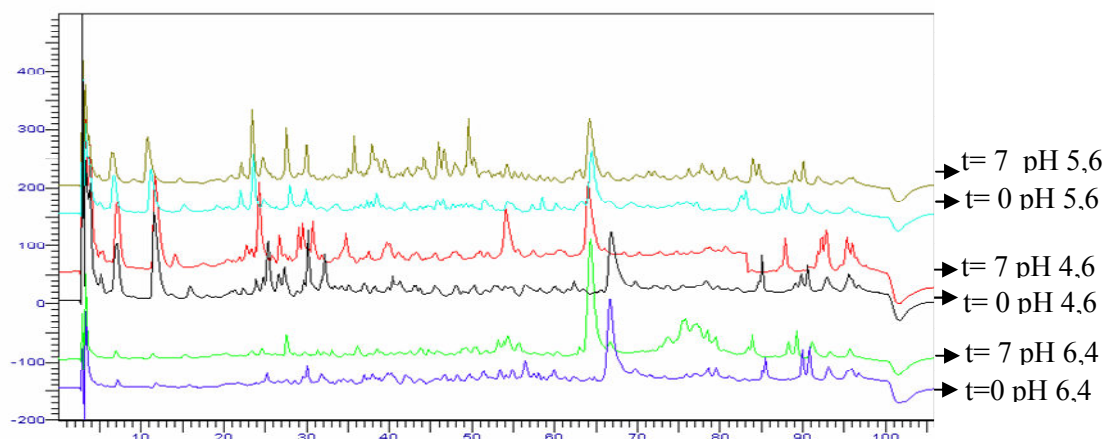


Figura 3.4. Influencia del pH en perfiles peptídicos de las pseudocuajadas: pH 6,4 a 0 (azul) y 7 días (verde), pH 4,6 a 0 (negro) y 7 días (rojo) y pH 5,6 a 0 (turquesa) y 7 días (verde oliva) de almacenamiento.

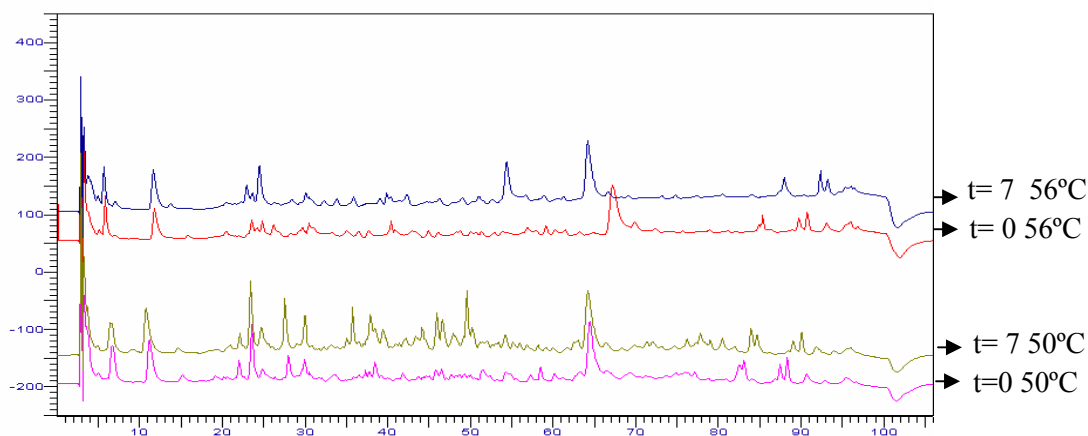


Figura 3.5. Influencia de la temperatura en perfiles peptídicos de las pseudocujadas: 50°C a 0 (rosa) y 7 días (verde oliva) y 56°C a 0 (rojo) y 7 días (azul) de almacenamiento.

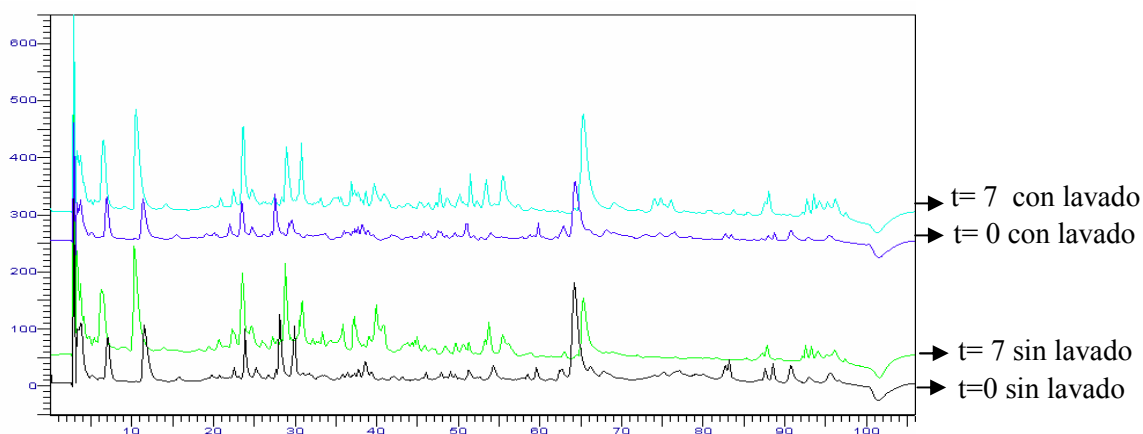


Figura 3.6. Influencia del lavado en perfiles peptídicos de las pseudocujadas: sin lavado a 0 (negro) y 7 días (verde) y con lavado a 0 (azul) y 7 días (turquesa) de almacenamiento.

4. Discusión

Para los dos tiempos de almacenamiento estudiados, los tratamientos no influyeron significativamente sobre el contenido de proteínas y la humedad de las pseudocujadas, las cuales demostraron ser un modelo reproducible y apropiado.

Con respecto al pH medido, una vez alcanzado el valor de consigna, el mismo se mantuvo sin modificaciones en la mayoría de las pseudocujadas, excepto en las que se elaboraron a pH 6,4 y en las que no se lavó la cuajada. En las primeras, el pH disminuyó con el tiempo, lo cual se debe sin duda a que, a diferencia de las pseudocujadas elaboradas a pH 4,6 y 5,6, no hubo una incubación previa a 37°C antes de la etapa de cocción con el objeto de favorecer la acidificación, y de esta manera, el fermento actuó

fundamentalmente durante el almacenamiento, fermentando la lactosa disponible. La influencia del lavado de la cuajada se detectó a los 7 días de maduración, siendo el pH mayor en las pseudocujadas elaboradas con lavado, lo cual es esperable ya que al remover el suero se elimina lactosa disponible para los microorganismos del fermento. No se han reportado trabajos previos donde se haya estudiado el lavado de la cuajada o cambios de pH en modelos de quesos duros.

El contenido en NS a pH 4,6 expresado como porcentaje del NT es un índice inespecífico de maduración del queso; la fracción soluble a pH correspondiente al punto isoeléctrico de las caseínas incluye proteínas (excluyendo las caseínas), péptidos medianos o grandes derivados de la hidrólisis de las caseínas como por ejemplo el α_1 -CN (f1-23), la fracción de proteosa peptona (formada principalmente por fragmentos N terminales de la hidrólisis de la plasmina sobre la β -CN) y los productos subsecuentes de hidrólisis: oligopéptidos, aminoácidos y compuestos nitrogenados no proteínicos (Ardö, 1999). Están ausentes de esta fracción, por ser insolubles a pH 4,6, el péptido α_{s1} -I (α_1 -CN f24-199) proveniente de la acción del coagulante sobre la α_{s1} -CN, y también las caseínas γ_1 (β -CN f 29-209), γ_2 (β -CN f 106-209), y γ_3 (β -CN f 108-209), que derivan de la hidrólisis de la plasmina sobre la β -CN.

En todos los quesos madurados el índice de NS pH 4,6/NT aumenta durante la maduración, lo cual es característico debido a la evolución de la proteólisis en el tiempo (McSweeney y Fox, 1993). Ramonda (2009) e Hynes y col. (2003) estudiaron la proteólisis en quesos Reggiano comerciales y elaborados en planta piloto, respectivamente, y encontraron que los valores de NS pH 4,6/NT se incrementaron desde un 4-6% a un 17-20% en 180 días de maduración. En el presente trabajo, sólo se evidenció un aumento significativo del índice en las pseudocujadas elaboradas a pH 4,6 (desde un 5% hasta un 7%) y en las pseudocujadas en las que se efectuó el lavado de la cuajada (desde un 4% hasta un 7%), lo que podría deberse a la acción del coagulante y de la plasmina, probablemente con mayor influencia de una u otra enzima en cada caso, como se discutirá más adelante. Asimismo, el índice se mantuvo sin modificaciones para el resto de las pseudocujadas durante los 7 días de almacenamiento debido probablemente al corto tiempo estudiado, con un valor medio aproximado de 5%, el cual se encuentra dentro del rango informado para quesos Reggiano jóvenes (Candioti y col., 2002; Hynes y col, 2003; Ramonda, 2009).

Por otro lado, para cada tiempo de maduración, en el presente trabajo no se encontraron diferencias entre los tratamientos estudiados sobre el índice de NS a pH

4,6. En este sentido, se encontraron similitudes con Hayaloglu y col. (2010) quienes estudiaron el efecto de la pasteurización de la leche y de distintas temperaturas de escaldado de la cuajada (60, 70, 80 y 90°C) sobre la proteólisis de quesos Malatya, y no detectaron una influencia de la temperatura de cocción sobre el contenido de NS a pH 4,6, pero sí reportaron que la pasteurización disminuía dicho índice. Por el contrario, se encontraron algunas discordancias con los resultados expuestos por Watkinson y col. (2001), quienes estudiaron la influencia del pH de inicio de la maduración (desde 5,1 hasta 6,1) en modelos de quesos Cheddar elaborados durante 87 días de maduración; los autores encontraron que el nitrógeno soluble del extracto acuoso del queso se incrementaba al aumentar el pH debido al aumento de la hidrólisis de la β -caseína por la plasmina, constatado por electroforesis. Las diferencias observadas se intensificaron luego de los 7 días de almacenamiento, encontrando las mayores diferencias a los 87 días de maduración. En este sentido, en el presente trabajo no se pudo observar una correspondencia entre el aumento de la actividad de plasmina y un incremento del contenido de NS a pH 4,6.

Debido a que la proteólisis es un evento bioquímico complejo, no es posible caracterizarla por un único ensayo, sino que existen distintos análisis para evaluar su evolución y la influencia de los agentes proteolíticos que participan (Sousa y col., 2001; McSweeney, 2011). En efecto, si los objetivos que se persiguen en las investigaciones involucran algún agente particular, por ejemplo la plasmina, los diferentes tipos de coagulante o la adición de ciertos fermentos, la metodología que se utilice para evaluarlo debe enfatizar en el estudio de la proteólisis causada por el mismo. Como se mencionó anteriormente, la determinación de NS a pH 4,6 es un índice general que indica el nivel de proteólisis de un queso. En las presentes experiencias, se encontraron diferencias entre tratamientos mediante técnicas que describen la proteólisis, tanto primaria, que atañe a la hidrólisis de las caseínas intactas en grandes fragmentos, como la secundaria en lo que hace a la formación de péptidos solubles. La evaluación de la proteólisis primaria generalmente se mide por la extensión de la hidrólisis de la α_{s1} -CN y de la β -CN por electroforesis, y la proteólisis secundaria puede evaluarse por la proporción de péptidos y aminoácidos libres mediante fraccionamiento de nitrógeno, perfiles peptídicos obtenidos por HPLC (Grappin y Beuvier, 1997; Gagnaire y col., 2001 y 2011). En los ensayos realizados en la presente tesis, descriptores específicos y sensibles como la electroforesis y los perfiles peptídicos arrojaron resultados claramente relacionados al efecto de los factores estudiados. Las

diferencias en la actividad de la enzima plasmina se reflejaron en la formación de péptidos solubles, si bien las mismas no fueron detectadas por electroforesis, debido probablemente al corto tiempo de maduración estudiado. Por otro lado, tanto la electroforesis como los perfiles peptídicos fueron capaces de describir la influencia del coagulante residual

En cuanto a la actividad de la enzima plasmina, se encontró que a pH 6,4 la actividad fue significativamente superior a pH 4,6 y 5,6 a los dos tiempos de maduración. Farkye y Fox (1990) no encontraron diferencias en la actividad de plasmina de cuajadas coaguladas enzimáticamente drenadas a pH 5,9; 6,1 y 6,3. Sin embargo, se ha observado que la β -CN es más rápidamente hidrolizada en quesos suizos que en Gouda o Cheddar posiblemente debido a los mayores valores de pH en los primeros (en quesos suizos el pH llega hasta aproximadamente 5,4, en quesos Gouda hasta aproximadamente 5,2 y en quesos Cheddar el pH puede ser ligeramente inferior a 5,1 en algunos casos) (Fox y col. 1993). En los quesos madurados con hongos tipo Camembert, donde el pH puede ser superior a 7, la actividad de plasmina es alta y contribuye significativamente a la proteólisis (Bastian y Brown, 1996). En este sentido, Voigt y col. (2011) han reportado una importante acción de la enzima en la proteólisis de ese tipo de quesos ya que detectaron en estudios de electroforesis la desaparición completa de la banda correspondiente a la β -CN luego de 30 días de maduración.

El incremento de la actividad de plasmina a pH 6,4 en las pseudocuajadas tuvo un correlato con la proteólisis evidenciada en los perfiles peptídicos. En este sentido, hubo un aumento de los picos en las zonas del cromatograma en las que eluyen los péptidos hidrofóbicos, con tiempos de retención superiores a 50 min. Varios autores han asociado las zonas de mayor tiempo de retención de los cromatogramas a los péptidos liberados por la acción de la plasmina (Kelly y O'Donnell, 1998; Barret y col., 1999; Upadhyay y col., 2004a).

En cuanto a la influencia del pH sobre la actividad del plasminógeno, no se observaron diferencias entre las pseudocuajadas recién elaboradas, pero sí se observó que a los 7 días de almacenamiento las pseudocuajadas que fueron conservadas a pH 6,4 tuvieron mayor actividad del precursor que las elaboradas a pH 4,6 y 5,6; lo cual podría indicar algún tipo de desnaturalización del plasminógeno a pH bajos durante el almacenamiento, ya que no se verificó un pasaje del mismo a la forma activa. No hay reportes previos acerca de la actividad del precursor plasminógeno en cuajadas almacenadas durante corto plazo, pero sí acerca del efecto adverso de una disminución

del pH en la actividad del plasminógeno y en la retención del mismo en la cuajada (Crudden y Kelly, 2003). Dupont y Grappin (1998) determinaron la ausencia de la enzima plasmina y su precursor en quesos frescos (pH de 4,3-4,5), por medio de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar la concentración absoluta de la enzima.

Con respecto a la temperatura de cocción, a 56°C se observó una disminución de la actividad del plasminógeno durante el almacenamiento, pero dicho cambio no se correspondió con un aumento de la actividad de la plasmina lo cual indicó que no se produjo una activación del mismo. Para los dos tiempos estudiados, el tratamiento de cocción no afectó la actividad de la plasmina y del plasminógeno significativamente, y tampoco se encontraron diferencias notorias en la electroforesis y en las zonas de los perfiles peptídicos donde eluyen los péptidos liberados por la plasmina. Estos resultados son en parte similares a los encontrados por Choi y col. (2006), quienes sólo encontraron diferencias en la actividad de plasmina en cuajadas tratadas a ciertas temperaturas. En efecto, los autores estudiaron la actividad de plasmina en cuajadas elaboradas a pH 5,3 sin adición de fermento, acidificadas con ácido láctico e incubadas durante 1 hora a diferentes temperaturas (21, 37 y 55°C). Los investigadores encontraron que la actividad de plasmina no era significativamente diferente entre las cuajadas elaboradas a 37°C y a 55°C, y sólo hallaron niveles significativamente mayores para la actividad de plasmina en las cuajadas cocidas a 55°C con respecto a las cuajadas incubadas a 21°C. Sin embargo, estos resultados no coinciden con los reportados por Richardson y Pearce (1981), Rampilla y Raja (1998) y Somers y Kelly (2002), quienes encontraron que un aumento en la temperatura de cocción, desde 37 hasta 55°C incrementaba la actividad de la plasmina; se atribuyó dicho incremento a la activación del plasminógeno debido a la destrucción de los inhibidores de los activadores del mismo. Cabe aclarar que las discordancias halladas pueden deberse a que los mencionados autores realizaron estudios en quesos comerciales con estadíos avanzados de la maduración, como se detallará a continuación. Richardson y Pearce (1981) estudiaron la actividad de plasmina en quesos Cheddar y en quesos suizos comerciales (la cuajada de los quesos Cheddar se escalda a 37°C y la de los quesos suizos, a 55°C) y hallaron que la actividad de la plasmina en quesos Cheddar era menor. Rampilla y Raja (1998) determinaron que la actividad de plasmina en quesos en los cuales se utilizan tratamientos térmicos severos (Grana Padano, Pecorino Romano y Emmental) era mayor que en quesos en los que no se utiliza una etapa de cocción (quesos Brie),

especialmente en condiciones ácidas (queso Quattrolo). Somers y Kelly (2002) estudiaron el efecto de la cocción de la cuajada (a 38, 43, 48 y 55°C) en la contribución de la actividad de la plasmina a la proteólisis en un modelo de quesos Cheddar miniatura durante 90 días de maduración. Estos autores encontraron que la actividad era significativamente superior en los quesos elaborados a 55°C, seguidos por los elaborados a 48°C, obteniendo valores similares e inferiores en los elaborados a 38°C y 43°C. Estas diferencias se encontraron luego de 30 días de maduración. Además, observaron que la actividad de plasmina se incrementaba durante la maduración en todos los quesos, siendo el incremento mayor en quesos elaborados a 55°C. Estas variaciones en la actividad de la plasmina se correspondieron con una mayor hidrólisis de la β -caseína a medida que aumentaba la temperatura de cocción, y con la aparición de péptidos solubles característicos de la hidrólisis de la enzima sobre la β -caseína.

En el presente trabajo, el lavado de la cuajada incrementó la actividad de la plasmina, probablemente debido a la eliminación de los inhibidores de la enzima presentes en el suero. Esta diferencia de actividad se reflejó en los perfiles peptídicos, nuevamente en la zona en la que eluyen los péptidos hidrofóbicos correspondientes a la acción de la plasmina. No existen trabajos reportados sobre el efecto de este paso tecnológico sobre la actividad de la proteasa, pero se ha observado que es superior en quesos Gouda (en los cuales la temperatura de cocción es de 35-37°C y se efectúa el lavado de la cuajada) que en quesos Cheddar comerciales (donde la temperatura de cocción se mantiene a 37°C y no incluye lavado) (Grufferty y Fox, 1988; Fox y col., 1993).

En cuanto al coagulante, la disminución del pH favoreció la hidrólisis de las caseínas catalizada por este agente enzimático, encontrándose la mayor evidencia de esta influencia a pH 4.6 y 5.6. Una tendencia similar fue informada por Bansal y col. (2007), quienes encontraron que el drenado del suero a un pH menor a 5.7 incrementó la retención de coagulante en la cuajada. Además, es necesario tener en cuenta que la enzima tiene un pH óptimo de acción a ~4, según el sustrato. La variación encontrada por Bansal y col. en la actividad enzimática residual del coagulante se correspondió con los productos de hidrólisis registrados por electroforesis y con un incremento de picos en las zonas iniciales de los perfiles peptídicos. En este sentido, Larsson y col. (2006) y Milesi y col. (2008) indicaron que un incremento de los picos en la zona inicial de los cromatogramas (entre 10 y 55 minutos) se relacionaba con una mayor actividad residual de quimosina en quesos.

La disminución de la temperatura de cocción también favoreció la proteólisis mediada por el coagulante en pseudocujadas, lo cual se confirmó por electroforesis y mediante un aumento en el área de los picos presentes en la zona inicial de los perfiles. Un mayor efecto se observó a los 7 días de maduración. En este sentido, Hynes y col. (2004) y Sheehan y col. (2007) encontraron una actividad de coagulante baja al comienzo de la maduración de quesos cocidos entre 45-60°C y una activación posterior en el curso de la maduración.

El lavado de la pseudocujada ocasionó una mayor liberación del péptido α_{s1} -I a tiempo cero, pero a 7 días no se encontraron diferencias en la electroforesis. Asimismo, a los dos tiempos estudiados no se observó una influencia significativa de la actividad del coagulante en los perfiles peptídicos.

La actividad residual de quimosina en quesos y modelos con diversas intervenciones tecnológicas y su correlación con la proteólisis es objeto de otro trabajo doctoral en el marco del mismo proyecto que la presente tesis.

5. Conclusiones

De las operaciones ensayadas, el aumento del pH y el lavado de la cuajada afectaron positivamente la actividad de la enzima plasmina y aumentaron su acción en la proteólisis de las pseudocujadas modelo, lo que fue evidenciado en los perfiles de péptidos solubles. No se detectó una influencia de la temperatura en la acción de la enzima.

En cuanto al coagulante, su acción se favoreció por la disminución del pH y la disminución de la temperatura de cocción, y el lavado no modificó significativamente su acción. Estos resultados se correspondieron con incrementos en la proteólisis.

El tiempo de maduración de las pseudocujadas, seleccionado en 7 días, fue suficiente para realizar un screening de tratamientos favorables a la acción de la enzima plasmina, pero probablemente debe prolongarse si se desea caracterizar mejor su actividad. En efecto, la mayor actividad de esta enzima se reflejó solamente en los perfiles peptídicos pero no en el índice de maduración o la electroforesis.

Capítulo 4:

**Validación a escala piloto de las
estrategias tecnológicas seleccionadas**

1. Introducción

La manufactura de quesos coagulados enzimáticamente, tal como el queso Reggiano, continúa luego de la elaboración con un proceso de maduración que insume largos períodos, comprendidos entre 6 y 24 meses. Durante el mismo, se produce una compleja serie de reacciones bioquímicas, que involucran el metabolismo de la lactosa residual, del citrato y del lactato, la lipólisis, la proteólisis, y el catabolismo de los aminoácidos y ácidos grasos libres. Estas transformaciones influyen en la textura y funcionalidad del queso, así como en el desarrollo del flavour característico de cada variedad (Fox, 2004; McSweeney, 2004).

El objetivo de este trabajo fue validar a escala piloto las transformaciones verificadas en modelos de queso experimental, al modificar determinadas variables tecnológicas en la elaboración de quesos duros de pasta cocida. En efecto, en los capítulos 2 y 3 se hallaron tratamientos que influían positivamente en la actividad de las enzimas y la aceleración de las reacciones bioquímicas de la maduración, y en base a ello se seleccionaron para los presentes ensayos en escala piloto, las siguientes variables tecnológicas: tratamiento físico de homogeneización, modificación de la temperatura de cocción o escaldado, e inclusión de una etapa de lavado de la cuajada. Dichos cambios estuvieron dirigidos a incrementar la actividad de las enzimas nativas de la leche plasmina y lipoproteína lipasa y en consecuencia favorecer la lipólisis y la proteólisis, y de esta manera, acelerar la maduración.

Los experimentos de elaboración de quesos en planta piloto son necesarios para validar los resultados obtenidos en modelos de queso miniatura o preparados en condiciones de laboratorio, sobre todo si se aspira a demostrar a quienes toman decisiones en el sector productivo, que los cambios propuestos son robustos y tienen algún impacto en la matriz alimentaria real (Hunter y col., 1997). Para ello, se requieren pruebas a escala piloto o industrial y, además, ensayos sensoriales. En este capítulo se emprendió esta estrategia de validación.

2. Materiales y Métodos

2.1 Diseño experimental

Se evaluó la influencia de la implementación de una tecnología de elaboración de quesos Reggiano intervenida respecto a la tradicional, sobre la proteólisis, lipólisis y la calidad sensorial de los mismos. Se realizaron dos elaboraciones en paralelo, una siguiendo la tecnología tradicional para quesos duros (leche pasteurizada, temperatura

de cocción 52°C y sin aplicación de lavado a la cuajada) y otra aplicando la tecnología modificada (fracción grasa homogeneizada, temperatura de cocción 50°C e incluyendo una etapa de lavado).

2.2 Pretratamiento de la leche

Como materia prima se usaron 150 L de leche cruda ($\text{pH } 6,7 \pm 0,05$) de gran mezcla, procedente de una industria láctea de la zona de Santa Fe, Argentina (Milkaut Coop. Ltda. Franck, Santa Fe). La leche se descremó y se obtuvo leche descremada ($< 0,1\%$ MG) y crema nativa ($>40\%$ MG). Con estas fracciones se preparó una mezcla al 20% MG que se homogeneizó a 9 MPa/45°C (Homogeneizador 31M-3TA, Gauling Corporation, Estados Unidos). La mezcla tratada se diluyó con leche descremada para preparar 50L 2,5% MG destinada a la elaboración del queso experimental. Para el queso control, la leche se estandarizó al 2,5% MG con crema sin tratar (en la Figura 4.1 se muestra el esquema experimental).

2.3 Elaboración de quesos

Los quesos se elaboraron en dos tinas en paralelo con 50 L de leche cada una. En la elaboración experimental, la leche sin tratar se calentó hasta 33°C; y en la experiencia control la leche se pasteurizó a 63°C durante 20 min y se dejó enfriar en tina hasta 33°C. En ambos casos, una vez alcanzada la temperatura se agregó CaCl_2 (Merck, Darmstadt, Alemania) hasta una concentración final en la leche de 0,014 % p/v. El fermento iniciador consistió en un fermento comercial de lactobacilos termófilos (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina) que se adicionó a una concentración de 10^6 UFC/mL de leche en las dos elaboraciones, junto con ácido láctico al 1,5% hasta llegar a pH 6,3. Finalmente, se agregaron 0,62 g de coagulante (Maxiren 150, Gist Brocades, Francia) por tina, que fueron suspendidos en 50 mL de agua destilada justo antes de utilizar.

Una vez que se produjo la coagulación y que el gel adquirió la firmeza necesaria, se realizó un primer corte de la cuajada y se esperó a que el coágulo se desprenda de las paredes de la tina y exude suero. Luego se realizó un segundo corte, se retiró la lira de las tinas y se inició el calentamiento de la mezcla suero - partículas de cuajada. Para el caso de la elaboración experimental con tecnología intervenida, aproximadamente 30 L de suero fueron reemplazados por una solución de lactosa 4.5% a 45°C, preparada en agua destilada. Generalmente, se utiliza el lavado de cuajada (por ejemplo en quesos

daneses tipo Gouda), para ajustar el pH independientemente del contenido de humedad. En este sentido, es posible que la disminución de pH no sea tan alta agregando agua a la mezcla de suero y granos cuajada. La lactosa difunde desde los granos de cuajada hacia el suero, hasta igualar concentraciones dentro y fuera de los granos, pero rara vez se llega a un equilibrio (Walstra y col., 1999b). Se obtiene de esta manera una masa de queso más suave. Por el contrario, en el presente trabajo se agregó una solución de lactosa para no generar cambios en la bajada de pH, teniendo en cuenta además de que se trata de un queso duro y que por lo tanto la lactosa retenida es menor ya que el grano se seca más. Este método fue efectivo ya que no se verificaron cambios en la curva de pH durante la elaboración modificada con respecto a la elaboración control.

Las mezclas de suero y granos de cuajada se calentaron primero a 1°C/min bajo agitación constante hasta llegar a 45°C, y después se procedió con una segunda rampa de calentamiento (<1°C/min) hasta 52°C en la elaboración control y 50°C en la experimental. Finalmente, se detuvo la agitación y se permitió que la cuajada se depositara en el fondo de las tinas, para su posterior moldeo. Los quesos pesaron 3,5 kg, se mantuvieron en prensa 12 horas, se salaron durante 3 días y se maduraron a 12°C y 80% de humedad relativa durante 60 días.

Se extrajeron muestras a los 45 y 60 días, de acuerdo al método normalizado de la Federación Internacional de lechería (FIL-IDF 50 C, 1995). Se analizó la composición global, la lipólisis, la proteólisis, la actividad de plasmina y se determinó el perfil sensorial. No se tomaron muestras a 3 días para no perturbar la maduración de los quesos, que serían objeto más tarde de ensayos sensoriales destinados a verificar la aceleración de la maduración.

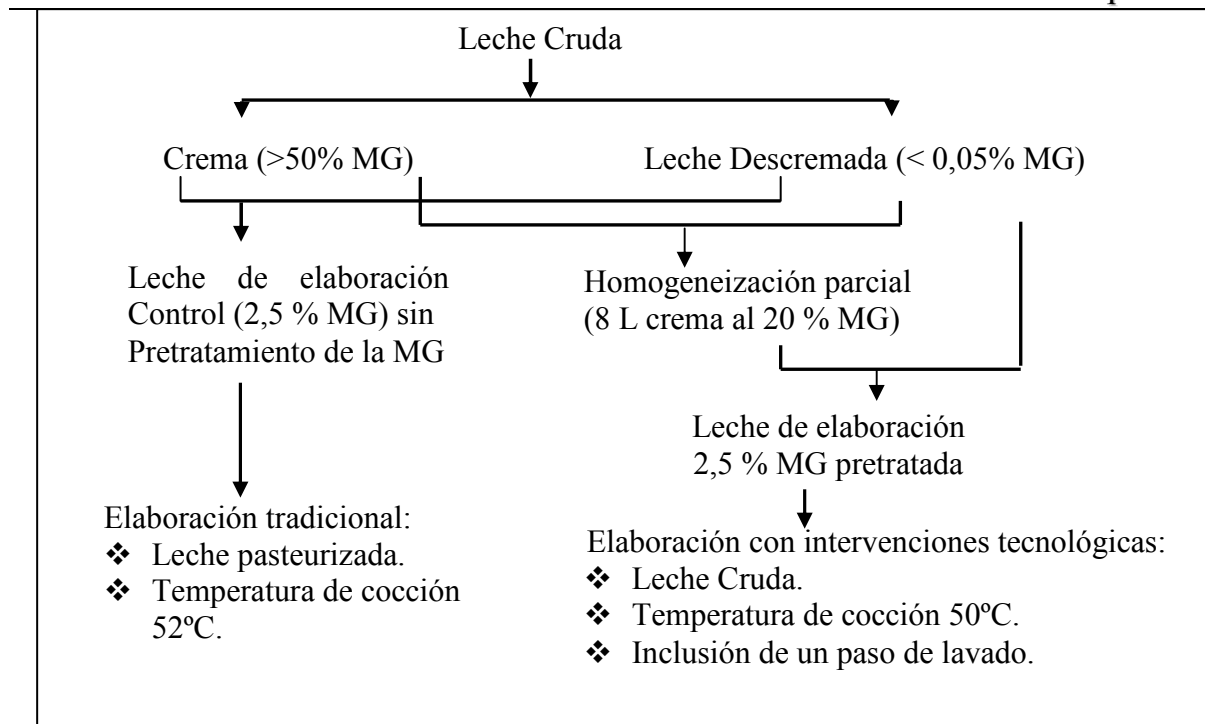


Figura 4.1. Esquema experimental.

2.4. Determinaciones analíticas

Grasa total

El contenido graso se determinó en leche, crema, y quesos por el método butirométrico de Gerber. Para leche y crema, la técnica se encuentra descrita en la Sección 2.1.3 del Capítulo 2; para las muestras de suero y de queso el procedimiento se explicó en la Sección 3.1.2 de dicho Capítulo.

Composición química global y pH

La humedad y el pH se determinaron a los dos tiempos de maduración, y la materia grasa y la proteína se determinaron a los 60 días. Las técnicas utilizadas se encuentran detalladas en la Sección 2.3 del Capítulo 1.

Fracciones nitrogenadas

Se analizó el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6, en TCA 12% y en PTA 2,5%. En primer lugar, se obtuvo la fracción soluble a pH 4,6 de acuerdo a lo descrito en la Sección 4.1.4 del Capítulo 2; y a partir de esta fracción se obtuvieron las fracciones solubles en TCA (NS-TCA) y en PTA (NS-PTA) según lo descrito por Gripon y col. (1975) y Bernal y col. (2001).

Para la fracción soluble en TCA, se tomaron 15 mL de la fracción NS a pH 4,6, que se colocaron en un vaso de precipitado, al cual se adicionaron lentamente 15 mL de ácido tricloroacético 24% (TCA) bajo agitación. Se dejó en reposo durante 30 minutos y se filtró sobre papel Whatman N° 42. Se tomaron 20 mL para la determinación del contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl.

La última fracción que se analizó fue el nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-PTA) (Gripon y col., 1975, Bernal y col., 2001). Para ello, se tomaron 25 mL de la fracción soluble a pH 4,6, se colocaron en un tubo Falcon, se le adicionaron 12,5 mL de ácido sulfúrico 25% v/v, y se agitó. Luego se adicionaron 12,5 mL de ácido fosfotúngstico (PTA) 10% p/v, y se volvió a agitar, dejando posteriormente en reposo durante 24 h en la heladera (5°C). Al día siguiente, el contenido total del tubo se filtró (papel Whatman N°42), y se tomaron 30 mL del filtrado para la determinación del contenido de nitrógeno por Kjeldahl.

Los resultados se expresaron como porcentaje del nitrógeno total.

Electroforesis

El residuo insoluble a pH 4.6 se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida (Urea-PAGE) según lo detallado en la Sección 2.3 del Capítulo 3.

Lipólisis

Los AGL (C_{4:0} - C_{18:2}) fueron extraídos y cuantificados según la técnica presentada en la Sección 4.1.4 del Capítulo 2.

Actividad de plasmina y plasminógeno

Se cuantificó por fluorimetría según la técnica descrita en la Sección 2.3 del Capítulo 3.

Análisis microbiológico

El recuento total de flora láctica termofílica en los quesos a 45 y 60 días se realizó según lo precisado en la Sección 4.1.4 del Capítulo 2.

Análisis sensorial

El análisis se realizó en el Departamento de Evaluación Sensorial de Alimentos (DESA) perteneciente al Instituto Superior Experimental de Tecnología Alimentaria (ISETA, 9 de Julio, Argentina). El mencionado instituto se seleccionó debido a su experiencia en tareas de

investigación relacionadas a la caracterización sensorial de quesos Reggianito y la disponibilidad de un panel sensorial entrenado (Hough y col., 1994 y 1996).

Se trabajó con un panel de 10 evaluadores seleccionados y entrenados mediante la Norma ISO-8586-1 (1993). El entrenamiento consistió en la búsqueda y definición de descriptores que representaran las características sensoriales de un queso Reggianito.

Las etapas de entrenamiento y medición de las muestras se realizaron empleando el ensayo de Análisis Descriptivo Cuantitativo, siguiendo los lineamientos de la Norma ISO 13299 (2003). Esta metodología consiste en determinar y cuantificar las características sensoriales de cada muestra en una escala de 0-10.

A los 45 y 60 días de maduración, se enviaron muestras refrigeradas al DESA. A los dos tiempos de maduración se evaluaron los atributos de apariencia, aroma y textura manual. El sabor se evaluó sólo a los 60 días debido a que se trataba de quesos elaborados con leche cruda, y según el Art. 605 del Código Alimentario (ANMAT, 2009), queda excluida de la obligación de pasteurizar la leche si la misma se destina a la elaboración de quesos siempre y cuando se maduren a una temperatura mayor a 5°C durante un lapso mayor o igual a 60 días.

Los descriptores evaluados para la apariencia fueron la intensidad de color y la intensidad del color del borde; para el aroma fueron la intensidad total de aroma, lácteo, ácido, manteca y picante; para la textura manual fueron la dureza, la elasticidad, la textura grasosa/aceitosa, la fracturabilidad y la gomosidad; para el sabor fueron la intensidad total, ácido, lácteo, leche cortada, picante, salado, residual.

Para cada descriptor se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas entre las muestras, con un 95% de confianza, y las medias se compararon con el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

3. Resultados

Composición global, recuentos microbianos y proteólisis

Para los dos tiempos de muestreo, los cambios efectuados en la tecnología no afectaron el pH, el porcentaje de humedad, el contenido de materia grasa y de proteínas (Tabla 4.1). En cuanto a la influencia del tiempo de maduración sobre estos parámetros, sólo se verificó un aumento significativo del pH.

Por otro lado, en los recuentos de flora láctica, se alcanzó un máximo de 10^7 UFC/g a los dos tiempos de maduración.

Respecto a la proteólisis descrita por las fracciones nitrogenadas, se observó que los quesos experimentales presentaron mayores valores para todas ellas, con diferencias

significativas en NS pH 4,6/NT, NS-TCA/NT y NS-PTA/NT al comparar con los quesos controles (Tabla 4.1). Esta misma tendencia se verificó para la acción del coagulante sobre la α -s₁ caseína, evidenciada por electroforesis urea-PAGE de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos (Fig. 4.2). En efecto, se observó una mayor hidrólisis en los quesos experimentales, lo cual se reflejó en una mayor intensidad en la banda correspondiente al péptido α -s₁-I. En cuanto a la hidrólisis de la β -caseína, se observó que a los dos tiempos de maduración, la banda correspondiente a las γ -caseínas era más tenue en los quesos experimentales.

Tabla 4.1. Composición y proteólisis de quesos controles y experimentales a los 45 y 60 días de maduración.

	Control (C)	Experimental (E)
Humedad (%) (45 días)	38,71± 1 ^a	41,55± 0.8 ^a
Humedad (%) (60 días)	38,27± 1.2 ^a	40,59 ±1 ^a
MG (BS) % (60 días)	41,43± 1.14 ^a	43,22± 0.52 ^a
P(BS) % (60 días)	48,41±1.15 ^a	49,42±1.95 ^a
pH (45 días)	5,40±0.02 ^a	5,40±0.03 ^a
pH (60 días)	5,45± 0.04 ^a	5,47± 0.03 ^a
NS pH 4,6/NT (45 días)	11,42± 0.9 ^a	13,54±1.2 ^b
NS pH 4,6/NT (60 días)	13,25±0.56 ^a	15,65±0.80 ^b
NS-TCA/ NT (60 días)	10,55±0.75 ^a	14,31±1 ^b
NS-PTA/NT (60 días)	5,58±0.5 ^a	8,34±0.8 ^b

^{a,b,c} Valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

Los valores son promedios ± desviación estándar.

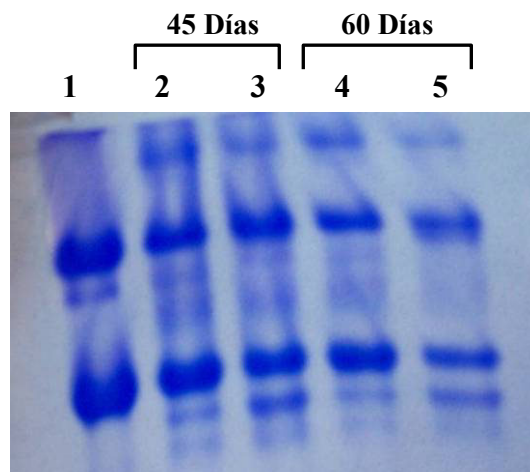


Figura 4.2. Electroforesis Urea-PAGE de los quesos. Calle 1: Caseinato patrón. Calle 2 y 4: Quesos controles a 45 días. Calle 3 y 5: Quesos experimentales a 60 días.

Actividad de plasmina – plasminógeno en quesos

Para los dos tiempos de maduración, la actividad de plasmina y plasminógeno en los quesos controles y experimentales fue similar (Tabla 4.2). El tiempo tampoco tuvo una influencia significativa sobre las actividades enzimáticas.

Tabla 4.2. Actividad de plasmina y plasminógeno en quesos de 45 y 60 días de maduración.

	Actividad de Plasmina		Actividad Plasminógeno	
	45 días	60 días	45 días	60 días
Control	8,57 ± 0,80	10,99 ± 0,95	3,77 ± 0.20	4,10 ± 0.05
Experimental	10,80 ± 0,75	11,40 ± 0,65	5,00 ± 0.41	4,55 ± 0.60

Los valores corresponden a promedios de duplicado de análisis.

Lipólisis

En la Tabla 4.3 y en la Figura 4.3 se muestran los perfiles de lipólisis de los quesos. Para los dos tiempos de maduración, el nivel de lipólisis en el queso experimental fue mayor que en el queso control ya que la concentración de todos los AGL fue superior en los primeros.

Por otro lado, en todos los quesos se observó una disminución en la concentración de los AGL entre los 45 y 60 días de maduración.

En la Figura 4.4 se muestra en detalle el comportamiento de los ácidos grasos cortos y medios, y puede observarse a los dos tiempos de maduración la misma diferenciación en los perfiles para ambos tipos de quesos, siendo el C4:0 y el C10:0 los ácidos grasos más abundantes.

Tabla 4.3. Perfil de ácidos grasos libres ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$ grasa) de quesos de 45 y 60 días de maduración.

	Control	Experimental	Control	Experimental
	(C)	(E)	(C)	(E)
	45 días		60 días	
AGL				
C_{4:0}	551,26±50	1473,01±125	190,12±23	1200,44±101
C_{6:0}	47,55±10	427,85±80	13,86±3	393,85±10
C_{8:0}	31,15±5	307,59±50	14,23±2	263,51±40
C_{10:0}	76,50±25	700,63±130	42,61±6	576,57±35
C_{12:0}	81,75±30	533,93±100	58,93±11	408,81±35
C_{14:0}	752,70±140	7777,18±400	639,88±153	5805,36±300
C_{16:0}	1464,14±150	12543,10±360	1134,96±110	8689,66±200
C_{18:0}	434,64±50	2752,12±150	327,93±16	1782,05±125
C_{18:1}	1261,47±100,95	6724,49±200	1177,96±14	4585,99±150
C_{18:2}	237,56±80	1035,06±110	259,78±34	803,65±80
Total	4938,72±300	34274,96±500	3860±329	24509,89±350

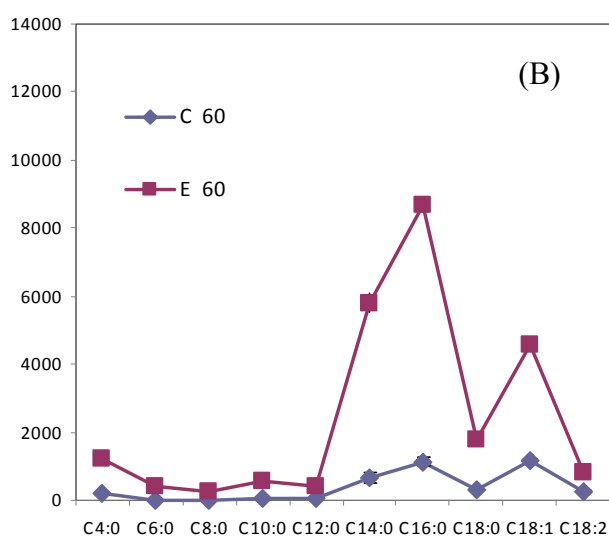
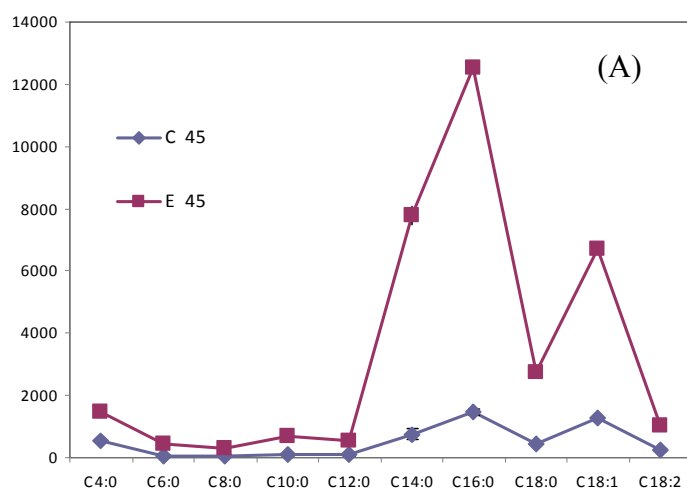


Figura 4.3. (A) y (B). Perfil de ácidos grasos libres en quesos controles y experimentales a los 45 y 60 días de maduración.

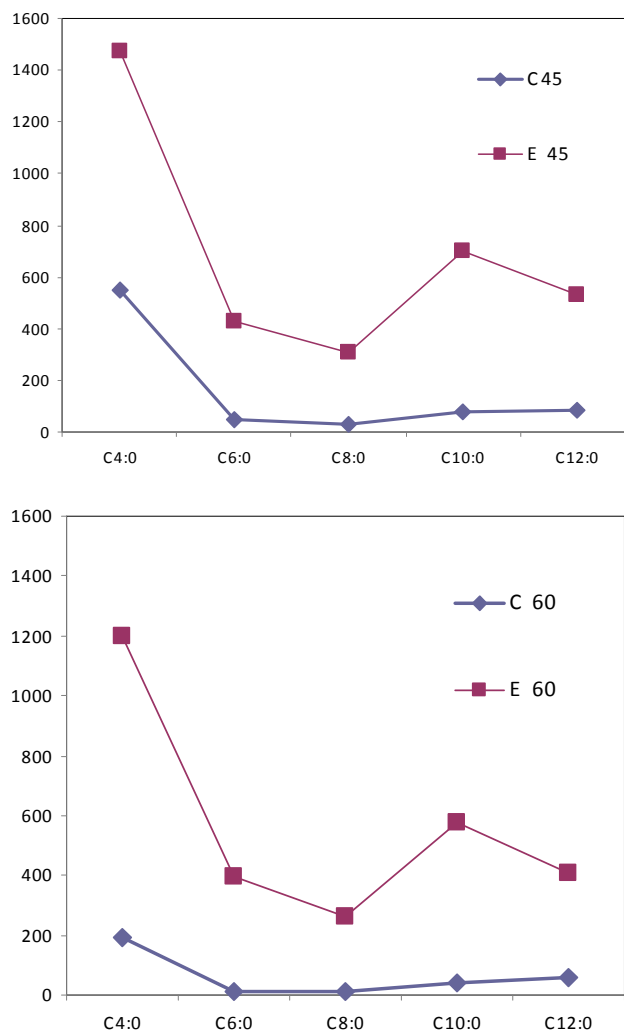


Figura 4.4. (A) y (B). Concentraciones de ácidos grasos cortos y medios en quesos controles y experimentales a los 45 y 60 días de maduración.

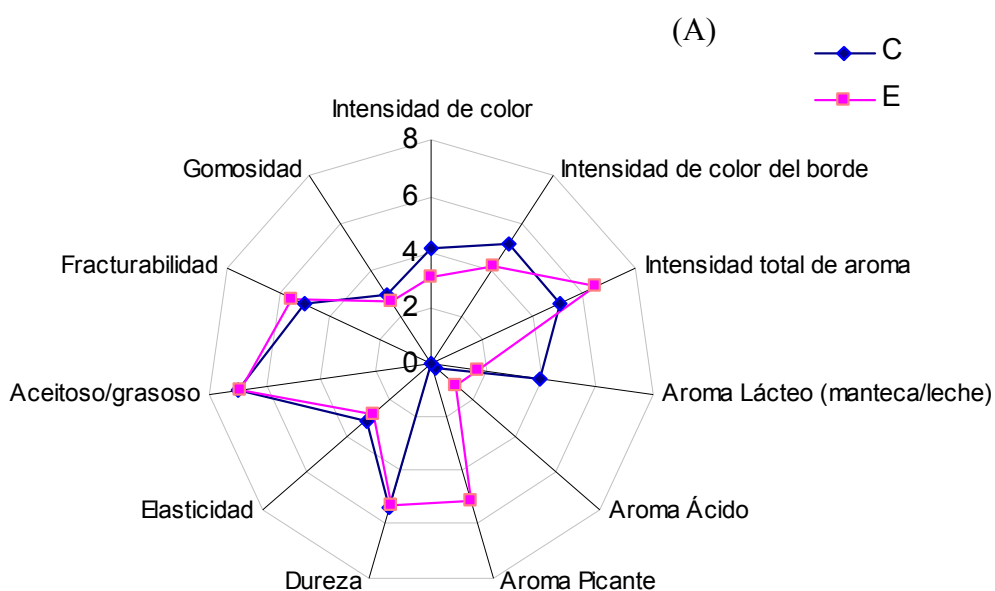
Análisis Sensorial

En la Tabla 4.4 y en la Figura 4.5 (A y B) y se presentan los perfiles sensoriales de los quesos a los 45 y 60 días de maduración.

A los 45 días de muestreo, las muestras presentaron diferencias significativas para los descriptores de aroma, de apariencia, y de textura manual. El queso experimental presentó mayor intensidad total de aroma, menor aroma lácteo, mayor aroma ácido y picante que el control, menor intensidad de color de masa y de borde, y menor elasticidad que los quesos controles ($p < 0,05$).

A los 60 días, el queso experimental presentó mayor intensidad total de aroma, menor aroma lácteo, mayor aroma picante que el control, menor intensidad de color de masa y de borde, mayor elasticidad y menor dureza que los quesos controles ($p < 0,05$). Además, se encontraron diferencias en todos los descriptores de sabor. La muestra experimental presentó mayor intensidad total, menor gusto ácido, menor sabor lácteo.

En cuanto a la influencia del tiempo, para los descriptores de aroma y apariencia, el queso experimental y control no presentaron cambios significativos a través del tiempo. Por el contrario, se evidenció que la fracturabilidad y la dureza del queso control se incrementó en el tiempo estudiado, mientras que el queso experimental se mantuvo estable.



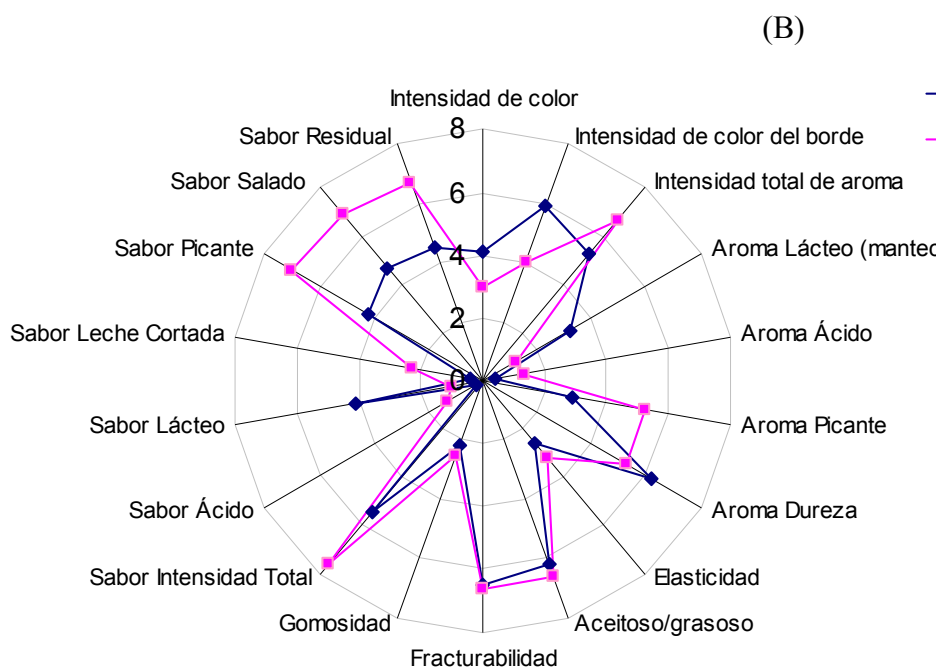


Figura 4.5. (A) y (B). Atributos sensoriales de los quesos controles y experimentales a los 45 y 60 días de maduración.

Tabla 4.4. Promedios de los puntajes obtenidos para cada descriptor sensorial.

	C (45 días)	E (45 días)	C (60 días)	E (60 días)
Apariencia				
Intensidad de color	4,1 ^a	3,1 ^b	4,1 ^A	3,0 ^B
Intensidad de color de borde	5,1 ^a	4,1 ^b	5,9 ^A	4,0 ^B
Aroma				
Intensidad total de aroma	5,1 ^a	6,5 ^b	5,3 ^A	6,7 ^B
Lácteo (manteca/leche)	3,9 ^a	1,7 ^b	3,2 ^A	1,2 ^B

Ácido	0,2 ^a	1,2 ^b	0,4 ^A	1,3 ^B
Picante	2,3 ^a	5,1 ^b	2,9 ^A	5,2 ^B
<i>Textura Manual</i>				
Dureza	5,4 ^a	5,3 ^a	6,2 ^A	5,3 ^B
Elasticidad	3,1 ^a	2,8 ^b	2,6 ^A	3,2 ^B
Aceitoso/grasoso	7,0 ^a	6,9 ^a	6,2 ^A	6,6 ^A
Fracturabilidad	5,0 ^a	5,5 ^a	6,5 ^A	6,6 ^A
Gomosidad	2,9 ^a	2,6 ^a	2,2 ^A	2,5 ^A
<i>Sabor</i>				
Intensidad total			5,4 ^A	7,6 ^B
Ácido			0,2 ^A	1,3 ^B
Lácteo			4,1 ^A	1,0 ^B
Leche cortada			0,4 ^A	2,3 ^B
Picante			4,2 ^A	7,0 ^B
Salado			4,7 ^A	6,9 ^B
Residual			4,5 ^A	6,7 ^B

^{a,b,c} A 45 días, valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

^{A,B,C} A 60 días, valores en la misma fila con distinto superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

Los valores son promedios \pm desviación estándar.

4. Discusión

En este capítulo, se validaron a escala piloto las modificaciones tecnológicas más favorables para incrementar la lipólisis y proteólisis en los quesos, seleccionadas en los Capítulos 2 y 3. Se realizó una fabricación experimental a escala piloto con una tecnología intervenida en vistas a acelerar la maduración, que se comparó con una elaboración control según la tecnología tradicional para quesos Reggianito. Las muestras obtenidas en la elaboración experimental alcanzaron a los 60 días atributos sensoriales comparables a los de un queso maduro, y se detuvo su maduración en cámara. A ese tiempo, ya mostraban una adecuada intensidad total de sabor.

La composición de los quesos, el contenido de humedad, materia grasa y proteína fueron similares para las fabricaciones control y experimental. En general, los valores hallados fueron comparables con los obtenidos en la experiencia de quesos miniatura (Sección 5.2 del Capítulo 2), excepto para el contenido de humedad, el cual fue mayor en el presente estudio;

este resultado no es sorprendente ya que en los quesos obtenidos a escala piloto el tiempo de maduración se redujo a sólo dos meses como consecuencia de los cambios favorables en la velocidad de la maduración.

Con respecto al índice de maduración, el mismo fue superior en muestras experimentales con respecto a las controles, a los dos tiempos de maduración estudiados. A su vez, todos los valores fueron comparables a los informados para quesos Reggianito (Candiotti y col. 2002; Hynes y col., 2003; Wolf y col., 2010), y a aquellos encontrados en los quesos miniatura elaborados en el presente trabajo de tesis (Sección 4.2 del Capítulo 2). Este aumento en la fracción del NS a pH 4,6 no se correspondió con una actividad mayor de la enzima nativa plasmina y con la producción de γ -caseínas, determinada por electroforesis, pero sí se correlacionó con una mayor producción del péptido α_{s1} -I en las muestras provenientes de la elaboración experimental, posiblemente debido a que la disminución de la temperatura de cocción favoreció la acción de la enzima coagulante, tal como se observó en las pseudocujadas modelo (Capítulo 3). En el análisis de las fracciones nitrogenadas, los valores de NS-TCA/NT y los valores de NS-PTA/NT también fueron superiores para la tecnología intervenida que en el control, indicando una mayor proteólisis secundaria. Es importante tener en cuenta que en la intervención tecnológica se trabajó con leche cruda, y de manera similar a la experiencia donde se ensayó la agitación mecánica y el tratamiento térmico en quesos miniatura (Sección 4.2 del Capítulo 2), los quesos elaborados con leche cruda alcanzaron los niveles más altos de proteólisis. Resultados similares han sido informados previamente (Grappin y Beuvier 1997; Bachmann y col., 2011). En efecto, la contribución diferenciada de la microbiota no fermento en la formación de péptidos medianos, pequeños y aminoácidos libres en quesos elaborados con leche cruda versus aquellos productos de leche pasteurizada, se ha señalado como una de las causas para la mayor proteólisis y peptidólisis que suele encontrarse en estos últimos (Albenzio y col., 2001; McSweeney, 2004).

En cuanto a la actividad de plasmina, no se observaron diferencias significativas entre los quesos, y las bandas correspondientes a las γ -caseínas fueron sólo ligeramente más intensas en las muestras control que las experimentales. Aquí vale recalcar que aunque en los quesos experimentales se efectuó el lavado de la cuajada, cuyo efecto positivo sobre la actividad de la enzima se corroboró en las minicujadas modelo del Capítulo 3, la modificación de la microestructura de la red proteica debido a la inclusión de un mayor número de glóbulos grasos en la matriz casearia podría haber modificado tanto las reacciones enzimáticas *in situ*, como la eficacia de la extracción de la enzima para su determinación (Iucci y col., 2008). En este sentido, en varios trabajos se ha indicado que las diferencias en la tecnología de

elaboración influyen en la microestructura de los quesos y en la bioquímica de la maduración de los mismos (Lanciotti y col., 2004; Lopez y col. 2006; Kelly y col., 2008). Por otro lado, la pasteurización efectuada en el queso control tendría un efecto positivo sobre la actividad de la enzima plasmina, ya que se conoce que los inhibidores de los activadores del plasminógeno son termosensibles (Sommers y Kelly 2002); este efecto no podría haberse verificado en el modelo de pseudocujadas, donde toda la leche de elaboración se pasteurizó (Capítulo 3 y Capítulo 1).

En cuanto a la lipólisis, ésta fue más intensa en las muestras provenientes de la elaboración experimental, en las que los niveles de de todos los ácidos grasos fueron mayores a los dos tiempos estudiados. La concentración de ácidos grasos libres totales de los quesos experimentales sextuplicó el valor obtenido en los quesos controles, demostrando la eficacia del tratamiento para incrementar la lipólisis.

El nivel de lipólisis alcanzado por las muestras elaboradas con un paso de homogeneización fue semejante al obtenido para los quesos miniatura homogeneizados (Sección 5.2 del Capítulo 2), mientras que los valores encontrados en los controles fueron significativamente menores a los hallados en dicha experiencia en modelos miniatura. En este sentido, como ya se señaló, se debe tener en cuenta que en el presente caso el control se elaboró con leche pasteurizada, mientras que los quesos miniatura del Capítulo 2 (Sección 5.2) en todos los casos eran elaborados con leche cruda. Por esta razón, parece más pertinente comparar los quesos obtenidos en la experiencia control piloto con los quesos miniatura que recibieron algún tratamiento térmico: en ese caso se verifica que los valores de lipólisis son en efecto semejantes (Sección 4.2 del Capítulo 2). Aunque los valores iniciales no se disponen para esta experiencia, es probable que los quesos experimentales hayan tenido una lipólisis aumentada en los primeros días de maduración, de acuerdo a lo observado en el Capítulo 2 (Sección 5.2), y dado que esa diferencia se mantuvo luego en el tiempo. De manera similar, Choisy y col. (1997) han reportado que un paso de homogeneización en la elaboración de quesos azules provocaba un incremento en los AGLT en los primeros días de maduración cuando se comparaban con quesos controles.

Por otra parte, se observó una disminución en la concentración de todos los ácidos grasos entre los 45 y los 60 días, especialmente en los ácidos grasos medios y cortos. Es importante destacar que dicha disminución en manera alguna implica una disminución neta de AGL con el tiempo de maduración, sino que describe el tramo final de la misma. Para quesos Reggiano obtenidos de la manera tradicional, ya sea en planta piloto o comerciales, otros autores han reportado un incremento de ~600-800 mg/kg en los niveles de lipólisis durante el

período completo de la maduración (Sihufe y col., 2007; Perotti y col., 2008). De manera similar, en los quesos mini de la presente tesis (Sección 4.2 del Capítulo 2) el incremento fue de 900-1000 mg/kg entre 3 y 90 días. En esta experiencia de validación, se observaron solamente dos tiempos, ambos intermedios, entre los cuales se verificó que el nivel de AGL se mantuvo constante o disminuyó ligeramente, según el ácido de que se trate. Esta observación puede deberse a las reacciones catabólicas de formación de aroma, al consumo de los microorganismos o a la beta oxidación (Vannini y col. 2008). La gran diferencia entre el nivel de AGLT y de cada ácidos graso en particular entre quesos controles y experimentales se mantuvo para los dos tiempos de maduración estudiados.

A los 45 y 60 días de maduración se encontró que los quesos experimentales poseían mayor intensidad total de aroma y mayor aroma picante que los quesos controles, y a los 60 días presentaron una mayor intensidad total de sabor, mayor sabor picante, menor sabor ácido y menor sabor lácteo. El sabor picante es una característica deseada para quesos tipo Reggianito ya que realza y forma parte del aroma genuino (Sihufe y col. 2010). Las diferencias halladas en el presente trabajo se condicen claramente con el incremento del nivel de lipólisis, atribuible al paso de homogeneización aplicado y a la ausencia de pasteurización. En efecto, estos atributos sensoriales se relacionan con los productos del catabolismo de los ácidos grasos y con los ácidos grasos libres de cadena corta, que contribuyen directamente al flavour del queso debido a su bajo umbral de percepción (Collins y col. 2003, Deeth y Fitzgerald 2006).

Por otro lado, no hay antecedentes acerca de que el lavado de la cuajada intensifique los atributos sensoriales de quesos. Por el contrario, esta operación se utiliza en quesos frescos y ácidos (por ejemplo en los quesos Cottage) y en quesos daneses tipo Gouda con el objeto de remover el exceso de lactosa y ácido láctico, y estabilizar el pH de la cuajada; lo cual suaviza el sabor de la pasta (Lawrence y col. 1993), mientras que en nuestro ensayo fue diferente, ya que no se eliminó lactosa, porque la solución de lavado contenía una concentración igual a la del suero. En efecto, este paso estuvo dirigido a favorecer la proteólisis mediante la eliminación de inhibidores de la plasmina, y en consecuencia, aumentar el sabor de fondo del queso y, eventualmente, mostrar algún efecto sobre el desarrollo de textura. Como se mencionó previamente, no pudo verificarse una mayor actividad de la enzima plasmina mediante el ensayo específico, mientras que la electroforesis solamente demostró leves cambios sobre la producción de caseínas γ .

Respecto a la textura, a los 45 días los quesos controles resultaron más elásticos que los experimentales, pero a los 60 días la tendencia fue contraria. A este mismo tiempo final de

maduración, los quesos controles fueron más duros que los experimentales. Esta evolución de los atributos de textura indica una diferenciación entre los quesos controles y experimentales: mientras que el control pasaba de una textura más elástica a una más quebradiza como es habitual en quesos duros, el experimental incrementaba su elasticidad y no aumentaba su dureza. Todo ello evidencia que la tecnología de elaboración modificó la microestructura de los quesos, que a su vez determina las propiedades físicas de los mismos (Guinee, 2011).

Varios autores han estudiado el efecto de la homogeneización en las características sensoriales de quesos, generalmente blandos, ya que no existen antecedentes sobre el estudio del efecto de la homogeneización en quesos duros. La tendencia general encontrada es que la homogeneización de los glóbulos grasos modifica el sabor, la apariencia y textura de los quesos. En quesos blandos no se busca un flavour acentuado, por lo que la pasteurización y el corto tiempo de maduración ayudan a que el desarrollo del mismo no sea excesivo (Urdaneta y col. 2004; Madadlou y col. 2007).

Nair y col. (2000) estudiaron el efecto de distintas presiones (0 MPa, 3,5/3,5 MPa, 6,9/3,5 MPa o 10,4/3,5 MPa) de homogeneización aplicadas a una crema de 37% de MG sobre la calidad sensorial de quesos Cheddar. En dicho estudio, los quesos homogeneizados tenían mayor humedad, y un panel entrenado que evaluó el flavour, el cuerpo y la textura de los productos, encontró que a las 4 semanas, el flavour en todos los tratamientos fue similar, pero a las 12 semanas el de los quesos homogeneizados fue mejor calificado que el de los quesos controles. Los jueces no detectaron rancidez asociada a la lipólisis, lo que los autores atribuyeron a que la leche fue pasteurizada justo después de la homogeneización para inactivar la LPL, y hallaron un mejor cuerpo y textura para los quesos homogeneizados lo que interpretó como una consecuencia del mayor número de glóbulos dispersos en la matriz casearia.

Por su parte, Madadlou y col. (2007) estudiaron los efectos de la homogeneización sobre las características sensoriales de quesos blancos iraníes bajos en grasa. Para ello, prepararon la leche de elaboración con crema homogeneizada a 6 y 9 MPa. Se realizaron evaluaciones sensoriales de aceptabilidad en las que se evaluó la textura, flavour, apariencia y aceptabilidad global. Los quesos elaborados con crema homogeneizada tuvieron un mayor puntaje en cuanto a la apariencia y al flavour; los resultados se relacionaron con el incremento de la blancura de la pasta de los quesos y con un mayor contenido de MG retenido en la cuajada, respectivamente. Zamora y col. (2011) y Karaman y Akalin (2013) encontraron resultados similares en quesos frescos libres de fermento y en quesos turcos respectivamente. En efecto, se informaron mejores puntajes de textura y de flavour para los quesos elaborados con leche

homogeneizada lo cual también fue atribuido al mayor número de glóbulos grasos retenidos en la matriz proteica.

Por su parte, la influencia de la proteólisis en las propiedades físicas de los quesos ha sido intensamente estudiada, y en general se le atribuye la causa del ablandamiento de quesos blandos y semiblandos y del desarrollo de textura quebradiza en quesos duros (de Jong, 1978, Visser, 1991, Kindsted y col., 1995; O'Callaghan y Guinee, 2004; Bachmann y col. 2011). Sin embargo, se han planteado interrogantes sobre si la proteólisis es el fenómeno que causa el cambio de textura o si solamente se produce en forma contemporánea con cambios en los equilibrios del calcio en la matriz casearia, que serían los que realmente llevan a las modificaciones de textura (Hynes y col., 1999, O'Mahony y col., 2005, Bertola y col., 2010). De todas maneras, calcio y caseína no pueden separarse al reflexionar acerca de la matriz láctea, ya que son partes de un mismo complejo, y como tal deberían ser analizados conjuntamente.

En nuestro estudio, la mayor proteólisis en las muestras experimentales no es atribuible a la plasmina sino a la acción de la enzima coagulante, que no ha sido objeto de investigación en el presente trabajo, si bien forma parte del proyecto que da marco a la tesis. En efecto, en los quesos experimentales hay una mayor producción del péptido α 1-I, mucho más intensa con respecto al control que los cambios en las caseínas γ , y las modificaciones halladas en la textura de las muestras son compatibles con las que se han informado previamente para dicha hidrólisis (Delacroix-Buchet y Fournier, 1992, Hynes y col., 2000, Gaiaschi y col., 2000).

En cuanto a la apariencia, a los dos tiempos de maduración los quesos experimentales presentaron menor intensidad de color de masa y de borde, lo cual no resulta inesperado debido a que la homogeneización aumenta el número de glóbulos de grasa retenidos en la cuajada, incrementando el número de centros de dispersión de luz (Zamora y col., 2011). Estos resultados se correlacionan con la mayor blancura que también fue observada en la crema homogeneizada (Sección 5.2 del Capítulo 2).

5. Conclusiones

En la presente experiencia se validaron los hallazgos comprobados en los modelos de queso, ya sea cuajadas miniatura, miniquesos y pseudocuajadas. La homogeneización resultó en un incremento de la lipólisis, tal como fue hallado en los quesos miniatura. Para los quesos elaborados en planta piloto, una marcada diferencia en AGL, en las que los quesos experimentales superaron en seis veces a los controles, se mantuvo tanto a 45 como a 60 días. La introducción de una etapa de lavado de la cuajada contribuyó como en el caso de las

pseudocuajadas a un leve incremento de la acción de la plasmina sobre las caseínas, pero esto no fue detectado en el nivel neto final de la enzima sino en la producción de caseínas γ . La disminución de la temperatura de cocción favoreció la hidrólisis de la caseína $\alpha 1$, tal como se vio para las pseudocuajadas y como se ha informado previamente. Los cambios en la proteólisis aparentemente no tuvieron impacto en el flavour ya que las diferencias entre quesos experimentales y controles estarían más ligadas a la hidrólisis de la grasa y productos del metabolismo de los AGL. El impacto de la proteólisis en la textura de los quesos obtenidos mediante la tecnología intervenida es más difícil de conocer ya que, si bien influye sin duda en su menor desarrollo de dureza, está condicionado por la microestructura de la grasa y los equilibrios del calcio en la matriz.

En nuestro trabajo, los quesos duros de pasta cocida tipo Reggianito con tecnología modificada mostraron una maduración acelerada, basada tanto en un incremento en la velocidad de lipólisis como en la velocidad de la hidrólisis de las caseínas, especialmente la $\alpha 1$. No mostraron rancidez, y el flavour genuino y picante se desarrolló más rápido y sin defectos. La textura no siguió la evolución típica de un queso duro de pasta cocida, ya que los quesos experimentales nunca alcanzaron una textura dura y quebradiza, mientras que el control evolucionaba en ese sentido. Es importante advertir que el tiempo de maduración se abrevió tanto debido al avance de la lipólisis en los quesos experimentales (de 180 a 60 días), que no se pudo verificar si más tarde se hubiera desarrollado una textura correcta.

Debido a que a 60 días el flavour de los quesos experimentales ya tiene un perfil completamente adecuado y maduro, existen varias opciones derivadas para la aplicación de esta tecnología. Por ejemplo, puede comercializarse el queso rallado o cortado, y de esa manera, aprovechar el incremento en el flavour sin depender tanto de la formación de la textura, o bien puede encararse el desarrollo de un producto tipo “queso híbrido”. Los quesos híbridos se comercializan en varios países y poseen atributos de familias de queso distintas en un mismo producto, por ejemplo sabor picante y textura semidura.

Conclusiones

El presente trabajo de tesis permitió validar una tecnología innovadora para elaborar quesos duros de pasta cocida tipo Reggianito, que aceleró el proceso de maduración. La tecnología propuesta incluyó el uso de leche cruda, la homogeneización de la fracción grasa de la leche, la disminución de la temperatura de cocción y la incorporación de un paso de lavado de la cuajada.

La aceleración de la maduración se fundamentó en un incremento de las reacciones de lipólisis y proteólisis, lo que derivó en la intensificación del flavour genuino y picante en los primeros meses de maduración, y no condujo a defectos ni aromas o sabores atípicos.

Las modificaciones en la tecnología fueron propuestas sobre la base de información novedosa obtenida en la presente tesis, acerca de la influencia del estado de la materia grasa de la leche y del tratamiento térmico en las reacciones de lipólisis que tienen lugar durante la maduración. En efecto, se comprobó que un incremento en el contacto entre triglicéridos y enzimas lipolíticas favoreció la producción de ácidos grasos libres en tiempos menores a los habituales. Para lograr este efecto, el mejor pre-tratamiento de la leche fue la homogeneización. La ausencia de tratamiento térmico demostró tener gran influencia en la actividad lipolítica presente en el queso. Además, en condiciones que favorecieron la compartimentalización enzima-sustrato y el mantenimiento de la actividad lipolítica, se produjeron cantidades incrementadas de compuestos volátiles derivados de la grasa.

Por otro lado, también se produjo nueva evidencia sobre la influencia del pH al momento de drenar el suero, los tratamientos térmicos de escaldado, y la solubilización de componentes del sistema plasmina-plasminógeno, en la actividad de la plasmina en el queso y en su acción proteolítica. La inclusión de una etapa de lavado de la cuajada en la tecnología propuesta se seleccionó en base a los resultados obtenidos en el modelo de pseudocuajada, donde se observó un incremento en la actividad neta de la enzima plasmina y en la proteólisis asociada al reemplazar el suero por una solución de lactosa. En cuanto al coagulante, en el mismo modelo su acción se favoreció a pH bajos de drenado de suero y con la disminución de la temperatura de cocción, y el lavado no lo modificó significativamente.

Es probable que el incremento en la proteólisis no haya impactado tan fuertemente en el flavour de los quesos como la lipólisis, que se produjo muy tempranamente y correlacionó con el sabor picante; sin embargo, se destaca que no se produjeron defectos atribuibles a la proteólisis, como el incremento del sabor amargo.

La textura de los quesos cuya tecnología fue intervenida no evolucionó hacia una masa dura y quebradiza, en el mismo sentido que los controles, sino que la masa permaneció más elástica y menos dura. Sin embargo, debido a que el tiempo de maduración se acortó de 180

días a 60 días porque el flavour se había intensificado y se había alcanzado un nivel completamente maduro en el queso modificado, es imposible saber si en más tiempo se habría desarrollado una textura adecuada. Aún en el supuesto de que no se alcanzara, existen distintas alternativas para comercializar el queso así obtenido.

Este trabajo de tesis permitió obtener información novedosa acerca de la influencia de la tecnología de elaboración de quesos en la actividad de las enzimas nativas de la leche y la lipólisis y proteólisis asociadas durante la maduración de los quesos duros de pasta cocida, y fue asertivo en cuanto a la aplicación de una innovación tecnológica para acelerar la formación del flavour genuino característico de queso Reggianito.

Bibliografía

Albenzio, M.; Corbo, M.R.; Rehman, S.U.; Fox, P.F.; De Angelis, M.; Corsetti, A.; Sevi, A. y Gobbetti, M. (2001) *Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey*. Int. J. Food Microbiol. 67: 35-48.

Alonso, M.J.; Candiotti, M.C.; Hynes, E. (2005) *Influencia de la composición y la proteólisis en la capacidad de fusión del queso Cremoso Argentino*. X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Mar del Plata, 18 al 20 de mayo de 2005.

Andrews, A.T. (1983) *Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins*. J. Dairy Res. 50: 45-55.

ANMAT (2009). Código Alimentario Argentino. Cap. VIII: Alimentos lácteos. En vigencia. <http://www.anmat.gov.ar/codigoo/caa1.htm>.

Ardö, Y. (2011) *Blue Mold Cheese*. En: *Encyclopedia of Dairy Science, Vol. 1*. (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. F. y McSweeney, P.L.H.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido p. 767-773.

Argov, N.; Lemay, D. y German, B. (2008) *Milk fat globule structure and function: nanoscience comes to milk production*. Trends Food Sci. Technol. 19: 617-623.

Atasoy, A. y Türkoğlu, H. (2008) *Changes of composition and free fatty acid contents of Urfa cheeses (a white-brined Turkish cheese) during ripening: Effects of heat treatments and starter cultures*. Food Chem. 110: 598-604.

Atasoy, A.F. y Türkoğlu H. (2009) *Lipolysis in Urfa cheese produced from raw and pasteurized goats' and cows' milk with mesophilic or thermophilic cultures during ripening*. Food Chem. 115: 71-78.

Awad, S.; Ahmed, N. y El Soda, M. (2010) *Influence of microfiltration and adjunct culture on quality of Domiati cheese*. J. Dairy Sci. 93: 1807-1814.

Bachmann, H.; Fröhlich-Wyder, M-T; Jakob, E.; Roth, E.; Wechsler, D.; Beuvier, E. y Buchin, S. (2011) *Raw Milk Cheeses*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 652-661.

Ballesteros, C.; Poveda, J.M.; González-Viñas, M.A. y Cabezas, L. (2006) *Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses*. Food Control 17: 249-255

Bansal, N.; Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (2007) *Factors Affecting the Retention of Rennet in Cheese Curd*. J. Agric. Food Chem. 55: 9219-9225.

Barrett, F.M.; Kelly, A.L.; McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F. (1999) *Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening*. Int. Dairy J. 9: 421-427.

Barron, L.; Redondo Y.; Aramburu, M.; Gil P.; Perez-Elortondo, F.; Albisu, M.; Najera, A.; Renobales M. de, y Fernandez-Garcia E.. (2007) *Volatile composition and sensory properties of industrially produced Idiazabal cheese*. Int. Dairy J. 17: 1401–1414.

Bastian, E.; Lo, C. y David, K. (1997) *Plasminogen activation in cheese milk: influence on Swiss Cheese ripening*. J. Dairy Sci. 80: 245-251.

Bastian, E.D. y Brown, R.J. (1996) *Plasmin in milk and dairy products: an update*. Int. Dairy J. 6: 435-457.

Battistotti, B. y Corradini, C. (1993) *Italian cheese*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 2*. (Ed.: Fox P. F.) Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, p. 221–244.

Berard, J.; Bianchi, F.; Careri, M.; Chatel, A.; Mangia, A. y Musci, M. (2007) *Characterization of the volatile fraction and of free fatty acids of “Fontina Valle d’Aosta”, a protected designation of origin Italian cheese*. Food Chem. 105: 293-300.

Beresford, T.P. (2003) *Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality*. En: *Dairy processing. Improving quality* (Ed.: Smit, G.) CRC Press, Cambridge, Inglaterra, p. 448-469.

Bernal, S.; Palma, S.; Hynes, E.; Perotti, M.C. (2001) *Determinación de fracciones nitrogenadas para el seguimiento de la maduración de quesos*. Rev. Argent. Lactol. 20: 9-18.

Bertola, N.; Candioti, M. C.; Bevilacqua, A.; Zaritzky, N. y Hynes E. (2010) *Impact of primary proteolysis in texture and meltability of soft cheese*. Sci. Tec. Latt. Cas.61: 279-294.

Beuvier, E. y Buchin, S. (2004) *Raw milk cheeses*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. General Aspects, Vol.1, Third Edition* (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T.M. y Guinee, T.P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 319-345.

Beuvier, E.; Berthaud, K.; Cegarra, S.; Dasen, A.; Pochet, S.; Buchin, S. y Duboz, G. (1997). *Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized and microfiltered milk*. Int. Dairy J. 7: 311-323.

Blakesley, R.W. y Boezi, J.A. (1977) *A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250*. Anal. Biochem. 82: 580-581.

Bouton, Y.; Buchin, S.; Duboz, G.; Pochet, S. y Beuvier, E. (2009) *Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese*. Food Microbiol. 26 (2): 183-191.

Bove, C.G.; De Angelis, M.; Gatti, M.; Calaos, M.; Neviani E. y Gobetti M. (2012). *Metabolic and proteomic adaptation of Lactobacillus rhamnosus strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium*. Proteomics 12: 3206–3218.

Bradley, R. Jr.; Arnold, E.; Barbano, D.; Semerad, R.; Smith, D. y Vines B. (1992) *Chemical and physical methods*. En: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. (Ed: Marshall, R.) American Public Health Association, Washington, DC, p. 433–532.

Brito, C.; Manríquez, X.; Molina, L. y Pinto, M. (2003) *Estudio de Maduración de queso Chanco bajo em Grasa elaborado com leche homogeneizada*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 53: 299-305.

Buchin, S. ; Delague, V. ; Duboz, G. ; Berdague, J. ; Beuvier, E. ; Pochet, S. y Grappin, R. (1998) *Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavour characteristics of a semi hard cheese*. J. Dairy Sci. 81: 3097-3108.

Buffa, M.; Guamis, B.; Pavia, M. y Trujillo, A. (2001) *Lipolysis in cheese made from raw, pasteurised or high-pressure-treated goats' milk*. Int. Dairy J. 11: 175-179.

Caboni, M.F.; Zannoni, M. y Lercker G. (1988) *Lipolisi del grasso del Parmigiano Reggiano*, En: *Atti Giornata di Studio, Consorzio del Formaggio Parmigiano Reggiano*, Reggio Emilia, p. 113–121.

Candioti, M. C.; Hynes, E. R.; Quiberoni, A.; Palma, S. B.; Sabbag, N. y Zalazar, C. A. (2002) *Reggianito Argentino cheese: Influence of Lactobacillus helveticus strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes*. Int. Dairy J. 12:923–931.

Carles, C. y Ribadeau Dumas, B. (1985) *Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine α_{s1} casein. Comparison of the behaviour of this substrate with that of β and κ casein*. FEBS Letters 185: 282-286.

Chianese, L.; Laezza, P.; Ferranti, P.; Caira, S.; Addeo, F. y Malorni, A. (1996) *Oligopeptides in cheese whey*. Bulletin of the IDF 317, 20.

Choi, L.H.; Were, L.M. y Nielsen, S.S. (2006) *Effects of incubation temperature and salt concentration on plasminogen activators in cheese curd*. Int. Dairy J. 16: 609-618.

Choi, Y.J.; Miguez, C.B. y Lee, B.H. (2004) *Characterization and heterologous gene expresión of a novel estearase from Lactobacillus casei CL96*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 3213-3221.

- Choisy, C. ; Desmazeaud, J. ; Gripon, J. ; Lamberet, G. y Lenoir, J. (1997) *La biochimie de l'affinage*. En: *Le Fromage. De la science à l'assurance-qualité*. (Eds.: Eck, A. y Gillis, J.-C.) Lavoisier Tec. & Doc (Pub.) París, Francia , p. 86-152.
- Cogan, T.M. y Hill C. (1993) Cheese Starter Cultures. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 2*. (Ed.: Fox P. F.) Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, p. 193-257.
- Collins, Y.; McSweeney, P. y Wilkinson, M. (2003) *Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge*. Int. Dairy J. 13: 841-866.
- Crow, V.; Curry, B. y Hayes, M. (2001) *The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar*. Int. Dairy J. 11: 275-283.
- Crudden, A. y Kelly, A. (2003) *Studies of plasmin activity in whey*. Int. Dairy J. 13: 987-993.
- De Angelis M. y Gobetti M. (2011) *Pasta-Filata Cheeses: Traditional Pasta-Filata Cheese*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 745-753.
- de Jong, L. (1978) *The influence of the moisture content on the consistency and protein breakdown of cheese*. Neth Milk Dairy J. 32: 1-14.
- Deeth, H. (2005) *Lipoprotein lipase and lipolysis in milk*. Int. Dairy J. 16: 555-562.
- Deeth, H. C. y Fitz-Gerald, C. H. (2006) *Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity*. En: *Advanced Dairy Chemistry. Lipids, Vol. 2*. (Eds: Fox, P. F. y McSweeney, P.L.H.) Springer Science, Nueva York, Estados Unidos, p. 481-556.
- Delacroix-Buchet, A. y Fournier, S. (1992) *Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. II Influence de la chymosine et des conditions de fabrication*. Le Lait 72 : 53-72.
- DeMoraes, J. y Chandan, R.C. (1982) *Factors influencing the production and activity of a Streptococcus thermophilus lipase*. J. Food Sci. 47: 1579-1583.
- Di Cagno, R. y Gobetti, M. (2011) *Hard Italian Cheeses*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 728-736.
- Di Cagno, R.; Quinto, M.; Corsetti, A.; Minervini, F. y Gobetti, M. (2006) *Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system*. Int. Dairy J. 16: 119-130.
- Dupont, D., y Grappin, R. (1998) *ELISA for differential quantitation of plasmin and plasminogen in cheese*. J. Dairy Res. 65: 643-651.

Düsterhöft, E.M.; Engels, W. y van den Berg G. (2011) *Dutch-Type Cheeses* En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 721-727.

El Soda, M. (2003) *Accelerated cheese ripening*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginsky, H.; Fuquay, J. W. y Fox P. F.) Academic Press, Cornwall, Reino Unido, p. 327-328.

El Soda, M. y Awad, S. (2011) *Accelerated cheese ripening*. En *Encyclopedia of Dairy Science. Volume One*. (Eds: Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; McSweeney, P.L.H.) Academic Press, Kidlington, Reino Unido, p. 795-799.

El Soda, M.; Madkor, S. A. y Tong, P. S. (2000) *Adjuncts cultures: recent developments and potential significance to cheese industry. A review*. J. Dairy Sci. 83: 609–619.

Evers, J. M. (2004b) *The milkfat globule membrane—Methodologies for measuring milkfat globule (membrane) damage*. Int. Dairy J. 14: 747–760.

Evers, J.M. (2004a) *The milkfat globule membrane-compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell*. Int. Dairy J. 14: 661-674.

Farkye, N. y Fox, P. (1992) *Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin*. J. Dairy Res. 59: 209-216.

Farkye, N. Y. y Fox, P. F. (1991). *Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in Cheddar cheese: Cheese containing plasmin inhibitor, 6-aminohexanoic acid*. J. Agric. Food Sci. 39:786–788.

Farkye, N. Y.; Madkor, S. A. y Atkins, H. G. (1995) *Proteolytic abilities of some lactic acid bacteria in a model cheese system*. Int. Dairy J. 5:715-725.

Farkye, N.Y. y Fox, P.F. (1990). *Observations on plasmin activity in cheese*. J. Dairy Res. 57: 413-418.

Fernández, V. (2004) *Determinación del nivel de actividad de plasmina en quesos típicos argentinos*. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

FIL-IDF (1982) *Formaggio e formaggio fuso. Determinazione della materia secca. Metodo di riferimento. N° 4:A*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, p. 184-188.

FIL-IDF (1993) *Latte. Determinazione del tenore in azoto. Metodo di riferimento. N° 20:B*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, p. 74-107.

FIL-IDF (1995) *Lait et produits laitiers. Guide de l'échantillonnage. N° 50C*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.

FIL-IDF (1997) *Lait et produits laitiers. Détermination de la teneur en matière grasse. Guide de directives générales appliquées aux méthodes butyrométriques. Norme FIL Internationale 152:A*. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.

Fox, P. F. (2000a) *Chemistry of milk constituents*. En: *Fundamental of Cheese Science*. (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T.M. y Guinee, T.P.) Aspen Publication Inc., Maryland, Estados Unidos de Norteamérica, p.19-43.

Fox, P. F.; Wallace, J. M.; Morgan, S.; Lynch, C. M.; Niland, E. J. y Tobin, J. (1996) *Acceleration of cheese ripening*. *Antonie Leeuwenhoek* 70: 271-297.

Fox, P.F. (2000b) *Bacteriology of cheese milk*. En: *Fundamental of Cheese Science* (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T.M. y Guinee, T.P.) Aspen Publication Inc., Maryland, US, p. 45-53.

Fox, P.F. (2000c) *Overview of cheese manufacture*. En: *Fundamental of Cheese Scienc*. (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T.M. y Guinee, T.P.) Aspen Publication Inc., Maryland, US, p.10-18.

Fox, P.F. (2000d) *Principal families of cheese* En: *Fundamental of Cheese Science* (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.; Cogan, T.M. y Guinee, T.P.) Aspen Publication Inc., Maryland, US, p. 388-522.

Fox, P.F. (2011) *Cheese. Overview*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 534-544.

Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (2004) *Cheese: An Overview*. En: *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Volumen 1 General Aspects*. Third edition (Eds.: Fox, P. F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M. y Guinee, T. P.). Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 1-19.

Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M. y McSweeney, P.L.H. (2000) *Biochemistry of cheese ripening*. En: *Fundamentals of Cheese Ripening* (Eds: Fox, P.F.; Guinee, T.; Cogan, T. y McSweeney, P.L.H.) Aspen Publishers Inc., Estados Unidos de Norteamérica, p. 236-278

Fox, P.F.; Law, J.; McSweeney, P.L.H. y Wallace, J. (1993) *Biochemistry of Cheese Ripening*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1*. (Ed: Fox P. F.). Chapman & Hall, Londres, UK, p. 389-438.

Gagnaire, V.; Carpino, S.; Pediliggieri, C.; Jardin, J.; Lortal, S. y Licitra, G. (2011) *Uncommonly Thorough Hydrolysis of Peptides during Ripening of Ragusano Cheese Revealed by Tandem Mass Spectrometry*. *J. Agric. Food Chem.* 59: 12443-12452.

- Gagnaire, V.; Molle', D.; Herrouin M. y Le'onil J. (2001) *Peptides Identified during Emmental Cheese Ripening: Origin and Proteolytic Systems Involved*. J. Agric. Food Chem. 49: 4402-4413.
- Gaiaschi, A.; Beretta, B.; Polesi, C.; Conti, A.; Giuffrida, M.; Galli, C. y Restani, P. (2000) *Proteolysis of α casein as a marker of Grana Padano cheese ripening*. J. Dairy Sci. 83: 2733-2739.
- Gobbetti, M.; Fox, P.F. y Stepaniak, L. (1997) *Isolation and characterization of a tributyrin esterase from Lactobacillus plantarum 2739*. J. Dairy Sci. 80: 3099-3106.
- Gobbetti, M.; Fox, P.F.; Smacchi, E.; Stepaniak, L. y Damiani, P. (1996) *Purification and characterization of a lipase from Lactobacillus plantarum 2739*. J. Food Biochem. 20: 227-246.
- Gobetti, M. y DiCagno, R. (2003) *Hard Italian Cheeses*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginsky, H., Fuquay, J. W. y Fox, P. F.) Academic Press, Cornwall, Reino Unido, p. 378-385.
- Gómez-Ruiz, J.; Ballesteros, C.; González Vinas, M.; Cabezas, L. y Martínez-Castro, I. (2002) *Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening time*. Le Lait 82: 613-628.
- Grappin, R. y Beuvier, E. (1997) *Review. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese*. Int. Dairy J. 7: 751-761.
- Green, M.L. y Grandison, A.S. (1993) *Secondary (Non-enzymatic) Phase of Rennet Coagulation and Post-Coagulation Phenomena*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1 (Ed.: Fox, P.F.) Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, p. 101-141.
- Gripon, J. C.; Desmazeaud, M. J.; Le Bars, D. y Bergère, J. L. (1975). *Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. – Influence de la présure commerciale*. Lait 55: 502-516.
- Gripon, J-C. (1994) *Enzimas proteolíticas de bacterias lácticas. Propiedades y rol tecnológico*. Revista Argentina de Lactología, 9: 19-29.
- Grufferty, M. y Fox, P. (1988) *Milk alkaline protease*. J. Dairy Res. 55: 609-630.
- Guinee, T. y McSweeney, P. (2006) *Significance of milk fat in cheese*. In: *Advanced Dairy Chemistry. Lipids*, Vol 2, Third Edition. (Eds.: Fox, P.F. y McSweeney, P.) Springer Science, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica p. 377-440.
- Guinee, T.P. (2011) *Cheese Rheology*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 685-698.

Hayaloglu A.A.; Deegan K.C. y McSweeney P.L.H. (2010) *Effect of milk pasteurization and curd scalding, temperature on proteolysis in Malatya, a Halloumi-type cheese*. Dairy Sci. Technol. 90: 99-109.

Hayes, M. y Kelly, A. (2003) *High pressure homogenisation of raw whole bovine milk effects on fat globule size and other properties*. J. Dairy Res. 70: 297-305.

Hayes, M.G.; Fox, P.F. y Kelly, A.L. (2005) *Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk*. J. Dairy Res. 72: 25-33.

Heller, K. J.; Bockelmann, W.; Schrezenmeir, J. y de Vrese, M. (2003) *Cheese and its potential as a probiotic food*. En: *Handbook of fermented functional foods* (Ed.: Farnworth, E. R.) CRC Press, Estados Unidos, p. 203-225.

Hickey, D.K.; Kilcawley, K.N.; Beresford, T.P.; Wilkinson M.G.(2007) *Lipolysis in Cheddar Cheese Made from Raw, Thermized, and Pasteurized Milks*. J. Dairy. Sci. 90 (1) 47-56.

Hinrichs, J. y Kessler, H.G. (1997) *Fat Content of Milk and Cream and Effects on Fat Globule Stability*. J. Food Sci. 62: 992-995.

Holland, R. ; Liu, S.-Q.; Crow, V.L.; Delabre, M.-L.; Lubbers, M.; Bennett, M. y Norris, G. (2005) *Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification*. Int. Dairy J. 15: 711-718.

Hough, G.; Califano, A.; Bertolam N.; Bevilacqua, A.; Martinez, E.; Vega, M. y Zaritzky, N. (1996) *Partial least squares correlations between sensory and instrumental measurements of flavor and texture for Reggianito grating cheese*. Food Qual. Pref. 7 (1): 47-53.

Hough, G.; Martinez, E.; Barbieri, T.; Contarini, A. y Vega, M.J. (1994) *Sensory profiling during ripening of reggianito grating cheese, using both traditional ripening and in plastic wrapping*. Food Qual. Pref. 5: 271-280.

Hunter, E. A.; McNulty, D. A. y Banks, J. M. (1997) *Statistical design and analysis of experiments in cheese technology*. Lebensm. Wiss. U. Technol. 30:121-128.

Huppertz (2011) *High-Pressure Homogenizers*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 2. (Eds.: Fuquay J.W.; Fox P.F. y McSweeney P.L.H.). Academic Press, Londres, Inglaterra, p. 755-760.

Huppertz, T. y Kelly, A.L. (2006) *Physical Chemistry of Milk Fat Globules*. En: *Advanced Dairy Chemistry. Volume 2: Lipids* (Eds.: Fox, P. F. y McSweeney, P.L.H.) 3ra Edición. Springer, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 173-204.

Hynes, E. R.; Aparo, L. y Candiotti, M. C. (2004) *Influence of residual milk-clotting enzyme on α_{s1} casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino cheese*. J. Dairy Sci. 87: 565–573.

Hynes, E.; Candiotti, M.C.; Meinardi, C.; Sabbag, N.; Cattaneo, T. y Zalazar, C.A. (2001a) *Influence of milk clotting enzyme concentration in the α_{s1} hydrolysis during soft cheeses ripening*. J. Dairy Sci. 84: 1335-1340.

Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A. y Zalazar, C.A. (2001b) *Influence of milk-clotting enzyme in proteolysis during ripening of Cremoso Argentino cheese*. Aust. J. Dairy Technol. 56: 208-212.

Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A.; Meinardi, C.A. y Zalazar, C.A. (1999a) *Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheese*. Aust. J. Dairy Technol. 54: 24-27.

Hynes, E.; Ogier, J. C. y Delacroix-Buchet, A. (2000) *Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions*. Int. Dairy J. 10: 733-737.

Hynes, E.R.; Bergamini, C.V.; Suárez, V.B. y Zalazar, C.A. (2003) *Proteolysis on Reggianito Argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus**. J. Dairy Sci. 86: 3831-3840.

Irigoyen, A.; Ortigosa, M.; Juansaras, I.; Oneca, M. y Torre, P. (2007) *Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewe's-milk cheese*. Food Chem. 100: 71-80.

ISO 13299 (2003) *Sensory Analysis. Methodology-General Guidance for establishing a sensory profile*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO-8586-1 (1993) *Sensory Analysis. General Guidance for the selection, training and monitoring of assessors* International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Iucci, L.; Lanciotti, R. y Kelly, A., Huppertz, T. (2008) *Plasmin activity in high-pressure-homogenised bovine milk*. Milchwissenschaft 63 (1): 68-70.

Johnsen, L.; Rasmussen, L.; Petersen, T.; Etzerodt, M. y Fedosov, S. (2000) *Kinetic and structural characterization of a two-domain streptokinase: dissection of domain functionality*. Biochem. 39: 6440-6448.

Johnson, M. E. (2011) *Preparation of cheese milk*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 544-551.

- Karaman, A. D. y Akalın, A. S. (2013) *Improving quality characteristics of reduced and low fat Turkish white cheeses using homogenized cream*. LWT - Food Sci. Technol. 50: 503-510.
- Karami, M.; Ehsani, M.R.; Mousavi, S.M.; Rezaei, K. y Safari, M. (2009) *Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening*. Food Chem. 112: 539-544.
- Kelly, A.; Huppertz, T. y Sheehan, J. (2008) *Pre-treatment of cheese milk: principles and developments*. Dairy Sci. and Technol. 88: 549-572.
- Kelly, A.L. y O'Donnell, H.J. (1998) *Composition, gel properties and microstructure of Quarg as affected by processing parameters and milk quality*. Int. Dairy J. 8: 295-301.
- Kelly, A.L.; O'Flaherty F. y Fox P.F. (2006) *Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge*. Int. Dairy J. 16: 563-572.
- Kindstedt, P.; Yun, J.; Barbano, D. y Larose, K. (1995) *Mozzarella Cheese: impact of coagulant concentration on chemical composition, proteolysis, and functional properties*. J. Dairy Sci. 78: 2591-2592.
- Kok, J. y de Vos, W.M. (1994) *The proteolytic system of lactic acid bacteria*. En: *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Gasson, M.J. y de Vos, W.M.). Blackie Academic & Professional, Glasgow, Nueva Zelanda, p. 169-210.
- Kontkanen, H.; Rokka, S.; Kemppinen, A.; Miettinen, H.; Hellström, J.; Kruus, K.; Marnila, P.; Alatosava, T. y Korhonen, H. (2011) *Enzymatic and physical modification of milk fat: A review*. Int. Dairy J. 21: 3-13.
- Lanciotti, R.; Cháves-López, C.; Patrignani, F.; Paparella, A.; Guerzoni, M.; Serio, A. y Suzzi, G. (2004) *Effects of milk treatment with HPH on microbial populations as well as on the lipolytic and proteolytic profiles of Crescenza cheese*. Int. J. Dairy Technol. 57: 19-25.
- Larsson, M.; Zakora, M.; Dejmek, P. y Ardö, Y. (2006) *Primary proteolysis studied in a cast cheese made from microfiltered milk*. Int. Dairy J. 16: 623-632.
- Law, B.A. (2001) *Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies*. Int. Dairy J. 11: 383-398.
- Lawrence, R. C.; Gilles, J. y Creamer, L. K. (1993) *Cheddar cheese and related dry-salted cheese varieties*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1* (Ed.: Fox, P. F.) Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, p. 1-36.
- Le Bars, D. y Gripon, J.C. (1993) *Hydrolysis of s1-casein by bovine plasmin*. Lait 73: 337-344.

Le Quéré J-L. (2011) *Cheese Flavor*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition, (Eds.: Fuquay, J.W.; Fox, P.F. y McSweeney P.L.H.) Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 675-684.

Le Quéré, J-L y Molimard, P. (2003) *Cheese Flavour*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 330-340.

Liu, S.; Holland, R. y Crow, V. (2004) *Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: A review*. *Int. Dairy J.* 14: 923-945.

Lomholt S.B. y Qvist K.B. (1999) *The formation of cheese curd*. En: *Technology of Cheesemaking* (Ed.: Law, B.A.) Sheffield, Academic Press, Sheffield, England, p. 66-92.

Lopez, C. (2005) *Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products*. *Reprod. Nutrit. Develop.* 45: 497-511.

Lopez, C. y Briard-Bion V. (2007) *The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products*. *Lait* 87: 317-336.

Lopez, C., Camier, B. y Gassi, J.-Y. (2007) *Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy*. *Int. Dairy J.* 17: 235-247.

Lopez, C.; Maillard, M.; Briard-Bion, V.; Camier, B. y Hannon, J.A. (2006) *Lipolysis during Ripening of Emmental Cheese Considering Organization of Fat and Preferential Localization of Bacteria*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5855-5867.

Lucey J.A. (2011) *Curd Syneresis*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 591-595.

MacGibbon, A. y Taylor, M. (2006) *Composition and Structure of Bovine Milk Lipids*. En: *Advanced Dairy Chemistry. Volume 2: Lipids*. (Eds.: Fox, P. F. y McSweeney, P.) Springer, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 1-35.

Madadlou, A.; Mousavi, M.; Khosrowshahi, A.; Emam-Djome, Z. y Zargarán, M. (2007) *Effect of cream homogenization on textural characteristics of low-fat Iranian White cheese*. *Int. Dairy J.* 17: 547-554.

Malacarne, M.; Summer, A.; Franceschi, P.; Formaggioni, P.; Pecorari, M.; Panari, G. y Mariani, P. (2009) *Free fatty acid profile of Parmigiano-Reggiano cheese throughout ripening: Comparison between the inner and outer regions of the wheel*. *Int. Dairy J.* 19: 637-641.

Marilley, L. y Casey, M. (2004) *Flavors of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains*. Int. J. Food Microbiol. 90: 139-159.

McSweeney P.L.H. (2011) *Bioquímica de Cheese Ripening*. En: *Encyclopedia of Dairy Science*, Vol. 1. (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P. F. y McSweeney, P.L.H.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido p. 667-675.

McSweeney P.L.H. y Fox P.F. (1993) *Cheese: Methods of Chemical Analysis*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. (Ed: Fox P.F.). Chapman y Hall, Londres, UK, p: 341-389.

McSweeney, P. y Sousa, M. J. (2000) *Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review*. Le Lait 80: 293-324.

McSweeney, P.L.H. (2004) *Biochemistry of Cheese Ripening: Introduction and Overview*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1. General Aspects*. (Eds.: Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T. M. y Guinee, T.P.) Tercera Edición, Elsevier, California, Estados Unidos de Norteamérica, p. 347-361.

McSweeney, P.L.H. (2011) *Biochemistry of Cheese Ripening*. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox, P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 667-675.

Menéndez, S.; Godínez, R.; Rodríguez-Otero, J. y Centeno, J. (1999) *Fenómenos bioquímicos durante la maduración del queso*. Alimentación, Equipos y Tecnología. Julio/Agosto, 97-105.

Mercanti, D. J.; Buseti, M. R.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (2008) *Studies on a fast method for determining the yield in the production of Argentinean sheep cheeses*. Food Chem. 107: 1117-1723.

Michalski, M.; Camier, B.; Briard, V.; Leconte, N.; Gassi, J.; Goudédranche, H.; Michel F. y Fauquant, J. (2004) *The size of native milk fat globules affects physico-chemical and functional properties of Emmental cheese*. Le Lait 84: 343-358.

Michalski, M.; Camier, B.; Gassi, J.; Briard-Bion, V.; Leconte, N.; Famelart, M. y Lopez, C. (2007) *Functionality of smaller vs control native milk fat globule in Emmental cheeses manufactured with adapted technologies*. Food Res. Int. 40: 191-202.

Michalski, M.; Gassi, J.; Famelart, M.; Leconte, N.; Camier, B.; Michel, F. y Briard, V. (2003) *The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties of Camembert cheese*. Le Lait 83: 131-143.

Mikelson, A. y Ciprova, I. *The study of attenuated starters in Holandes cheese ripening*. 6th Baltic Conference on Food Science and Technology: Innovations for Food

Science and Production (FOODBALT) Conference Proceedings. Jelgava, Letonia, 5 al 6 de mayo de 2011, p. 148.

Milesi, M. M.; Candiotti, M. y Hynes E. (2007) *Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening*. LWT- Food Sci. Technol. 40: 1427-1433.

Milesi, M.; Bergamini, C. y Hynes E. (2011) *Production of peptides and free amino acids in a sterile extract describes peptidolysis in hard-cooked cheeses*. Food Res. Int. 44: 765-773.

Milesi, M.; McSweeney, P. L. H. y Hynes E. (2008) *Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of Lactobacillus plantarum in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type*. J. Appl. Microbiol. 105: 884-892.

Milesi, M.; Vinderola G.; Sabbag, N.; Meinardi, C.A. y Hynes, E.R. (2009) *Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential*. Food Res. Int. 42 (8): 1186-1196.

Mistry V.V. y Maubois J.L. (1993) *Aplication of Membrane Separation Technology to Cheese Production*. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Eds.: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T. y Guinee, T.) Elsevier Ltd., Londres, Reino Unido, p. 493-523.

Mistry, V. (2001) *Low fat cheese technology*. Int. Dairy J. 11: 413-422.

Molimard, P. y Spinnler. H.E. (1996) *Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties*. J. Dairy Sci. 79: 169-184.

Monnet, V. y Gripon, J-C. (1997) *Proteolytic system of lactic acid bacteria properties and practical implications*. Tecnología Láctea Latinoamericana, 8: 49-56.

Morales, P.; Calzada, J.; Fernández-García, E. y Núñez, M. (2006) *Free fatty acids in model cheeses made with a Micrococcus sp. INIA 528 milk culture or with a high enzymatic activity curd of this strain*. Int. Dairy J. 16: 784-787.

Muehlenkamp-Ulate, M. y Warthesen, J. (1999) *Evaluation of several nonstarter lactobacilli for their influence on Cheddar cheese slurry proteolysis*. J. Dairy. Sci. 82:1370-1378.

Muir, D. y Banks, J. (2003) *Factors affecting the shelf-life of milk and milk products*. En: *Dairy processing. Improving quality*. (Ed.: Smit, G) CRC Press, Cambridge, Reino Unido, p 185-207.

Nair, M. G.; Mistry, V. y Oommen, B. (2000) *Yield and functionality of Cheddar cheese as influenced by homogenization of cream*. Int. Dairy J. 10: 647-657.

Neviani, E.; De Dea Lindner, J.; Bernini, V. y Gatti, M. (2009) *Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium*. Food Microbiol. 26: 240–245.

Noomen, A. (1978) *Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type)*. 2. *Activity of calf rennet*. Neth Milk Dairy J. 32: 49–68.

O’Callaghan, D. y Guinee, T. (2004) *Rheology and Texture of Cheese*. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Eds.: Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. y Guinee, T.) Elsevier Ltd., Londres, Reino Unido., p. 511-541.

O’Farrel, I.; Sheehan, J.; Wilkinson, M.; Harrington, D.; Kelly, A. (2002) *Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear cheese*. Lait, 82: 305-316.

O’Mahony, J. A.; Lucey, J. A. y McSweeney, P. L. H. (2005) *Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization and texture development during the ripening of Cheddar cheese*. J. Dairy Sci. 88: 3101-3114.

Oliszewski, R.; Medina, R.B.; Gonzalez, S.N. y Perez Chaia, A.B. (2007) *Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from Argentinean goats’ milk and cheeses*. Food Chem. 101: 1446-1450.

O’Mahony, J.A.; Auty, M. y McSweeney, P.L.H. (2006) *The manufacture of miniature Cheddar-type cheeses from milks with different fat globule size distributions*. Le Lait 86 (1): 59-72

Ortigosa, M.; Torre, P. y Izco, J.M. (2001) *Effect of pasteurization of ewe’s milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of Roncal cheese*. J. Dairy Sci. 84: 1320-1330.

Ozen, B.; Hayes, K. y Mauer, L. (2003) *Measurement of plasminogen concentration and differentiation of plasmin and plasminogen using Fourier-transform infrared spectroscopy*. I. Dairy J. 13: 441-446.

Perotti, M. C.; Bernal, S. M.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (2005) *Free fatty acids profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters*. Int. Dairy J. 15: 1150-1155.

Perotti, M.C.; Bernal, S.M.; Meinardi, C.A.; Candiotti, M.C. y Zalazar, C.A. (2004) *Substitution of natural whey starter by mixed strains of Lactobacillus helveticus in the production of Reggianito Argentino cheese*. Int. J. Dairy Technol. 57: 45-51.

- Perotti, M.C.; Bemal, S.; Wolf, V. y Zalazar, C.A. (2008) *Perfil de ácidos grasos libres y características sensoriales de quesos reggianito elaborados con diferentes fermentos*. *Grasas y Aceites* 59 (2): 152-159.
- Pinna, G.; Pirisi, A.; Piredda, G.; Addis, M. y Di Salvo, R. (1999) *Effect of milk thermisation on PDO Fiore Sardo cheese: 2. The lipolysis progress during ripening*. *Sci. Tec. Latt. Cas.* 50: 366–377.
- Powell, I.B.; Broome, M.C. y Simsowtin, G.K.Y. (2011) *Starter Cultures: General Aspects*. En: *Encyclopedia of Dairy Science*, Vol. 1. (Eds.: Fuquay, J.; Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 552-559.
- Qian, M. y Reineccius, G. (2003) *Static headspace and aroma extract dilution analysis of Parmigiano Reggiano cheese*. *J. Food Sci.* 68: 794-798.
- Quiberoni, A.; Guglielmotti, D. y Reinheimer, J. (2005) *Nuevas y clásicas bacterias causantes de defectos gasógenos en quesos blandos*. *Rev. Argent. Lactol.* 23:19-32.
- Ramonda, M.B. (2009) *Desarrollo de un modelo basado en métodos estadísticos para la predicción del tiempo de maduración de Quesos Argentinos*. Tesis de Doctorado en Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Rampilli, M. y Raja, V. (1998) *Osservazioni sull'attività di plasmina e plasminogeno nel formaggio*. *Sci. Tec. Latt. Cas.* 49 (6): 341-350.
- Reinheimer, J.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A. y Suárez, V. (1996) *The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina on hard cheese production*. *Int. Dairy J.* 6: 869-879.
- Reinheimer, J.; Suárez, V.; Bailo, N. y Zalazar, C.A. (1995) *Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinean hard cheese production*. *J. Food Prot.* 54: 796-799.
- Richardson, B. C. y Pearce, K. N. (1981) *The determination of plasmin in dairy products*. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 16: 209-220.
- Rippel, K.; Nielsen, S.; Hayes, K. (2004) *Effects of native and denatured whey proteins of plasminogen activator activity*. *J. Dairy Sci.* 87, 2344-2350.
- Savijoki, K.; Ingmer, H. y Varmanen, P. (2006) *Proteolytic systems of lactic acid bacteria*. *Appl. Microbiolog. Biotechnol.* 71: 394-406.
- Shakeel-Ur-Rehman; Banks, J. M.; Brechany, E. Y.; Muir, D. D.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2000) *Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk*. *Int. Dairy J.* 10: 55-65.

Shakeel-Ur-Rehman; Feeney, E. P.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1998a). *Inhibition of residual coagulant in cheese using pepstatin*. Int. Dairy J. 8: 987-992.

Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Madkor, S. y Farkye, N. (2001) *Alternatives to pilot plan experiments in cheese-ripening studies*. Int. J. Dairy Technol. 54: 121-126.

Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1998b) *Protocol for the manufacture of miniature cheeses*. Le Lait 78: 607-620.

Sheehan, J.J.; Oliveira J.C.; Kelly A.L. y McSweeney P.L.H. (2007) *Effect of cook temperature on primary proteolysis and predicted residual chymosin activity of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures*. Int. Dairy J. 17: 826-834.

Sihufe, G. A.; Zorrilla, S. E.; Mercanti, D.J.; Perotti, M.C.; Zalazar, C.A. y Rubiolo, A.C (2007) *The influence of ripening temperature and sampling site on the lipolysis in Reggianito Argentino cheese*. Food Res. Int. 40: 1220–1226.

Sihufe, G. ; Zorrilla, S. ; Sabbag, N. ; Costa, S. y Rubiolo, A. (2010) *The influence of ripening temperature on the sensory characteristics of Reggianito Argentino cheese*. J. Sens. Stud. 25: 94–107.

Skeie, S. and Ardö, Y. (2000) *Influence from raw milk flora on cheese ripening studied by different treatments of milk to model cheese*. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 33: 499-505.

Smit, G.; Braber, A.; Van Spronsen, W.; Van Den Berg, G. y Exterkate, F. A. (1995) *Cheasy model: a cheese-based model to study cheese ripening*. En: *Bioflavour 95* (Eds.: Étiévant, P. y Schreier, P.) INRA, Paris, Francia, p. 185-190.

Smit, G.; Smit, B.A. y Engels, W.J.M. (2005) *Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products*. FEMS Microbiol. Rev. 29: 591-610.

Sommers, J. y Kelly, A. (2002) *Contribution of plasmin to primary proteolysis during ripening of cheese: effect of milk heat treatment and cheese cooking temperature*. Le Lait 82: 181-191.

Sommers, J.; Guinee, T. y Kelly, A. (2002) *The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of Mozzarella-type cheese*. Int. J. Dairy Technol. 55: 5-11.

Sousa, M.J.; Ardö, Y. y McSweeney, P.H.L. (2001) *Advances in the study of proteolysis during cheese ripening*. Int. Dairy J. 11: 327-345.

- Steele, J.L. (1998) *Genetics and metabolism of starter cultures*. In: *Applied Dairy Microbiology* (Eds.: Marth, E.H. y Steele, J.L.) Marcel Dekker, Inc.; Nueva York, Estados Unidos, p. 173-193.
- Steffen, C.; Eberhard, P.; Bosset, J.O. y Rüeegg, M. (1993) *Swiss-Type Varieties*. En: *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1 General Aspects*. (Ed: Fox, P.F.) Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, p. 83-111.
- Stepaniak, L. y Rukke, E.O. (2003) *Thermization of milk*. En: *Encyclopedia of Dairy Science*, Vol.4 (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, p. 2619-2623.
- Svensson, I.; Hernández, I.; Virto, M. y De Renobales, M. (2006) *Determination of lipase activity in cheese using trivalerin as substrate*. *Int. Dairy J.* 16 (5): 423-430.
- Thierry, A. y Hannon, J. (2011) *Cheese Flavour: Formation and Analysis*. Cheese Symposium. Moorepark, Fermoy, Co. Cork. 28 y 29 September 2011.
- Trujillo, A.; Royo, C.; Ferragut, V. y Guamis, B. (1999) *Ripening profiles of goat cheese produced from milk treated with high pressure*. *J. Food Sci.* 64 (55): 833-837.
- Türkoğlu H. (2011) *Free fatty acid composition and sensory characteristics of Örgü cheese*. *Sci. Res. Essays* 6 (7): 1555–1560.
- Upadhyay, V.; McSweeney, P.L.H.; Magboul, A. y Fox, P.F. (2004b) *Proteolysis in cheese during ripening*. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Eds.: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T. y Guinee, T.) Elsevier Ltd., Reino Unido, p. 393-396.
- Upadhyay, V.; Sousa, M.J.; Ravn, P.; Israelsen, H.; Kelly, A. y McSweeney, P.L.H. (2004a) *Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening*. *Lait* 84: 527-538.
- Urbach, G. (1995) *Contribution of lactic acid bacteria to flavor compounds formation in dairy products*. *Int. Dairy J.* 5: 877-903.
- Urbach, G. (1995) *Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products*. *Int. Dairy J.* 5: 877-903.
- Urdaneta, R.; Borregales, C.; Bullón, J. y Cárdenas, A. (2004) *Effect of milk homogenization in yield and properties on soft ripening cheese*. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia* 27 (2): 75-82.
- Vannini, L.; Patrignani, F.; Iucci, L.; Ndagijimana, M.; Vallicelli, M.; Lanciotti, R. y Guerzoni, M. E. (2008) *Effect of a pre-treatment of milk with high pressure homogenization on yield as well as on microbiological, lipolytic and proteolytic patterns of "Pecorino" cheese*. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 329–335.

Vélez, M.A.; Bergamini, C.V.; Ramonda, M.B.; Candiotti, M.C. y Perotti, M.C. (2012) *Impacto de la tecnología de elaboración de quesos en la actividad de enzimas no microbianas*. II Simposio Argentino de Lactología. Santa Fe, Argentina, 16 al 17 de agosto de 2012, p.62

Vélez, M.A.; Perotti, M.C.; Hynes, E.R.; Meinardi, C.A. y Zalazar, C.A. *Actividad del sistema plasmina/plasminógeno durante la maduración de quesos*. Congreso Argentino de Química. Lanús, Buenos Aires. 12 al 14 de setiembre de 2010.

Veloso de Paula, A.; Morais Nunes, G.F.; Silva, J., Ferreira de Castro, H. y dos Santos J.C. (2010) *Screening of Food Grade Lipases to be Used in Esterification and Interesterification Reactions of Industrial Interest*. Applied Biochemistry and Biotechnology 160: 1146-1156.

Visser, J. (1991) *Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semihard cheese*. IDF Bulletin 268: 49-61.

Visser, S. (1993) *Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview*. J. Dairy Sci. 76: 329-350.

Voigt, D. D.; Chevalier, F.; Donaghy, J.A.; Patterson, M.F.; Qian, M. C. y Kelly, A.L. (2012) *Effect of high-pressure treatment of milk for cheese manufacture on proteolysis, lipolysis, texture and functionality of Cheddar cheese during ripening*. Innov. Food Sci. Emerg. Tech. 13: 23-30.

Voigt, D.D.; Patterson, M.F.; Linton, M. y Kelly, A.L. (2011) *Effect of high-pressure treatment of milk prior to manufacture on ripening of Camembert cheese*. Innovative Food Science and Emerging Technologies 12: 1-5.

Walsh, M. K. y Xiaoshan, Li (2000) *Thermal stability of acid proteinases*. J. Dairy Res. 67: 637-640.

Walstra, P.; Geurts, T. J.; Noomen, A.; Jellema, A. y van Boekel, M. A. (1999d) *Colloidal particles of milk*. En: *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes* (Eds: Fennema, O.R.; Karel, M.; Sanderson, G.W.; Tannenbaum, S.R.; Walstra, P. y Whitaker J.R.) Marcel Dekker Inc., Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 107-149.

Walstra, P.; Geurts, T. J.; Noomen, A.; Jellema, A. y van Boekel, M.A. (1999b) *Process steps*. En: *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes* (Eds: Fennema, O.R.; Karel, M.; Sanderson, G.W.; Tannenbaum, S.R.; Walstra, P. y Whitaker J.R.) Marcel Dekker Inc., Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 555-600.

Walstra, P.; Geurts, T. J.; Noomen, A.; Jellema, A. y van Boekel, M. A. (1999a) *Cheese ripening and Properties*. En: *Dairy Technology. Principles of Milk Properties and Processes*

(Eds.: Fennema, O.R.; Karel, M.; Sanderson, G.W.; Tannenbaum, S.R.; Walstra, P. y Whitaker, J.R.) Marcel Dekker Inc., Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 601-636.

Walstra, P.; Geurts, T. J.; Noomen, A.; Jellema, A. y van Boekel, M. A. (1999c) *Homogenization*. En: *Dairy Technology. Principles of Milk Properties and Processes* (Eds.: Fennema, O.R.; Karel, M.; Sanderson, G.W.; Tannenbaum, S.R.; Walstra, P. y Whitaker, J.R.) Marcel Dekker Inc., Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 245-264.

Watkinson, P.; Coker, C.; Crawford, R.; Dodds, C.; Johnston, K.; McKenna, A. y White, N. (2001) *Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis*. *Int. Dairy J.* 11: 455-464.

Werner, H.; Nielsen, E.; Ardo, Y.; Rage, A. y Antila, V. (1993) *North European varieties of cheese*. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.. Volume 2* (Ed.: Fox, P. F.) Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, p. 245-262.

Wiking, L.; Björck, L. y Nielsen, J.H. (2003). *The influence of feed on stability of fat globules during pumping of raw milk*. *Int. Dairy J.* 13: 799-803

Wilbey, R.A. (2011) *Principles and Mechanism of Homogenization, Effects and Assessment of Efficiency: Valv Homogenizers*. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 2 (Eds: Fuquay J.W.; Fox P.F. y McSweeney P.L.H.). Academic Press, Londres, Inglaterra, p. 750-755.

Williams A.G.; Noble, J. y Banks J.M. (2001) *Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese*. *Int. Dairy J.* 11: 203-215.

Williams, A.G.; Felipe, X. y Banks, J.M. (1998) *Amino peptidase and dipeptidyl peptidase activity of Lactobacillus spp. and non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese*. *Int. Dairy J.* 8: 255-266.

Wolf, I.V.; Perotti, M.C.; Bernal, S.M. y Zalazar, C.A. (2010) *Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese*. *Food Res. Int.* 43: 1204-1211.

Yu, L., Ngadi, M. y Raghavan, V. (2012) *Proteolysis of Cheese Slurry Made from Pulsed Electric Field-Treated Milk*. *Food Bioprocess Tech.* 5: 47-54.

Yvon, M. y Rijnen, L. (2001) *Cheese flavour formation by amino acid catabolism*. *Int. Dairy J.* 11: 185-201.

Zalazar, C. A.; Meinardi, C. A. y Hynes, E. R. (1999) *Los quesos argentinos*. En: *Quesos típicos argentinos. Una revisión general sobre producción y características* (Eds.: Zalazar,

C.A.; Meinardi. C. A. y Hynes. E. R.). Centro de Publicaciones. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, p.20-49

Zamora, A.; Ferragut, V.; Jaramillo, P.; Guamis, B. y Trujillo, A. (2007) *Effects of ultra-high pressure homogenization on the cheese-making properties of milk*. J. Dairy Sci. 90: 13-23.

Zamora, A.; Ferragut, V.; Juan, B.; Guamis, B. y Trujillo, A. (2011) *Effect of ultra-high pressure homogenisation of milk on the texture and water-typology of a starter-free fresh cheese*. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 12: 484–490.

Zamora, A.; Ferragut, V.; Guamis, B. y Trujillo, A. (2012) *Changes in the surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenisation and conventional treatments of milk*. Food Hydrocol. 29 (1): 135-143.

Zannoni, M. y Nanni, M. (1982) *Indagine sull'affioramento del grasso in caseificio*. Sci. Tec. Latt. Cas. 33: 493-509.

Zannoni, M.; Nanni, M. y Mora, R. (1984) *Influenza di diverse modalita di affioramento sulle caratteristiche casearie del latte e sul formaggio Parmigiano-Reggiano ottenuto*. Sci. Tec. Latt. Cas. 35: 541-556.