

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del grado Académico de Doctor en Química

**Congelación de quesos por inmersión en
soluciones acuosas concentradas**

Bioq. Gustavo Gabriel Ribero

Instituto de Desarrollo Tecnológico
para la Industria Química

I N T E C



Director de tesis: Dra. Susana E. Zorrilla
Codirector de tesis: Dra. Amelia C. Rubiolo

Miembros del jurado: Dra. Noemí Zarithzky
Dra. Lía Gerschenson
Ing. Carlos Zalazar

Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a las Dras. Susana Zorrilla y Amelia Rubiolo, por la dirección de mi Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la ayuda financiera otorgada para el desarrollo de la Tesis y al INTEC, por brindarme el espacio donde llevar adelante este trabajo.

A todos los integrantes del Grupo de Ingeniería de los Alimentos y Biotecnología del INTEC.

A Sancor Cooperativas Unidas Ltda., por haber proporcionado las muestras para el presente estudio.

A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado y los valiosos aportes durante la evaluación de la Tesis.

A mis padres, que con sacrificio y muchas veces dejando de lado necesidades personales, posibilitaron la realización de mis estudios. A Erika y mi abuela Coca, por estar siempre a mi lado en forma incondicional. A toda mi familia porque siempre me alentó.

Resumen

La congelación de quesos ha sido usada para prolongar su vida útil y extender su comercialización a lugares distantes. En Argentina, la elaboración de quesos constituye uno de los principales destinos de la leche. Los quesos blandos representan el segmento de mayor dinamismo e innovación tecnológica.

En el caso de queso Mozzarella, su congelación por inmersión en soluciones de NaCl podría ser una alternativa interesante para disminuir el efecto de la congelación sobre la calidad final del queso y para disminuir el tiempo de procesamiento ya que los procesos de salado y congelación ocurren simultáneamente. El objetivo principal de esta Tesis fue evaluar el efecto de la congelación por inmersión y del almacenamiento de las muestras congeladas sobre las principales propiedades fisicoquímicas, bioquímicas, reológicas y estructurales de queso Mozzarella.

Placas de queso (dimensiones: $2 \times 10 \times 10 \text{ cm}^3$, humedad: $50.2 \pm 0.3\%$, grasa: $19.7 \pm 0.4\%$, proteína total: $22 \pm 2\%$, proteína soluble: $0.57 \pm 0.06\%$, cloruro: $0.072 \pm 0.002\%$) fueron sumergidas en soluciones de NaCl 23% p/p (muestras control: 4°C , 90 min; muestras congeladas y muestras almacenadas: -15°C , 180 min). Las muestras congeladas se descongelaron a 4°C inmediatamente luego de finalizada la congelación. Las muestras almacenadas congeladas fueron mantenidas a -20°C durante 2 meses y luego se descongelaron a 4°C . Todas las muestras fueron envasadas al vacío y almacenadas a 4°C para su maduración. Se retiraron 3 muestras de cada tratamiento a los 1, 7, 14, 20, 27, 34 y 41 días de maduración. Se determinaron los contenidos de cloruro, humedad, proteínas totales y soluble, y pH.

La evaluación de la proteólisis se realizó por análisis del contenido de nitrógeno y por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) de la fracción soluble en agua a pH 4.6, y por electroforesis vertical con gel de poliacrilamida

(urea-PAGE). Los ensayos reológicos se realizaron en modo oscilatorio (geometría plato-plato, diámetro: 20 mm, gap: 1 mm, frecuencia: 1 Hz), mediante barridos de amplitud de deformación ($0.001 \leq \gamma_0 \leq 0.1$) a 20, 40 y 60°C, y barridos de temperatura de 20 a 65°C dentro de la región de viscoelasticidad lineal ($1.33^\circ\text{C min}^{-1}$, $\gamma_0=0.005$). La evaluación de la microestructura se realizó por microscopía electrónica de barrido a 1, 14 y 41 días de maduración. Se usaron bastones de $20 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ obtenidos de la zona central de las placas.

Se observó que las muestras control presentaron una mayor deshidratación ($47.7 \pm 0.7\%$) que las muestras congeladas ($49.3 \pm 0.4\%$) y que las muestras almacenadas congeladas ($49.3 \pm 0.5\%$). El índice de maduración promedio de las muestras aumentó aproximadamente desde 2.8% hasta 7.3%. No se observaron diferencias en el comportamiento de las fracciones electroforéticas estudiadas por efecto de los tratamientos estudiados. Del análisis de RP-HPLC se seleccionaron 12 picos. Del análisis por componentes principales de los picos seleccionados, se relacionó al PC1 (70.0%) con el tiempo de maduración y al PC2 (7.4%) con el tratamiento estudiado. Se observaron pequeñas diferencias en las áreas cromatográficas de algunos picos de las muestras almacenadas congeladas a partir de los 20 días de maduración.

Mediante los ensayos reológicos, se observaron algunas diferencias por efecto de los tratamientos estudiados en las temperaturas de cruce de los módulos de almacenamiento y pérdida al comienzo de la maduración; y en la energía de activación, asociada a una dependencia tipo Arrhenius de la viscosidad compleja, hacia el final de la maduración. Mediante el análisis cualitativo de las micrografías, se observó que la microestructura del queso Mozzarella no fue marcadamente afectada por la congelación o por el almacenamiento de las muestras congeladas.

Si bien la congelación por inmersión afectó estadísticamente algunos de los parámetros estudiados, las diferencias observadas son pequeñas, por lo que se considera que el proceso de congelación por inmersión podría ser muy útil para la elaboración y conservación del queso Mozzarella.

Índice

RESUMEN	IV
ÍNDICE	VIII
CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. QUESO	2
1.1.1. <i>Definición</i>	2
1.1.2. <i>Clasificación (CAA, 2006)</i>	2
1.1.3. <i>Comercialización (SAGPyA, 2006)</i>	2
1.2. QUESO MOZZARELLA	3
1.3. ELABORACIÓN DEL QUESO MOZZARELLA.....	4
1.3.1. <i>Preparación de la leche</i>	4
1.3.2. <i>Tratamiento térmico de la leche</i>	4
1.3.3. <i>Acidificación</i>	7
1.3.4. <i>Coagulación</i>	9
1.3.5. <i>Cocción</i>	10
1.3.6. <i>Hilado y moldeo</i>	10
1.3.7. <i>Salado</i>	12
1.3.8. <i>Maduración</i>	12
1.4. PROPIEDADES DEL QUESO MOZZARELLA.....	16
1.4.1. <i>Propiedades funcionales</i>	16
1.4.2. <i>Propiedades reológicas</i>	17
1.4.3. <i>Propiedades microestructurales</i>	19
1.5. CONGELACIÓN DE QUESO MOZZARELLA.....	20
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	25
CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. QUESOS	29
3.2. MUESTRAS	30
3.3. SOLUCIONES DE INMERSIÓN	30
3.4. TRATAMIENTOS.....	30
3.5. ENSAYOS FÍSICOQUÍMICOS	33
3.6. SEGUIMIENTO DE LA PROTEÓLISIS.....	35
3.7. ENSAYOS REOLÓGICOS	37
3.8. ENSAYO DE MICROSCOPIA	38
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
3.9.1. <i>Análisis de la variancia</i>	39
3.9.2. <i>Análisis multivariado</i>	39
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1. ENSAYOS FÍSICOQUÍMICOS	42
4.2. SEGUIMIENTO DE LA PROTEÓLISIS.....	47
4.3. ENSAYOS REOLÓGICOS	62
4.4. ENSAYO DE MICROSCOPIA	73
CAPÍTULO 5 - CONCLUSIONES.....	78
ANEXO A - PRINCIPALES VARIABLES DE OPERACIÓN QUE AFECTAN LA CONGELACIÓN DE QUESOS MOZZARELLA POR INMERSIÓN	81
A.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
A.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83

A.3. CONCLUSIONES	90
ANEXO B - PUNTO INICIAL DE CONGELACIÓN DE QUESO MOZZARELLA....	91
B.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	92
B.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
B.3. CONCLUSIONES	100
ANEXO C - MODELO MATEMÁTICO PARA LA CONGELACIÓN POR INMERSIÓN DE QUESO MOZZARELLA	102
C.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
C.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	110
C.3. CONCLUSIÓN	114
ANEXO D - VALORES DE LAS DETERMINACIONES INDIVIDUALES CORRESPONDIENTES A LOS ANÁLISIS REALIZADOS EN EL DISEÑO EXPERIMENTAL PRINCIPAL.....	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Queso

El queso es el nombre genérico para un grupo de alimentos basados en la fermentación de la leche producidos en al menos 500 variedades alrededor del mundo. Desde sus comienzos, simplemente como una forma de conservar los constituyentes de la leche, el queso ha evolucionado hasta llegar a ser un alimento de la alta cocina con cualidades epicúreas, así como altamente nutritivo (Fox, 1987).

1.1.1. Definición

De acuerdo con el Código Alimentario Argentino (CAA, 2006) "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 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 especies y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes".

1.1.2. Clasificación (CAA, 2006)

De acuerdo al contenido en materia grasa del extracto seco en porcentaje, los quesos se clasifican en: doble crema (no menos del 60%), grasos (entre 45.0 y 59.9%), semigrasos (entre 25.0 y 44.9%), magros (entre 10.0 y 24.9%) y descremados (menos de 10.0%).

De acuerdo al contenido de humedad en porcentaje, los quesos se clasifican en: quesos de baja humedad o de pasta dura (humedad hasta 35.9%), quesos de mediana humedad o de pasta semidura (humedad entre 36.0% y 45.9%), quesos de alta humedad o de pasta blanda (humedad entre 46.0 y 54.9%) y quesos de muy alta humedad o de pasta muy blanda (humedad no menor a 55.0%).

1.1.3. Comercialización (SAGPyA, 2006)

En nuestro país, de acuerdo a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA, 2006) los quesos constituyen, en términos de volumen, el principal destino de la leche procesada por la industria, con el 39.4% en 2004. El

crecimiento de la elaboración de quesos verificado en el 2004 fue impulsado principalmente por la demanda interna. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en el 2004 Argentina fue el 9° país productor mundial de quesos.

La participación de nuestro país en las exportaciones mundiales de quesos creció en la última década, pasando desde el 0.4% en promedio para el trienio 1993-1995 hasta alrededor del 0.7% en promedio para 2001-2003. Los quesos argentinos llegaron en 2004 a 48 destinos en todo el mundo. Los quesos han sido en la última década, y son en la actualidad, el segundo producto de exportación detrás de la leche en polvo. En 2004, representaron el 13% en volumen y el 16% en valor de las colocaciones externas totales.

En 2004, los tres principales destinos (Estados Unidos, México y Rusia) representaron entre el 59-62% de las ventas (según se consideren volumen o monto), mientras que 12 países representaron individualmente compras superiores al 1% del volumen total. Los subtipos colocados difieren según el destino: mientras que Estados Unidos compra principalmente quesos duros (87% de sus importaciones desde nuestro país corresponden a esta pasta), México y Rusia importan casi exclusivamente quesos semiduros (en proporciones del 93 y 94%, respectivamente). Entre 1995 y 2000 inclusive, Brasil fue el destino más importante. Desde 2001 y hasta la actualidad el liderazgo en importación corresponde a Estados Unidos.

1.2. Queso Mozzarella

Según el Código Alimentario Argentino (CAA, 2006), el queso Mozzarella es un queso de mediana, alta o muy alta humedad y extra graso, graso a semigraso, con un contenido máximo de 60% de humedad y un mínimo de 35% de materia grasa en extracto seco. La pasta es de color blanco a amarillento, uniforme; no posee ojos, eventualmente puede presentar ojos mecánicos (aberturas irregulares); no posee corteza; y su textura es fibrosa, elástica y cerrada. El sabor es láctico, poco desarrollado a ligeramente picante según el contenido de humedad, materia grasa y grado de maduración; y el olor es láctico poco perceptible. El peso y la forma son variables.

El queso Mozzarella Argentino tiene sus orígenes en Italia, más precisamente en las regiones de Lazio, Campania y Puglia, donde el queso Mozzarella elaborado

con leche de búfala es muy conocido. Pertenece a los quesos de pasta hilada, cuya masa es estirada utilizando un medio caliente (agua o vapor) con el propósito de obtener un producto elástico y extensible. Los inmigrantes italianos en Argentina introdujeron la metodología de “hilar” la masa en forma manual, siendo reemplazada gradualmente por mezcladoras o hiladoras automáticas. El hilado en caliente permite que este queso adopte una gran diversidad de formas y tamaños. Así surgieron los bocconcinos, pulpetas, trenzas y moños, todos con diferentes usos gastronómicos: preparación de pizza, tablas de queso, rellenos de pastas, etc. En la actualidad, el queso Mozzarella Argentino es uno de los quesos más exportado de nuestro país y se elabora principalmente en la región pampeana.

1.3. Elaboración del queso Mozzarella

Un protocolo de elaboración de queso Mozzarella Argentino se muestra en la Figura 1.1 (Zalazar, 2008). Aunque los protocolos de elaboración pueden diferir levemente, a continuación se describen los pasos comunes y su importancia.

1.3.1. Preparación de la leche

La leche se somete a distintos tratamientos para obtener un producto homogéneo y con parámetros óptimos para la obtención del queso, dentro de los tratamientos se incluyen la filtración, clarificación, remoción de grasa o adición de crema, homogeneización y pasteurización, entre otros.

1.3.2. Tratamiento térmico de la leche

El queso Mozzarella se consume normalmente después de un muy breve, pero importante período de maduración. Por lo tanto, desde el punto de vista del estado de sanidad microbiológica, es indispensable que los quesos sean elaborados con leche pasteurizada. La leche utilizada es pasteurizada a 72°C durante 15 s o a 63°C durante 12-15 min (Tunick *et al.*, 1995; Dave *et al.*, 2003a; Rowney *et al.*, 2004; Sheehan *et al.*, 2004; Van Hekken *et al.*, 2005) y posteriormente se enfría a una temperatura de inoculación de 32-37°C. El objetivo principal de la pasteurización es eliminar microorganismos patógenos. Sin embargo, parte de la flora nativa de la leche también es afectada, por lo cual estos quesos maduran más lentamente y poseen un desarrollo del *flavor* menos intenso que aquellos elaborados con leche cruda.

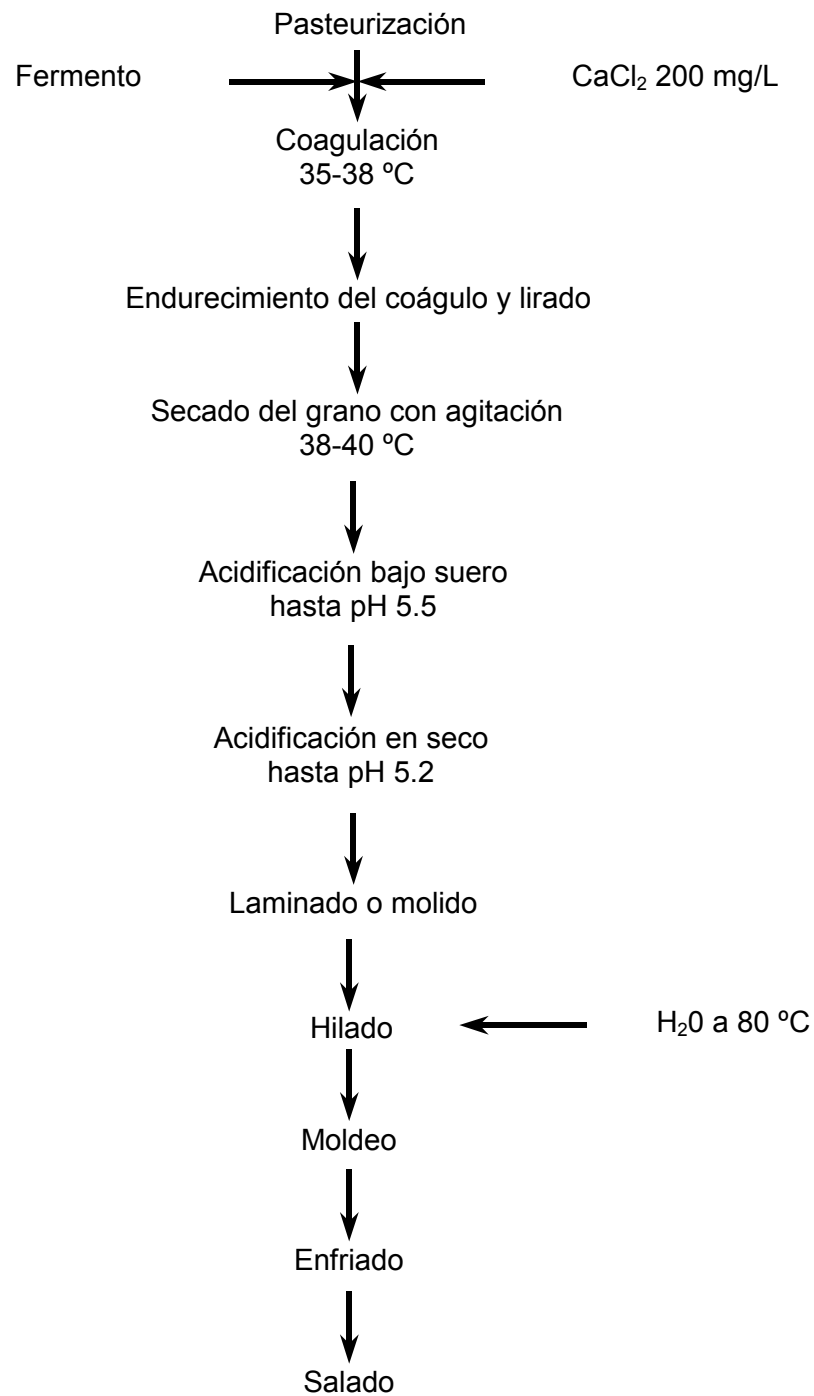


Figura 1.1. Esquema de un protocolo de elaboración de queso Mozzarella Argentino (Zalazar, 2008).

1.3.2.1. Estandarización de la leche

Debido al carácter estacional y variaciones regionales, la leche debe ser ajustada o estandarizada, para lograr un nivel de grasa y de sólidos adecuados para producir un queso Mozzarella de una composición específica. El contenido de grasa puede variar de 1 a 3.5% de acuerdo al protocolo de elaboración (Yun *et al.*, 1993 a y b; Tunick *et al.*, 1995; Sheehan *et al.*, 2004; Van Hekken *et al.*, 2007).

La estandarización por el agregado de caseína (en contraposición con la extracción de la grasa) genera un incremento del rendimiento y por ello, mayor producción por tina y por día de producción de la planta, lo cual representa un poderoso punto a favor de este método de estandarización (FEPALE, 2005).

1.3.2.2. Homogenización

La homogenización divide los glóbulos de grasa en pequeñas entidades y rompe la membrana de los glóbulos de grasa. La homogenización se ha utilizado para mejorar el rendimiento quesero y para impartir un color blanco al producto, eliminando la necesidad de utilizar dióxido de titanio como agente blanqueador (Tunick *et al.*, 1995).

La homogenización de la leche para la elaboración de Mozzarella no es muy habitual en la industria. Varios estudios demuestran que la homogeneización puede provocar alteraciones en algunas propiedades del queso dependiendo de la presión utilizada (Tunick *et al.*, 1993a y 1995). La homogenización podría mejorar la textura de queso Mozzarella de bajo contenido de grasa, incrementando el área de contacto de la grasa con la matriz proteica.

Tunick *et al.* (1993a) estudiando quesos Mozzarella de dos contenidos de grasa (alto y bajo) y elaborados con leche con y sin homogenización, observaron que la capacidad de fundido y la proteólisis de α_{S1} -caseína disminuyen, en cambio la dureza y los módulos elásticos y viscosos aumentan con la presión de homogenización en los quesos Mozzarella de ambos contenidos de grasa.

1.3.2.3. Aditivos opcionales

En la práctica es muy común agregar cloruro de calcio a la leche destinada a la elaboración de queso, por ejemplo 0.01% o 40 mg L⁻¹ de Ca. Esta cantidad agregada es pequeña con respecto a la concentración propia de la leche, de 1200 mg L⁻¹ de Ca. El agregado de 40 mg L⁻¹ de Ca a la leche incrementa la concentración de Ca soluble, coloidal e iónico, y reduce el pH de la leche; todos estos hechos tienen un efecto positivo sobre varios parámetros de la coagulación (Fox y Cogan, 2004).

El calcio tiene un rol importante durante la elaboración y también en las propiedades funcionales del queso (Joshi *et al.*, 2003; McMahon *et al.*, 2005). El calcio de la leche puede existir como calcio iónico libre, como caseinato de calcio (unido a la caseína) o puede estar formando un complejo con el fosfato en la forma de *clusters* de fosfato de calcio iónico o microgránulos. Además el complejo fosfato de calcio puede estar unido a las caseínas (fosfato de calcio micelar) o en el suero (fosfato de calcio coloidal) (Metzger *et al.*, 2001).

El estado del calcio en el queso puede ser más importante que el contenido de calcio. La proporción de calcio que está unido a la caseína (calcio micelar y fosfato de calcio micelar) es probablemente crítica y los factores que influyen sobre esta proporción pueden en consecuencia influir sobre las propiedades funcionales del queso. Así, Metzger *et al.* (2001) informaron que la dureza y la viscosidad aparente de queso Mozzarella de bajo contenido de grasa, disminuyeron debido a la modificación del estado del calcio en el queso por la preacidificación de la leche, la cual reduce tanto el calcio total como el calcio insoluble en agua.

1.3.3. Acidificación

1.3.3.1. Rol del fermento

Un paso clave en el proceso de elaboración de quesos, es la acidificación, donde el pH baja hasta valores próximos a 5.2-5.4 debido a la fermentación de la lactosa a ácido láctico. Esta fermentación es llevada a cabo por las bacterias del fermento (Fox y Guinee, 1987).

El rol del fermento a través de su desarrollo es controlar y prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos, regular la actividad del coagulante durante la coagulación, afectar la retención de coagulante activo en la cuajada, provocar la solubilización del calcio coloidal, logrando una combinación de pH y contenido de calcio adecuado para el hilado posterior, promover la sinéresis e influir en la actividad de las enzimas durante la maduración (Fox y McSweeney, 1998).

Un rol secundario del fermento se verifica durante la maduración del queso Mozzarella, dado que interviene en la producción de pequeños péptidos y aminoácidos. Esta contribución dependerá de las temperaturas de cocción y de hilado, y del grado de inactivación térmica de las enzimas del coagulante y del fermento que resulta de este tratamiento.

Para variedades como el queso Mozzarella, donde durante su elaboración se alcanzan temperaturas superiores a 40°C, las bacterias termofílicas típicamente

utilizadas son *Lactobacillus helveticus* o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ambos bacilos, y *Streptococcus thermophilus* o *Streptococcus thermophilus*, cocos. El queso Mozzarella también puede elaborarse con bacterias ácido-lácticas mesofílicas (por ejemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *cremoris*), las cuales son más aceptables para el consumo directo (Chaves *et al.*, 1999). Los fermentos termofílicos generalmente producen ácido mucho más rápidamente que los fermentos mesofílicos; por ello, el queso Mozzarella elaborado con fermentos mesofílicos normalmente tendrá mayores tiempos de elaboración, a menos que se efectúe una gran inoculación de un fermento muy activo. En general, el fermento termofílico es mucho más utilizado para la elaboración de queso Mozzarella que el fermento mesofílico (Kindstedt, 2002).

1.3.3.2. Proporción bacilos / cocos

La influencia de la relación bacilos a cocos ha sido de mucho interés en la industria del queso debido a su efecto sobre la actividad proteolítica (Yun *et al.*, 1995). La velocidad y extensión de la producción de ácido y la resultante desmineralización de la cuajada durante la elaboración son determinantes críticos de la estructura y textura del queso. En general, la acidificación durante la elaboración del queso Mozzarella depende de una sinergia entre bacilos y cocos. Esta sinergia resulta en una fermentación en dos etapas en la cual la producción de ácido al comienzo de la elaboración es debida principalmente a los cocos, mientras que los bacilos comienzan a dominar la producción de ácido en la parte final de la elaboración (Yun *et al.*, 1995).

El queso Mozzarella es una variedad que utiliza como bacterias del fermento a *Streptococcus thermophilus* solo o en combinación con *Lactobacillus* spp (Kindstedt, 2002). El metabolismo de la lactosa es más complejo que en otras variedades de quesos. Durante la elaboración la cuajada se calienta a 52-55°C, la cual es una temperatura superior a la temperatura de crecimiento óptima para ambas bacterias. Cuando la cuajada se enfría, los *Streptococcus*, que son más tolerantes al calor, comienzan a crecer, utilizando la glucosa obtenida en la lactosa, con la producción de L-lactato, pero no utiliza galactosa, la cual se acumula en la cuajada. Cuando la cuajada se ha enfriado lo suficiente, el *Lactobacillus* comienza a crecer y, si se utiliza una especie galactosa-positiva, metaboliza la galactosa, produciendo DL-lactato. En caso de utilizar una especie de *Lactobacillus* galactosa-negativa, la galactosa se acumula en la cuajada y puede participar en el pardeamiento debido a la reacción de Maillard, especialmente durante el

calentamiento, lo cual es indeseable, especialmente en quesos destinados a la elaboración de pizza (Fox y McSweeney, 1998).

De los componentes bacilos del fermento, unos pocos *Lactobacillus bulgaricus* fermentan tanto glucosa como galactosa, convirtiéndolas en ácido láctico. La mayoría de los *Lactobacillus helveticus* usan galactosa (Barbano *et al.*, 1993). Por otro lado, se ha informado que los *Lactobacillus helveticus* favorecen las propiedades funcionales, por ejemplo se observa una mayor capacidad de fundido cuando se usa *Lactobacillus helveticus* con *Streptococcus thermophilus* como bacterias del fermento comparado con el tradicional *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, debido a su continua simbiosis y sus efectos proteolíticos complementarios con el coagulante residual (Dave *et al.*, 2003b).

1.3.4. Coagulación

La coagulación consiste en la agregación de las micelas de caseína para formar una red con características de gel que retiene los glóbulos grasos. El coagulante es el principal agente responsable de la proteólisis primaria. Los factores que modifican de manera sustancial el nivel o la especificidad de la proteólisis por efecto del coagulante, causarán seguramente un gran impacto en las propiedades funcionales finales del queso.

Varias proteinasas pueden coagular la leche pero sólo unas pocas son adecuadas para la producción de queso (Fox y Cogan, 2004). Las más comunes provienen del cuajo. Tradicionalmente, el cuajo se extrae del tejido gástrico de terneros, cabritos o corderos en lactación, en donde la principal enzima es la quimosina. El aumento en la elaboración de queso, el suministro limitado y el alto costo del cuajo derivado de estómagos de terneros estimularon al desarrollo de una variedad de coagulantes de leche provenientes de fuentes microbiológicas (Fox y Cogan, 2004; Yun *et al.*, 1993c).

Desarrollos recientes en ingeniería genética han conducido a la producción comercial de quimosina pura (EC 3.4.23.4) por técnicas de fermentación utilizando una variedad de microorganismos (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Kluyvermyces lactis* y *Aspergillus awamori*) (Yun *et al.*, 1993c). Sin embargo, el uso de coagulantes microbiológicos de *Criphonectria parasitica* (sinónimo: *Endothia parasitica*) (Shehhan *et al.*, 2004) y *Mucor miehei* puede afectar significativamente el desarrollo de la textura del queso y el *flavor* durante el almacenamiento.

La actividad proteolítica residual de un coagulante en el queso depende de su sensibilidad a la inactivación por temperatura o pH durante la elaboración. En el queso Mozzarella, la quimosina es inactivada casi totalmente por las altas temperaturas alcanzadas durante el amasado e hilado de la cuajada (Yun *et al.*, 1993 a y b; Tunick *et al.*, 1993 a y b; Bertola *et al.*, 1996a; Fox y McSweeney, 1996; Guinee *et al.*, 2000; Feeney *et al.*, 2001). Sin embargo, Kindstedt *et al.* (1995) han demostrado que la proteólisis que se observa en el queso Mozzarella se debe principalmente al coagulante residual.

1.3.5. Cocción

Las funciones principales de la etapa de cocción, drenaje y chedarización en la elaboración del queso Mozzarella son el control de la humedad y el control del contenido de calcio en la cuajada durante el hilado y en el producto final. Esto es complementado, en parte, por el control de la actividad del fermento y los tiempos de acidificación (FEPALE, 2005). La temperatura durante la cocción es uno de los parámetros más útiles que el quesero puede emplear para cambiar el contenido de humedad del queso. El incremento de la temperatura de cocción provoca disminución del contenido de humedad, disminución de la velocidad de proteólisis, y aumento de la viscosidad aparente del queso Mozzarella (Yun *et al.*, 1993a). El impacto de la temperatura de cocción sobre la proteólisis y las propiedades funcionales depende de la estabilidad térmica del coagulante al pH durante la cocción y la cantidad y actividad del fermento (Yun *et al.*, 1993a). Sin embargo, los fermentos termofílicos muestran una producción óptima de ácido en un rango de temperaturas de alrededor de 42-45°C, el cual está a nivel o por encima de las temperaturas de cocción/chedarización tradicionales (FEPALE, 2005).

El procedimiento de cocción de la cuajada durante la elaboración del queso Mozzarella desnaturaliza al coagulante. Aunque la actividad del coagulante residual es limitada comparada con la actividad del coagulante en otras variedades de queso (Oberg *et al.*, 1992a), su acción es importante en la proteólisis primaria, tal como se mencionara en el inciso 1.3.4. de este capítulo.

1.3.6. Hilado y moldeo

El proceso de calentamiento e hilado de la cuajada es típico durante la elaboración de algunos quesos italianos, tal como el queso Mozzarella. El amasado en agua o salmuera caliente imparte una característica particular al queso Mozzarella. El amasado transforma la matriz tridimensional de proteínas en una red

de fibras proteicas alineadas en forma paralela. El agua, componentes hidrosolubles del queso, bacterias y glóbulos de grasa se acumulan en canales que separan los paquetes de fibras proteicas (McMahon *et al.*, 1999), resultando en una alineación parcial de fases de suero y grasa en el queso (Ak y Gunasekaran, 1997; Joshi *et al.*, 2003). Por lo tanto, no es sorprendente que las propiedades reológicas del queso Mozzarella sean de naturaleza anisotrópica (Ak y Gunasekaran, 1997). El hilado genera una textura elástica y flexible cuando el queso no está derretido, y una textura altamente estructurada, fibrosa y masticable cuando está derretido.

En un amplio sentido este proceso de calentamiento e hilado es un proceso de extrusión, el cual es realizado en un amplio rango de condiciones operativas. Una ventaja del tratamiento mecánico es que las partículas individuales de cuajada son rápidamente transformadas en una heterogénea, pero continua masa fundida que puede ser fácilmente bombeada dentro del molde. Típicamente la temperatura del agua usada en el hilado puede estar en el rango de 60 a 85°C, y la temperatura del queso puede estar en el rango de 50 a 65°C (Yu y Gunasekaran, 2005).

En la práctica comercial, el hilado se efectúa normalmente utilizando un mezclador continuo simple o doble que contiene agua caliente mezclada con sistemas de inyección de vapor. El hilado implica dos pasos: en el primero, la cuajada entra en el mezclador y es rápidamente entibiada por el agua caliente a temperaturas de al menos 50-55°C, lo cual es necesario para transformar la cuajada en una masa de consistencia plástica y maleable. La temperatura del agua puede variar ampliamente en un rango de entre 55 y 85°C, según el diseño del equipamiento y las condiciones de operación. En el segundo paso, la cuajada es trabajada por el batidor o una serie de batidores para transformarse en una cinta fibrosa unidireccional de cuajada. La cuajada caliente sale entonces del mezclador y es transportada por uno o más tornillos sin fin a la máquina de moldeo, donde bajo presión se hace que ingrese en un molde que le dará su forma final. El moldeo tiene además una función de pre-enfriado, de manera que el bloque conserve su forma una vez retirado del molde. El hilado tiene un gran impacto sobre la microestructura y la composición química (y rendimiento) del queso, y además representa un tratamiento térmico sustancial, todo lo cual afecta las características funcionales del queso (FEPALÉ, 2005). Luego de ser moldeados, los quesos se enfrían sumergiéndolos en agua con una temperatura cercana a los 4°C.

1.3.7. Salado

El cloruro de sodio tiene un significativo efecto sobre la textura del queso a través de la inhibición del crecimiento microbiológico, control de la actividad de enzimas proteolíticas y sus efectos sobre las propiedades de las proteínas para ligar agua (Olson, 1982; Paulson *et al.*, 1998). Durante el salado, la sal es absorbida por la cuajada y la humedad es simultáneamente expelida, pero la relación entre ambos procesos puede variar ampliamente en función del método de salado.

El salado del queso Mozzarella se puede realizar de diferentes maneras, por adición de sal sólida a la cuajada molida, por cocción y amasado en salmuera caliente, o por inmersión del queso recién moldeado en una solución de salmuera fría y también se pueden usar combinaciones de salado en seco con salado por inmersión en salmueras (Barbano *et al.*, 1994; Rowney *et al.*, 2004).

El salado en salmuera es el método tradicional de incorporación de sal para el queso Mozzarella. El tiempo de permanencia en salmuera y la concentración de la misma son parámetros claves que afectan el ingreso de sal y la pérdida de humedad durante el salado (Fox y Guinee, 1987). Cuando los quesos se salan por inmersión, presentan un gradiente de sal desde la superficie hacia el centro del queso, mientras que el contenido de humedad disminuye desde el centro hacia la superficie (Farkye *et al.*, 1991; Kindstedt *et al.*, 1996).

La mayoría de los quesos son salados a temperatura ambiente o a temperaturas moderadamente frías (12 a 20°C) (Fox y Guinee, 1987; Kindstedt *et al.*, 1996). Durante la maduración, tanto el contenido de humedad como el contenido de sal tienden a uniformarse. El nivel de sal en la elaboración comercial de queso Mozzarella se encuentra comúnmente entre 0.7 y 3.5% (Rowney *et al.*, 2004).

1.3.8. Maduración

En la práctica industrial el queso Mozzarella usualmente es madurado a temperatura de refrigeración (4°C) de 1 a 3 semanas antes de su uso como ingrediente en la preparación de pizzas o de otros preparados. El queso Mozzarella que es muy fresco o muy maduro no posee las características funcionales deseables (Yun *et al.*, 1993d; Bertola *et al.*, 1996a).

La maduración involucra una compleja serie de eventos bioquímicos, y probablemente algunos químicos, los cuales conducen al sabor, aroma y textura

característicos de cada variedad de queso. Los eventos bioquímicos primarios son: la degradación de la lactosa residual, lactato y citrato; lipólisis y proteólisis. (Fox y McSweeney, 1996). De estos eventos, la proteólisis es el más importante para la mayoría de los quesos madurados. Los agentes proteolíticos en quesos son originarios de cinco fuentes: el coagulante, las proteinasas indígenas y endógenas de la leche, el fermento, el fermento adjunto y la bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB) (McSweeney y Fox, 1997).

En el queso Mozzarella la extensión de la proteólisis puede ser muy limitada a diferencia de otras variedades de quesos madurados. Factores tales como el pH durante el drenado del suero, la temperatura de cocción, el contenido de sal en la fase acuosa del queso, la temperatura durante el hilado y la interacción de las proteínas del suero inducidas por el calor, pueden influir en la extensión o el patrón de proteólisis y por lo tanto en las propiedades funcionales (Yun *et al.*, 1993e).

La proteólisis en el queso Mozzarella es causada principalmente por la actividad del coagulante residual y de la plasmina (Yun *et al.*, 1993a; Bertola *et al.*, 1996a; Guinee *et al.*, 2000; Feeney *et al.*, 2001). La actividad proteolítica residual depende del tipo de coagulante usado en la elaboración, de la cantidad de coagulante retenido en la cuajada y de la inactivación provocada por el pH y la temperatura durante la elaboración (Yun *et al.*, 1993e).

La proteólisis de α_{S1} -caseína se debe fundamentalmente a la acción del coagulante, el cual puede resistir el tratamiento térmico si la cocción y condiciones de amasado no son extremas (Fox y McSweeney, 1996). De acuerdo a Yun *et al.* (1993e), si la temperatura durante el hilado no supera los 65°C, la quimosina permanece activa e influye en la proteólisis durante el almacenamiento refrigerado de queso Mozzarella, que es lo que generalmente ocurre.

El coagulante residual hidroliza la α_{S1} -caseína a α_{S1} -I-caseína o α_{S1} -caseína (f24-199) y a pequeños péptidos, provocando cambios en las propiedades funcionales y en el contenido de péptidos solubles a pH 4.6 (Law, 1987; Farkye *et al.*, 1991; Oberg *et al.*, 1992a; Yun *et al.*, 1993 a y b; Tunick *et al.*, 1993a y 1995; Kindstedt *et al.*, 1995; Chaves *et al.*, 1999; Feeney *et al.*, 2001).

Dave *et al.* (2003a) postularon que la capacidad de fundido del queso Mozzarella es influenciada por la continua hidrólisis de la α_{S1} -caseína y de la β -caseína en pequeños péptidos más que por la hidrólisis inicial de las proteínas intactas. Este estudio sugiere que el patrón de degradación de las proteínas del

queso, particularmente de la α_{S1} -caseína, podría variar y así influir en las propiedades funcionales del queso Mozzarella.

El queso Mozzarella generalmente se elabora con una mezcla de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, ya que así el pH de la cuajada disminuye más rápidamente que cuando se utiliza sólo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Además, en el caso de usar sólo *Streptococcus thermophilus*, este no es suficientemente activo para la producción de ácido necesaria en la elaboración de queso Mozzarella (Oberg *et al.*, 1991).

El *flavor* de un queso Mozzarella que es elaborado usando un fermento termofílico generalmente se asemeja al del yogur debido a la producción de acetaldehído por acción del *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Cuando se usa un fermento mesofílico no se produce acetaldehído, por lo tanto el *flavor* es influenciado por el ácido láctico. En cambio cuando se elabora queso Mozzarella por acidificación directa, el queso es insípido debido a la falta de *flavor* o es influenciado levemente por el ácido utilizado como acidulante (Kindstedt, 2002). De acuerdo a Oberg *et al.* (1991), el queso Mozzarella elaborado por el método de acidificación directa se funde mal y tiene muy poco pardeamiento. La comparación de las propiedades de fundido de quesos elaborados por acidificación directa con quesos elaborados con fermentos resalta la importancia del fermento en el desarrollo de estas propiedades.

Los lactobacilos termofílicos son ampliamente utilizados en fermentaciones lácteas, por ejemplo *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus lactis* en los quesos suizos o italianos. El sistema proteolítico de los *Lactobacillus spp.* es generalmente similar al sistema de los *Lactococcus spp.*, su principal proteinasa está asociada con la membrana de la pared celular, es una serino-enzima ópticamente activa a pH 7.5-8.0 y 42°C, e hidroliza a la α_{S1} -caseína en Ile₆-Lys₇ y Gln₉-Gly₁₀ y a la β -caseína en Leu₆-Asn₇, Lys₁₀₅-His₁₀₆, Phe₁₁₉-Thr₁₂₀, Gln₁₇₅-Lys₁₇₆, Gln₁₈₂-Arg₁₈₃, Phe₁₉₀-Leu₁₉₁ y Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ (Fox y McSweeney, 1996).

Recientemente, Oberg *et al.* (2002) caracterizaron diferentes fermentos termofílicos para la elaboración del queso Mozzarella, los resultados mostraron que cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fermentan lactosa, glucosa y fructosa, y la mayoría también utiliza manosa. El *Lactobacillus helveticus* fermenta lactosa, glucosa y galactosa, algunas cepas también utilizan manosa y fructosa y solamente unas pocas fermentan trealosa. Además caracterizaron su proteólisis

utilizando el método de especificidad hacia α_{S1} - caseína (f1-23) para la separación en los grupos que se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Agrupamiento basado en los patrones de degradación de α_{S1} - caseína (f1-23) para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus*.

Grupo	Especie	Número de cepas estudiadas	Productos primarios	Productos secundarios
I	Ldb	3	f 1 – 13 + f 14 – 23	f 1 – 9 + f 10 – 13
	Lh	1	f 1 – 16 + f 17 – 23	f 1 – 6 + f 7 – 13
II	Lh	3	f 1 – 9 + f 10 – 23 f 1 – 13 + f 14 – 23	f 1 – 6 + f 7 – 13
III	Ldb	4	f 1 – 9 + f 10 – 23 f 1 – 13 + f 14 – 23 f 1 – 17	f 1 – 6 + f 7 – 13 f 1 – 9 + f 10 – 13
IV	Ldb	1	f 1 – 13 + f 14 – 23	f 1 – 9 + f 10 – 13 f 1 – 6 + f 7 – 13 f 1 – 7
V	Ldb	1	f 1 – 9 + f 10 – 23	f 1 – 6 + f 7 – 13
	Lh	2	f 1 – 16 + f 17 – 23	
VI	Ldb	3	f 1 – 8 + f 9 – 23 f 1 – 9 + f 10 – 23	f 1 – 6 + f 7 – 13
	Lh	1	f 1 – 13 + f 14 – 23 f 1 – 16 + f 17 – 23	

Ldb - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Lh - *Lactobacillus helveticus*

El *Streptococcus thermophilus* es considerado menos proteolítico que los lactobacilos termofílicos. Este generalmente crece en la leche en simbiosis con un *Lactobacillus*, el cual provee los péptidos para el *Streptococcus*. De acuerdo a estudios realizados sobre las actividades de las aminopeptidasas y dipeptidasas de varias cepas de *Streptococcus thermophilus*, todas ellas poseen actividad de leucina-aminopeptidasa y PepX, y algunas tienen actividad de arginina-aminopeptidasa. Las proteinasas de la mayoría de las cepas son capaces de hidrolizar β - y κ -caseínas. Las peptidasas del *Streptococcus thermophilus* son intracelulares y sus proteinasas tienen una localización periférica. Las proteinasas asociadas a la envoltura celular del *Streptococcus thermophilus* son serino-

enzimas, óptimamente activas a pH cercanos a 7.0 y a temperaturas entre 37 y 45°C (Fox y McSweeney, 1996).

1.4. Propiedades del queso Mozzarella

Durante la última década, los estudios de las propiedades funcionales, reológicas y microestructurales del queso Mozzarella han adquirido relevancia dado que están estrechamente relacionadas con las expectativas que posee el consumidor. Particularmente, en el queso Mozzarella se espera que exhiba buenas propiedades funcionales (Joshi *et al.*, 2003; Dave *et al.*, 2003 a y c).

1.4.1. Propiedades funcionales

Cuando el queso se utiliza como ingrediente en alguna preparación alimenticia se requiere que cumpla una o más funciones, las cuales pueden clasificarse arbitrariamente en tres grupos principales (Guinee, 2002).

- *Flavor*
- Propiedades funcionales del queso calentado
- Propiedades funcionales del queso sin calentar

El *flavor* de los quesos es un importante factor de calidad en la mayoría de las aplicaciones donde el queso es usado como un ingrediente. El *flavor* de la mayoría de los quesos es muy similar inmediatamente luego de la elaboración. Sin embargo, las características individuales de las variedades se desarrollan durante la maduración como consecuencia de una serie de cambios microbiológicos, enzimáticos y químicos, los cuales incluyen proteólisis, lipólisis y el metabolismo de la lactosa, del lactato y del citrato.

Existe relativamente poca información en la literatura relacionada con las propiedades funcionales del queso sin calentar y con los factores que las afectan. El comportamiento del queso cuando es sometido a diferentes métodos de reducción de tamaño se relaciona con un grupo importante de propiedades funcionales del queso sin calentar. En el caso del queso Mozzarella las propiedades funcionales más importantes dentro de este grupo son:

- *Shreddability*: habilidad del queso para ser cortado en pequeñas tiras de dimensiones uniformes, resistiendo a la fractura durante el corte y al aglutinamiento.

- *Sliceability*: habilidad del queso para ser cortado limpiamente en delgadas rebanadas sin fracturarse, desmenuzarse o pegarse al instrumento de corte.

Los quesos son utilizados extensamente en diversas preparaciones, por ejemplo en comidas horneadas, asadas en la parrilla, cocinadas en microondas y en frituras. Un aspecto clave del comportamiento del queso en estas preparaciones es su funcionalidad inducida por calor. Algunos de los atributos funcionales del queso Mozzarella cuando es calentado son:

- *Meltability*: habilidad del queso para ablandarse hasta una masa fundida durante el calentamiento.
- *Flowability*: habilidad del queso fundido para fluir.
- *Stretchability*: habilidad del queso fundido para formar fibras cohesivas, hilos o láminas cuando es extendido.
- *Limited oiling-off*: habilidad del queso para liberar una pequeña cantidad de grasa libre cuando es calentado.

Las propiedades funcionales son afectadas por distintos factores y sus interrelaciones, tales como: la leche (composición, tratamiento térmico, actividad enzimática y bacteriana), la composición química del queso (sólidos totales, pH, contenidos de proteína y grasa, niveles de lactosa residual y ácido láctico), las condiciones de elaboración (velocidad de acidificación, valor de pH final, temperatura de cocción, condiciones de amasado y contenido de sal), el contenido mineral del queso (calcio y fosfato total, contenido de calcio insoluble asociado con la caseína), y la maduración (tiempo y temperatura, actividades del coagulante residual, de la plasmina y microbiológica, solubilización del fosfato de calcio coloidal, equilibrio de la sal y la humedad, cambios de pH) (Lucey *et al.*, 2003).

Las propiedades funcionales de queso Mozzarella han sido estudiadas a través de métodos empíricos (Muthukumarappan *et al.*, 1999), pero claramente la mayoría de ellas están asociadas a la reología del queso sólido y fundido (Gunasekaran y Ak, 2003).

1.4.2. Propiedades reológicas

De acuerdo a Dave *et al.* (2003b), el queso es un material viscoelástico, lo cual implica que la relación entre las propiedades elásticas y viscosas depende de la escala de tiempo de la deformación. Durante escalas de tiempo cortas, el comportamiento es principalmente elástico, lo cual significa que la muestra

recupera su forma original luego que el esfuerzo aplicado es retirado. Sin embargo, con escalas de tiempo largas, el comportamiento es principalmente viscoso, lo cual implica que la mayor parte de la deformación se mantiene luego que el esfuerzo aplicado es retirado. Además, como el comportamiento reológico del queso no es lineal, se ha observado que la extensión de la deformación (o la velocidad de deformación) no será proporcional al esfuerzo aplicado si la deformación relativa es mayor que el 2%.

Existen tres categorías de mediciones reológicas sobre alimentos: empíricas, imitativas y fundamentales (Tunick y Van Hekken, 2002). Debido a la complejidad de los alimentos y sus constituyentes, su caracterización reológica fue realizada mediante mediciones empíricas (Shoemaker *et al.*, 1992). Los tests empíricos pueden implicar simplemente la manipulación de la cuajada o queso con los dedos y suministran básicamente información de un solo punto. Los tests empíricos miden parámetros que la experiencia indica que están relacionados con la textura. Por muchos años las plantas elaboradoras de queso utilizaron compresores de bola, penetrómetros y tensiómetros de cuajada para la medición de atributos del queso en forma empírica. Estas herramientas no son consideradas de precisión debido a la arbitrariedad de las condiciones del test y a que los resultados son difíciles de comparar con aquellos obtenidos por experiencias más rigurosas (Tunick, 2000).

Los tests imitativos sirven para imitar la masticación de un producto y proveer mayor información que los tests empíricos. Los tests imitativos tales como el análisis de perfil de textura (Texture Profile Analysis, TPA) utilizan una máquina universal de ensayo para imitar la masticación, estos ensayos pueden también ser considerados empíricos, dado que no hay correcciones por cambio en la forma de la muestra. TPA es útil para obtener información general de la textura y para realizar comparaciones, por ejemplo entre queso Mozzarella con distintas manufacturas, tipos de fermento, contenido de grasa, homogeneización, nivel de proteólisis, pero no para medir verdaderas propiedades reológicas (Cervantes *et al.*, 1983; Tunick *et al.*, 1995; Bertola *et al.*, 1996b; Guinee *et al.*, 2001; Hennelly *et al.*, 2006). Una dificultad con el ensayo de TPA es que generalmente diferentes trabajos utilizan diferentes condiciones de trabajo, haciendo imposible las comparaciones (Tunick, 2000).

Los tests fundamentales incluyen los tests de compresión, tests dinámicos y transientes. Las muestras utilizadas en estas experiencias son de una forma específica y se deforman de una manera específica permitiendo a un reólogo

analizar los resultados sistemáticamente. El test fundamental más simple es el test de compresión, donde una fuerza (fuerza por unidad de área) es aplicada en forma descendente hacia una muestra y la deformación resultante es medida como un esfuerzo ingenieril o de Couchy (Tunick, 2000).

Entre los tests fundamentales, los métodos reológicos dinámicos han conducido a un mayor entendimiento de la naturaleza viscoelástica del queso Mozzarella (Ak y Gunasekaran, 1996; Subramanian y Gunasekaran, 1997b). En el análisis por barridos oscilatorios de pequeña amplitud (SAOS), se aplican a la muestra pequeñas deformaciones oscilatorias para medir la fuerza o flexibilidad de las uniones internas, permitiendo determinar valores cuantitativos para las propiedades viscoelásticas del queso (Diefes *et al.*, 1993; Van Hekken *et al.*, 2004). Las mediciones obtenidas son valores ingenieriles verdaderos para la elasticidad y viscosidad, contrariamente a lo que ocurre con las aproximaciones obtenidas por otros métodos reológicos (Dave *et al.*, 2003b).

1.4.3. Propiedades microestructurales

Desde el punto de vista de la microscopía electrónica de barrido, el queso Mozzarella consiste en cavidades conteniendo grasa y suero separadas por hilos fibrosos de la matriz de caseína (Merrill *et al.*, 1996; Rowney *et al.*, 1999). Como la cuajada del queso Mozzarella es calentada, amasada y finalmente moldeada, las proteínas forman fibras orientadas aproximadamente de forma paralela (McMahon *et al.*, 1999). La estructura longitudinal de las fibras de caseína puede ser la responsable de algunos de los atributos funcionales deseables del queso Mozzarella fundido (Rowney *et al.*, 1999).

Luego del salado, la apariencia de la superficie de la matriz de proteínas que rodea los canales de grasa y suero, cambia. La apariencia lisa de las paredes de los canales de grasa y suero que presentaba el queso cuando estaba caliente cambia a una textura rugosa. Las paredes de los canales son texturizadas por numerosas indentaciones circulares que poseen un diámetro de aproximadamente 1 a 10 μm . Además, también hay pequeñas indentaciones circulares o elípticas de aproximadamente 0.5 a 1 μm de diámetro. Las indentaciones más grandes corresponden a los glóbulos de grasa, y las pequeñas indentaciones corresponden a los cocos del fermento. Basados en estas observaciones, parece que la matriz proteica presiona sobre los componentes rígidos de los canales de grasa y suero, y se moldea alrededor de cualquier objeto adyacente sólido. Mientras el queso siga

caliente, los glóbulos de grasa no ofrecen resistencia, debido a que la grasa se encuentra fundida y no permite formar indentaciones en la pared de los canales. Sin embargo, cuando el queso se enfría los glóbulos de grasa se solidifican y actúan como un molde alrededor del cual la matriz proteica flexible se moldea (McMahon *et al.*, 1999).

Durante el almacenamiento del queso Mozzarella a 4°C, la apariencia de los canales de grasa y suero continúa cambiando. Las impresiones de los glóbulos de grasa en la superficie de la pared de los canales de la matriz proteica se vuelven más pronunciadas y cambian de pequeñas indentaciones a grandes depresiones (McMahon *et al.*, 1999).

A los 7 días de almacenamiento, la matriz proteica se extiende entre 0.5 a 1 μm dentro de los canales de suero y grasa, lo cual permite que la forma esférica de los glóbulos de grasa sea distinguida nítidamente. Luego de 14 días de maduración la matriz proteica tiene prácticamente rodeados a los glóbulos de grasa. Delgados filamentos de proteína conectan las paredes de los canales de suero y grasa, y parcialmente ocupan el espacio que previamente era ocupado por el suero intersticial entre los paquetes de glóbulos de grasa y se observa que los canales poseen una apariencia de panal de abeja (Tunick *et al.*, 1993b; McMahon *et al.*, 1999).

A los 21 días, los espacios intersticiales entre los glóbulos de grasa parecen estar completamente llenos por la matriz proteica. Se podría decir que no hubo ningún cambio en la posición de los glóbulos de grasa, sino que hubo un cambio en la microestructura del queso durante el almacenamiento resultante de la distribución de las proteínas y del agua (Paulson *et al.*, 1998; McMahon *et al.*, 1999).

1.5. Congelación de queso Mozzarella

La congelación es uno de los métodos de preservación usado para extender el período de comercialización y disponibilidad de productos alimenticios altamente perecederos (Lück, 1977). El proceso completo incluye la congelación propiamente dicha, el almacenamiento del producto congelado y la descongelación. Las condiciones con que se llevan a cabo estas etapas son importantes para conseguir el correcto aprovechamiento energético y la calidad del producto luego de la descongelación.

La congelación es una forma efectiva de preservar el color, *flavor* y valor nutritivo de los quesos. Sin embargo, de acuerdo a Fennema (1972) la congelación

es sólo moderadamente efectiva para preservar la textura del queso. Los daños producidos por la congelación y la modificación de las propiedades físicas dependen del tipo de queso, de su composición y procedimiento de fabricación, de las condiciones de congelación, del tiempo de maduración del producto antes y después de la congelación y de los parámetros elegidos para evaluar el daño (Diefes *et al.*, 1993).

Dahlstrom (1978) (citado en Diefes *et al.*, 1993) congeló queso Mozzarella muy lentamente, pasando por la zona de temperatura crítica de -1.1 a -6.7°C , en 5 o 131 h. Inmediatamente luego de descongelar, se realizaron estudios de textura usando TPA pasando por la zona crítica en 12, 36 y 60 h. El queso mostró alta liberación de grasa, baja cohesividad, excesiva humedad libre en la superficie, decoloración y baja capacidad de fundido. Sin embargo, luego de 3 semanas de almacenamiento a 4.4°C , el queso Mozzarella recobró sus valores óptimos de cohesividad y de capacidad de fundido.

Cervantes *et al.* (1983) congeló bloques de queso Mozzarella de 2.5 kg ($30 \times 8 \times 8 \text{ cm}^3$) con distintos contenidos de sal atravesando la zona de temperatura crítica en 6 h. Luego del almacenamiento del producto congelado a -15°C por 1 semana, las muestras fueron descongeladas pasando por la zona crítica en 5 h. Los quesos se almacenaron por 21 días a 5.6°C y fueron analizadas usando un ensayo de compresión. No se observaron cambios en la firmeza, cohesividad y fibrosidad.

Tunick *et al.* (1991) congelaron queso Mozzarella a -20°C y lo mantuvieron durante 8 semanas a -20°C , las muestras se descongelaron y luego de 3 semanas a 4.4°C el queso mostró mayor capacidad para fluir que una muestra no congelada. Los autores compararon los datos de TPA y de capacidad de fundido de queso Mozzarella fresco, refrigerado y congelado, con alto y bajo contenido de grasa.

Oberg *et al.* (1992b) congelaron muestras de queso Mozzarella en bloques de $5 \times 10 \times 7 \text{ cm}^3$ y en forma rallada, a -196°C y -20°C y las mantuvieron almacenadas a -70°C y -20°C durante 42 días, respectivamente. Estudiando la viscosidad, observaron que las muestras congeladas tenían mayor elasticidad pero menos fluidez que las muestras refrigeradas controles.

Diefes *et al.* (1993), utilizaron técnicas reológicas fundamentales para cuantificar los cambios reológicos que sufre el queso Mozzarella durante el uso de un protocolo comercial de congelación-descongelación.

Bertola *et al.* (1996a) utilizaron la viscosidad aparente, formación de grasa libre y capacidad de fundido para estudiar los efectos de la maduración antes y después de congelar. Los autores analizaron la velocidad de congelación y del almacenamiento del producto congelado sobre las características del queso Mozzarella de baja humedad, y concluyeron que el queso Mozzarella de baja humedad puede ser congelado y almacenado a -20°C sin pérdida de calidad siempre y cuando el producto final sea madurado de 14 a 21 días a 4°C antes del consumo.

Bevilacqua (1997) estudió los efectos de la velocidad de congelación y del tiempo de maduración antes de la congelación en quesos Mozzarella. La congelación rápida se realizó en crióstato según las condiciones especificadas por Cervantes *et al.* (1983) y la congelación lenta se realizó en cámara con aire estanco a -20°C (pasando por la zona de temperatura crítica de -1.1°C a -6.7°C en 10 horas). Los autores reportaron que si los quesos tenían una maduración previa de 14 días, no se observaban cambios en la calidad de los quesos que se congelaron con ambas velocidades.

Chaves *et al.* (1999) observaron que el queso Mozzarella inmediatamente luego de descongelar muestra mayor capacidad de fluir, pero luego de una semana de almacenamiento a 4°C , no observaron diferencias entre muestras refrigeradas y aquellas congeladas-descongeladas-atemperadas.

Califano y Bevilacqua (1999) reportaron que la composición de ácidos orgánicos de muestras de queso Mozzarella que fueron congeladas a -20°C y después completaron la maduración no difiere de los grupos control de muestras refrigeradas a 4°C para el mismo tiempo de maduración.

Kuo y Gunasekaran (2003) estudiaron las propiedades de la capacidad de fundido, extensibilidad y la microestructura del queso Mozzarella evaluando los efectos de almacenar 2, 7 y 14 días previamente a la congelación, los efectos de atemperar 7 y 14 días luego de la congelación, y el efecto de almacenar en estado congelado por 1 y 4 semanas a -20°C . Los autores concluyeron que el queso Mozzarella debe ser madurado por 1 semana a 7°C antes de la congelación y puede ser almacenado durante 4 semanas a -20°C . Sin embargo, para obtener una buena fluidez y propiedades de extensibilidad el queso debe ser atemperado por 7 días antes del consumo.

Graiver *et al.* (2004) evaluaron los efectos de la congelación del queso Mozzarella con un subsiguiente período de maduración a 10°C sobre la

microestructura, proteólisis y propiedades viscoelásticas. Los autores concluyeron que la congelación del queso Mozzarella acelera la proteólisis durante la maduración a 10°C luego de la descongelación. La hidrólisis de las caseínas ablanda la matriz del queso, por lo tanto los maestros queseros deberían reducir en 1 semana el período de maduración de las muestras descongeladas para lograr el mismo grado de maduración que un queso sin congelar.

Como se observa la calidad del alimento congelado depende de la velocidad de congelación y de la temperatura final. Más aun, la tendencia mundial es modificar los procesos de preservación tradicionales en busca de sistemas eficientes que no causen daños en la apariencia, en las propiedades sensoriales, en las propiedades texturales o en el valor nutricional, y que ocupen poco lugar.

Uno de los métodos de “congelación rápida” de alimentos es la congelación por inmersión, la cual se lleva a cabo poniendo en contacto directo el alimento con un medio líquido de bajo punto de congelación mantenido a baja temperatura. Como medio refrigerante se usan soluciones acuosas tales como soluciones de cloruro de sodio, cloruro de calcio, sacarosa, etanol o glicerol. Durante la inmersión ocurre una transferencia simultánea de calor y materia. El movimiento de agua hacia la salmuera de inmersión y el movimiento de soluto hacia el interior del alimento diferencian la congelación por inmersión de la congelación tradicional.

La congelación de alimentos por inmersión presenta como principales ventajas no sólo aquellas asociadas a un método de congelación rápida sino que además permite ahorrar cantidades considerables de energía (Chourot *et al.*, 2003), afecta menos al medio ambiente, ya que usa refrigerantes secundarios mientras que el refrigerante principal se encuentra aislado en un sistema relativamente pequeño, y facilita el desarrollo de nuevos productos, ya que en el medio refrigerante se puede incluir antioxidantes, saborizantes y/o micronutrientes para extender la vida útil de los productos y mejorar su valor nutricional y propiedades sensoriales (Fikiin, 2003). Como desventajas se destacan la contaminación microbiana de las soluciones y el ingreso no controlado de solutos en los alimentos.

Aunque el proceso presenta interesantes ventajas, no ha sido adecuadamente estudiado por lo que las posibilidades de control son deficientes y consecuentemente los procedimientos de congelación por inmersión son empíricos (Lucas y Raoult-Wack, 1998). Las principales contribuciones están relacionadas con la influencia de la temperatura, la concentración y la agitación sobre el cambio de fase y el ingreso de soluto en geles (Lucas y Raoult-Wack, 1996) y en algunos

sistemas alimenticios como manzanas (Lucas *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1999a) y chauchas (Chourot *et al.*, 2001), y modelos sencillos o simplificados de transferencia de calor y materia (Lucas *et al.*, 1999b; Lucas *et al.*, 2000a; Lucas *et al.*, 2000b; Lucas *et al.*, 2001).

Particularmente en el caso de la congelación de quesos blandos por inmersión en soluciones de NaCl, por un lado, el salado es una de las etapas de elaboración y por otro, la congelación es un método de conservación que permite prolongar la estabilidad y la vida útil del producto, por lo que la combinación de ambas etapas puede resultar en un sistema de trabajo ventajoso. Debe tenerse en cuenta que la velocidad de congelación afecta la formación de cristales y por lo tanto la absorción de agua durante la descongelación, lo cual podría influir en la textura o en las características del medio en el que tienen lugar las reacciones de degradación que ocurren durante la maduración de los quesos.

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

El queso Mozzarella es una variedad de queso blando que se consume fresco y su uso principal es la elaboración de pizzas, ya que su principal característica es la capacidad de derretirse y fluir cuando es calentado. En Argentina, la mayor parte de la producción de queso Mozzarella se destina al consumo interno. Además, si bien los volúmenes de exportación son comparativamente pequeños, es comercializado principalmente a países limítrofes. Debido a su corto tiempo de maduración, la exportación de queso Mozzarella a países más lejanos implica poseer una metodología adecuada de conservación. Por otro lado, es bien conocido que una congelación rápida tiende a formar cristales de hielo pequeños, los cuales causan menores modificaciones en el alimento luego de la descongelación. En este sentido, la congelación por inmersión en soluciones de NaCl aparece como una alternativa interesante. Esta metodología tiene importantes ventajas, tales como cortos tiempos de proceso, menor gasto de energía, mejor calidad del producto y menor costo. En el caso particular de queso Mozzarella, la congelación por inmersión en soluciones concentradas de NaCl podría ofrecer interesantes ventajas, tales como la disminución del tiempo de producción y la utilización de un método de congelación rápida. Sin embargo, tiene como desventaja la penetración no controlada de solutos en el alimento, por lo cual no tiene una amplia difusión en la industria.

Por tal motivo en el presente estudio, se planteó como **objetivo general** estudiar los aspectos básicos y aplicados involucrados en la congelación por inmersión en soluciones acuosas concentradas refrigerantes como etapa innovadora en la elaboración y/o conservación del queso Mozzarella, importante queso blando en nuestro país y en el mundo.

Se proponen como **objetivos específicos**:

- Conocer y analizar las principales variables de control del proceso de congelación por inmersión de queso Mozzarella.
- Seleccionar, a través del modelado y la simulación del proceso de congelación por inmersión, una condición experimental para evaluar el efecto de dicho proceso en las principales modificaciones que ocurren durante la maduración del queso Mozzarella.

- Determinar los valores de parámetros físicos, químicos y/o termodinámicos para completar la descripción matemática del fenómeno de transferencia de calor y materia.
- Evaluar el efecto de la congelación por inmersión y del almacenamiento de las muestras congeladas sobre:
 - La proteólisis del queso Mozzarella, dado que es el principal cambio bioquímico durante la maduración del mismo.
 - Las propiedades reológicas del queso Mozzarella para evaluar su comportamiento viscoelástico.
 - La microestructura del queso Mozzarella, la cual juega un rol importante para entender el comportamiento de propiedades funcionales, texturales o reológicas.

CAPÍTULO 3
MATERIALES Y
MÉTODOS

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Quesos

Para el presente estudio se emplearon quesos Mozzarella elaborados con leche de vaca de un mismo silo, procedentes de una planta industrial de Sancor (Cooperativas Unidas Limitada, Gálvez, Santa Fe, Argentina). Los quesos se retiraron de la línea de elaboración tradicional antes de la etapa de salado, se envasaron al vacío y se transportaron en forma refrigerada hasta nuestro laboratorio.

Los quesos de forma de paralelepípedo ($28 \times 10 \times 10 \text{ cm}^3$) tuvieron un peso aproximado de 3500 g. En la Tabla 3.1 se muestra la composición inicial del queso Mozzarella utilizado. Teniendo en cuenta el contenido de humedad, se puede considerar que corresponde a un queso Mozzarella de bajo contenido de humedad, generalmente conocido como queso “pizza cheese” (Fox y Guinee, 1987). El contenido de humedad se determinó por duplicado en un horno microondas CEM AVC 80 (CEM, Mattheus, NC, USA). El contenido de grasa se determinó por duplicado según el método de la International Dairy Federation (IDF, 1969). El contenido de nitrógeno total se determinó por duplicado utilizando el método de Kjeldahl según el procedimiento establecido por Büchi Labortechnik AG (1998). El contenido de cloruro se determinó por quintuplicado según Fox (1963). El valor de pH se determinó por duplicado utilizando un electrodo para alimentos sólidos (PH Spear, OAKTON Instruments, Vernon Hills, IL, USA).

Tabla 3.1. Composición inicial de los quesos Mozzarella usados para el estudio.

Componente	Valor
Humedad (% p/p)	50.2±0.3
Grasa (% p/p)	19.7±0.4
Proteína total (% p/p)	22±2
Cloruro en la humedad (% p/p)	0.143±0.004
pH	5.43±0.03

3.2. Muestras

Las muestras consistieron en placas de 2 cm de espesor cortadas en forma perpendicular al eje mayor de la barra de queso. Se descartaron las placas de los extremos de la barra de queso.

3.3. Soluciones de inmersión

Las soluciones de inmersión fueron soluciones de NaCl 23% p/p, 0.55% Ca⁺² (Geurts *et al.*, 1972) y pH 5.2.

3.4. Tratamientos

Para la selección de los tratamientos para evaluar el efecto de la congelación por inmersión y del almacenamiento de las muestras congeladas, se realizaron experiencias preliminares (Anexo A). Dichas experiencias permitieron determinar que con una temperatura de la solución de inmersión de -15°C es posible realizar una congelación rápida con ingreso controlado del soluto. Para determinar el tiempo de inmersión de los distintos tratamientos seleccionados, se usaron las predicciones propuestas por Zorrilla y Rubiolo (2005 a y b). Para usar los modelos matemáticos se determinó el punto inicial de congelación y su variación con el contenido de solutos (Anexo B). Se determinaron los tiempos de inmersión para alcanzar concentraciones de soluto en el queso similares cuando las muestras son congeladas o cuando solamente son saladas por inmersión (Anexo C).

Veintiún placas fueron sumergidas en la solución a 4°C y retiradas a los 90 min (muestras control, C) y cuarenta y dos a -15°C y retiradas a los 180 min. Las muestras retiradas de las soluciones fueron secadas con papel absorbente. Veintiún muestras congeladas se descongelaron a 4°C inmediatamente luego de finalizada la congelación (muestras congeladas, F), mientras que veintiún muestras congeladas fueron mantenidas a -20°C durante 2 meses y luego se descongelaron a 4°C (muestras almacenadas congeladas, A). Todas las muestras fueron envasadas al vacío y maduradas a 4°C durante 6 semanas. Se retiraron 3 placas en forma aleatoria de cada tratamiento a 1, 7, 14, 20, 27, 34 y 41 días de maduración. En las Figuras 3.1 y 3.2 se esquematiza la obtención de las muestras y la definición de los tratamientos estudiados. Cada placa se cortó por la mitad, una de ellas se usó para la determinación de la composición fisicoquímica y el seguimiento de la proteólisis, y la otra se usó para los estudios reológicos y de microscopía.

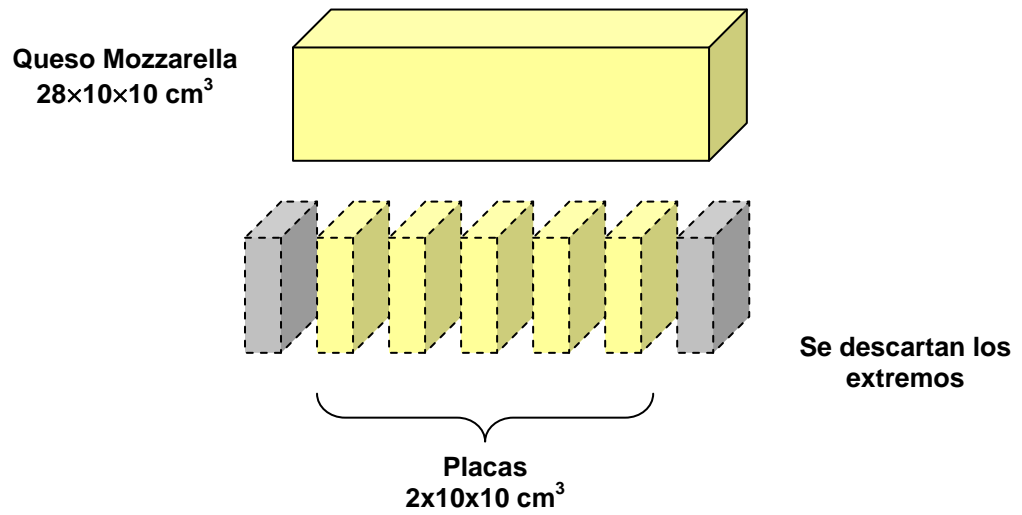


Figura 3.1. Obtención de las muestras.

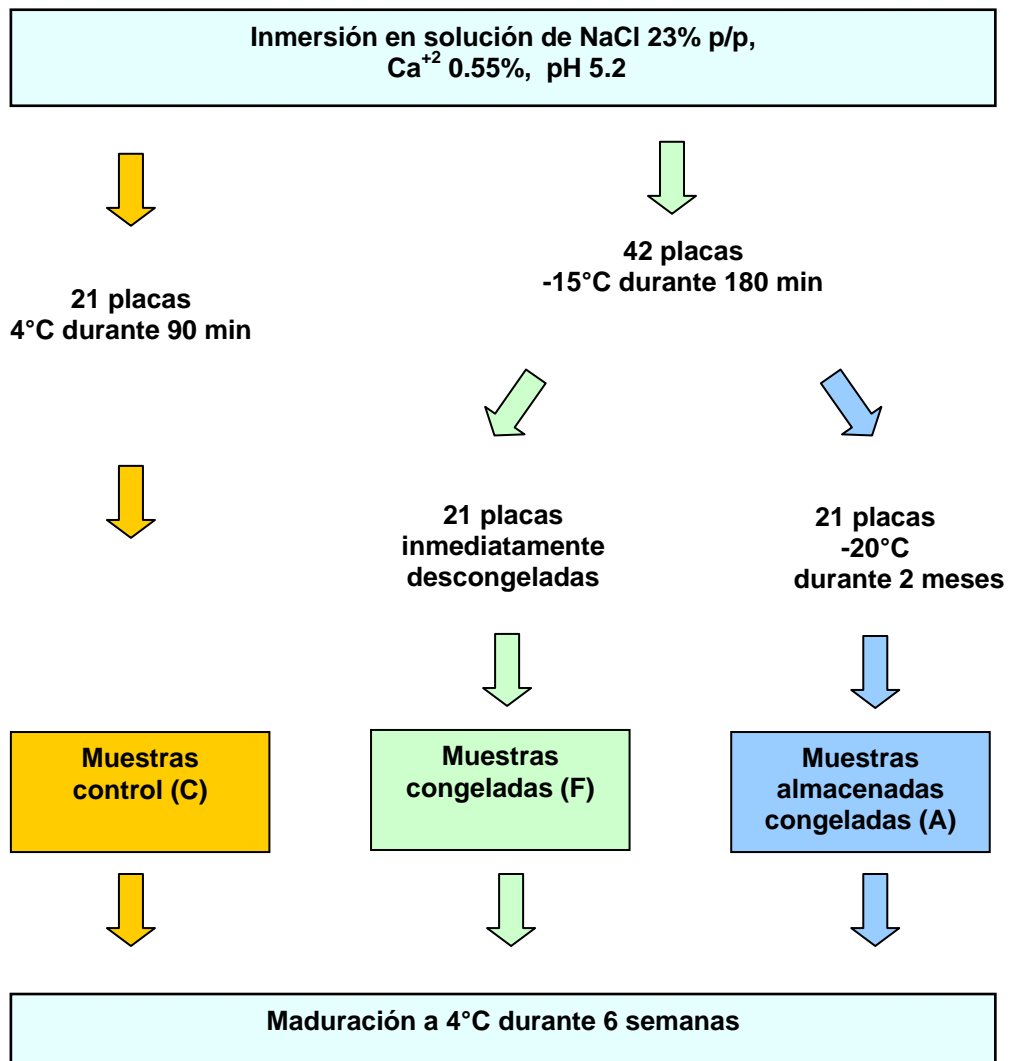


Figura 3.2. Definición de los tratamientos.

Perfiles de temperatura central. En el caso de los tratamientos en que se congelaron las muestras, se realizaron determinaciones de perfiles de temperatura en el centro geométrico de las placas. En placas de queso se insertó una termocupla T de 30 AWG (OMEGA Engineering, Inc., Stamford, CT, USA) siguiendo el eje principal de la barra hasta una profundidad de 1 cm. Cada placa se colocó en una pequeña canasta construida con tela plástica para permitir el ingreso de la solución y evitar que la placa flote cuando se sumerge en la solución de NaCl a -15°C . Los valores de temperatura fueron obtenidos a través de un sistema de adquisición de datos Data Shuttle DS-16-8-TC (OMEGA Engineering, Inc., Stamford, CT, USA) con una velocidad de 1 s^{-1} . Además para comparar la velocidad de congelación por inmersión con respecto a la congelación en aire, se congelaron placas de queso en aire a -16°C y se determinaron los perfiles de temperatura central. En la Figura 3.3 se observan dichos perfiles de temperatura central.

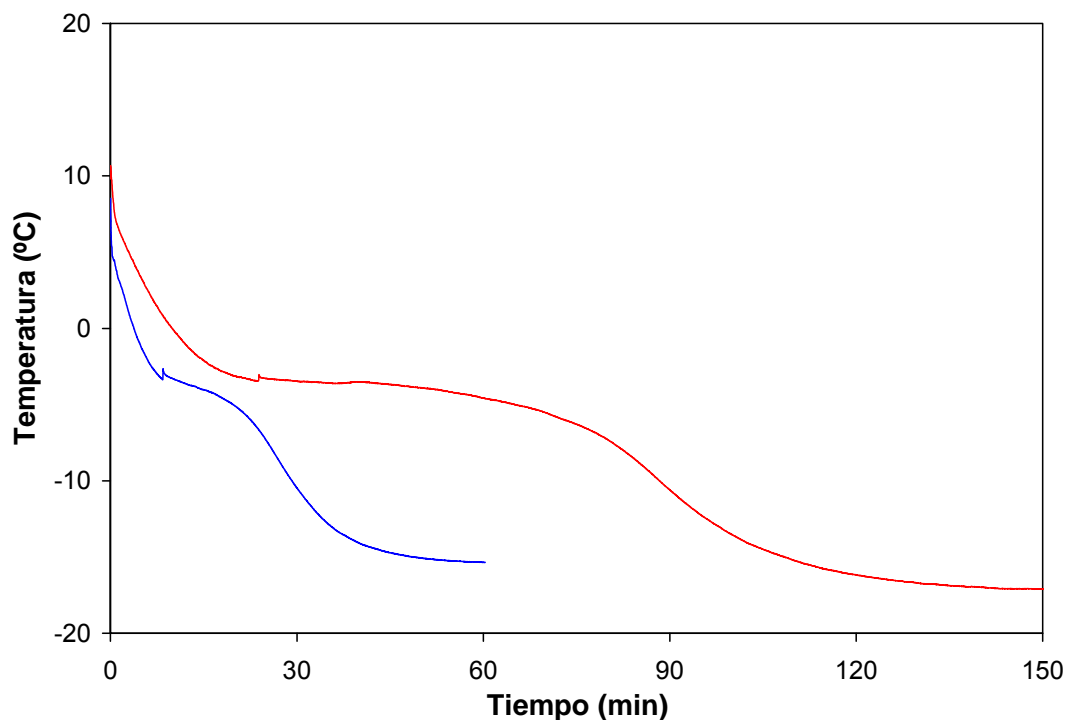


Figura 3.3. Perfiles de temperatura central de placas de queso Mozzarella. Azul: Congelación por inmersión en NaCl 23% a -15°C , rojo: Congelación en aire estanco a -16°C .

3.5. Ensayos fisicoquímicos

La mitad de placa destinada a los ensayos fisicoquímicos y al seguimiento de la proteólisis fue triturada para su análisis (Figura 3.4). Los ensayos fisicoquímicos realizados se listan a continuación.

Contenido de humedad. Se determinó por duplicado en un horno microondas CEM AVC 80 (CEM, Mattheus, NC, USA).

Contenido de cloruro. Se determinó por quintuplicado según Fox (1963) con un titulador automático modelo DL40 RC (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Suiza).

Contenido de nitrógeno total (NT). Se determinó por duplicado utilizando el método de Kjeldahl según el procedimiento establecido por Büchi Labortechnik AG (1998), utilizando un digestor automático Büchi 430, una unidad de destilación Büchi 322, una unidad de control Büchi 342 (Büchi, Flawil, Suiza) y un titulador automático Mettler DL40 RC (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Suiza).

Fracción soluble en agua a pH 4.6 (FS). Se obtuvo utilizando el método propuesto por Kuchroo y Fox (1982). Una muestra de 20 gr de queso rallado se homogeneizó con 30 mL de agua destilada con un triturador Ultra-Turrax T25 (IKA Werke, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Alemania) durante 2 min a una velocidad máxima de 16000 rpm y temperatura ambiente. La mezcla obtenida se trasvasó a un vaso de precipitado y se dejó reposar en baño a 40°C durante 1 h. Se llevó a pH 4.6 con HCl 1 N agitando continuamente hasta obtener una lectura estable durante 5 min. Se centrifugó 30 min a 5°C y una velocidad de 4800 rpm utilizando una centrífuga Biofuge 28 RS (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Alemania). Luego de eliminar la capa superficial de grasa se separó el sobrenadante del precipitado, descartándose este último. El sobrenadante se trasvasó a un matraz aforado y se llevó a volumen final de 100 mL con agua destilada. Por último, se filtró con papel Whatman N° 42 (Whatman Int. Ltd., Maidstone, Reino Unido), constituyendo el filtrado recogido la fracción soluble en agua a pH 4.6. La fracción FS se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

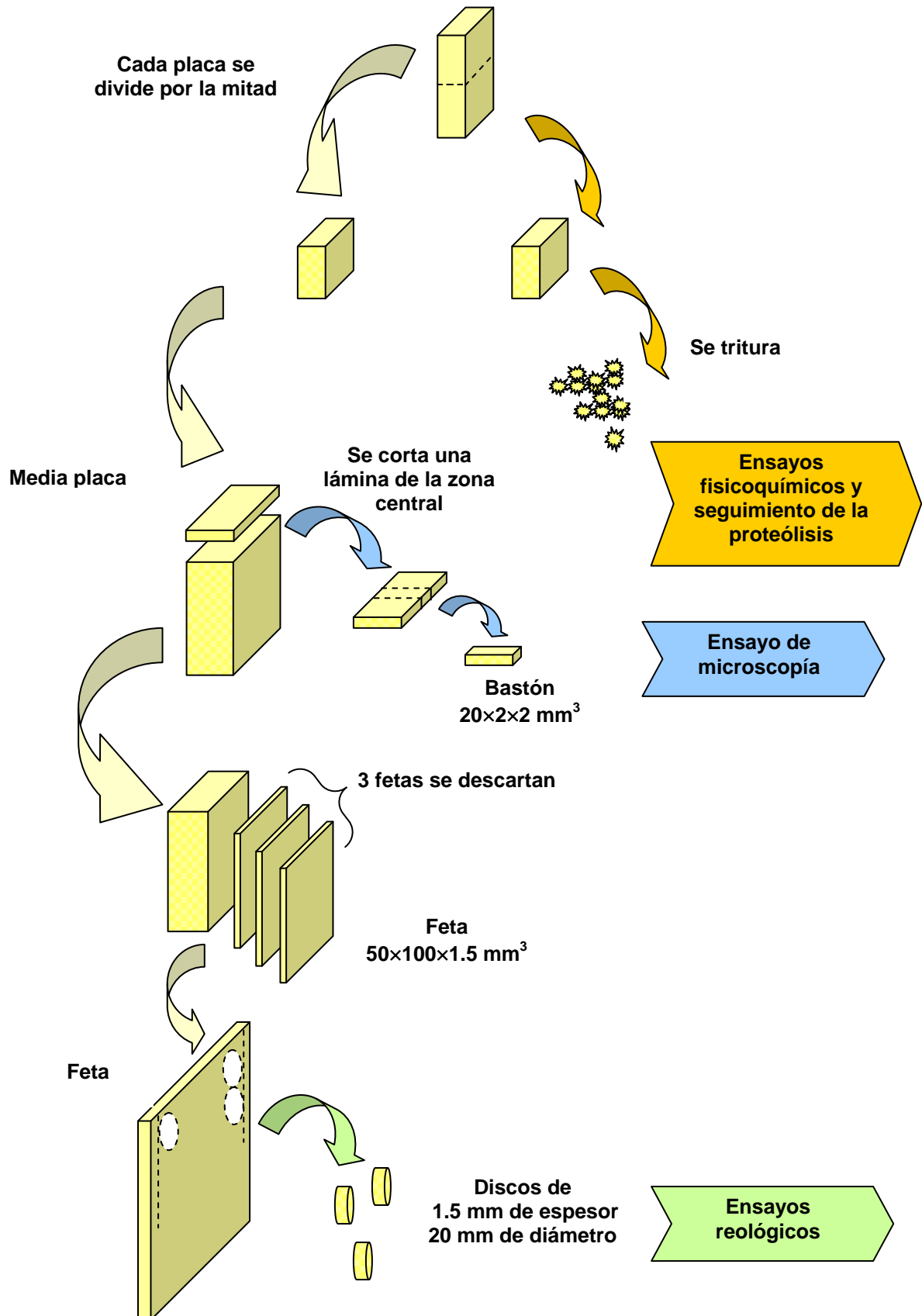


Figura 3.4. Obtención de las muestras para sus respectivos análisis.

Contenido de nitrógeno en la FS (NS). Se determinó por duplicado utilizando el método de Kjeldahl según el procedimiento descrito para la determinación del contenido de nitrógeno total.

pH. Se determinó por duplicado utilizando un electrodo para alimentos sólidos (PH Spear, OAKTON Instruments, Vernon Hills, IL, USA).

3.6. Seguimiento de la proteólisis

Índice de maduración (IM). Se determinó como el porcentaje del contenido de nitrógeno en la FS referido al contenido total de nitrógeno en el queso.

Ensayo electroforético. La obtención de los extractos de cada muestra y el análisis electroforético de los mismos se realizó según la técnica propuesta por Zorrilla (1993). Aproximadamente 3 g de queso rallado se disolvieron en 25 mL de urea 8.66 M. Los extractos se desgrasaron por una filtración en frío y el filtrado se conservó a -20°C . Se empleó el método de electroforesis vertical con gel de poliacrilamida (urea-PAGE) utilizando buffers anódicos discontinuos. Los geles fueron preparados siguiendo la propuesta de McKenzie (1971). Se utilizó un equipo de electroforesis LKB-2001, fuente de potencia LKB-2197, baño termostático con circulación forzada LKB-2219 (LKB Produkter AB, Bromma, Suecia). Se trabajó con una intensidad de corriente constante de 50 mA y a 14°C . Para observar el frente de corrida se utilizó azul de bromofenol. La tinción de los geles se llevó a cabo con Coomassie Blue R (LKB Produkter AB, Bromma, Suecia). La decoloración se realizó mediante repetidos lavados con soluciones compuestas por ácido acético, etanol y agua. Los geles fueron deshidratados con una unidad de placa secadora de geles LKB-2003 (LKB Produkter AB, Bromma, Suecia). El análisis cuantitativo de las bandas obtenidas se realizó sobre los geles deshidratados y escaneando con el programa Gel-Pro ANALIZER 3.0 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, USA). La densidad óptica absoluta integrada (IOD: área debajo de la curva de densidad óptica) de cada pico se obtuvo analizando cada banda del gel en 3 posiciones. Se consideró una relación lineal entre el área de pico y la concentración de la banda (Lesage *et al.*, 1993). La identificación de las bandas de α_{S1} y β -caseínas se realizó por comparación con patrones comerciales (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). La Tabla 3.2 resume las condiciones de la técnica analítica utilizada en electroforesis.

Tabla 3.2. Condiciones utilizadas para el análisis electroforético.

Gel de poro grueso	Acrilamida 5%, HCl 0.06 M, Tris 0.062 M, urea 4 M, BIS 6.3 g/L, TEMED 0.58 mL/L, riboflavina 0.005 g/L, pH 6.7
Gel de poro fino	Acrilamida 7%, HCl 0.06 M, Tris 0.377 M, urea 4 M, BIS 1.84 g/L, TEMED 0.29 mL/L, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 0.7 g/L, pH 8.9
Testigo	Testigo 5 mg en 3.8 mL buffer Tris-glicina pH 8.3 + 200 µL azul de bromofenol + 50 µL β-mercaptoetanol; volumen de siembra: 25 µL
Muestra	60 µL Muestra + 200 µL buffer Tris-glicina pH 8.3 + 10 µL azul de bromofenol + 50 µL β-mercaptoetanol; volumen de siembra: 25 µL
Tinción	100 mL ác. acético 10% + 100 mL de colorante concentrado
Decoloración	1) 200 mL EtOH 95% + 300 mL ác. acético 5%, tiempo: 1 – 2 h 2) 150 mL EtOH 95% + 350 mL ác. acético 5%, tiempo: 1 – 2 h 3) se repite el paso 2, tiempo: 1 – 2 h 4) 100 mL EtOH 95% + 400 mL ác. acético 5%, tiempo: 2 h
Secado	Se colocan 3 ó 4 gotas de glicerol puro en cada gel. Los films se humedecen en solución de glicerol 10%; tiempo: 105 min

Ensayo cromatográfico. Los componentes nitrogenados incluidos en la fracción soluble en agua a pH 4.6 fueron separados por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), usando un equipo Waters Serie 1500, con detector de absorbancia dual Waters 2487, degasificador en línea AF, inyector automático Waters 717plus y un software Waters Breeze Systems (Waters, Milford, MA, USA). Se usó una columna C18 (250 x 4.6 y 300 Å de diámetro de poro) Chrompack HPLC (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) mantenida a 30°C utilizando un controlador Eppendorf TC-50 (Eppendorf North America Inc., Madison, WI, USA).

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando un gradiente binario, con solvente A (0.1% ácido trifluoroacético en agua bidestilada) y solvente B (0.1% ácido trifluoroacético en acetonitrilo:agua bidestilada, 60:40). La proporción del solvente B en la mezcla de elución fue inicialmente 0%, la cual fue mantenida durante 10 min en forma isocrática, luego se incrementó desde 0 hasta 80% de B en 80 min en forma lineal y se finalizó en forma isocrática durante 15 min con 80% de B. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad HPLC. La fracción FS se filtró a través de una membrana de nylon de 0.2 μm Alltech (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA). El volumen de inyección fue de 100 μL y la velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} . La absorbancia fue monitoreada a una longitud de onda de 220 nm. Se realizó una corrida cromatográfica por cada FS obtenida.

3.7. Ensayos reológicos

De la mitad de la placa destinada a los ensayos reológicos y de microscopía, se cortaron fetas de aproximadamente 1.5 mm de espesor. Se descartaron las tres primeras fetas, mientras que las siguientes se guardaron entre separadores de nylon para evitar la deshidratación y se mantuvieron refrigeradas hasta su análisis. Con un sacabocados de metal se cortaron discos de 20 mm de diámetro, obtenidos a una distancia no menor a 10 mm del borde exterior de la feta (Figura 3.4).

Los ensayos reológicos se realizaron en un Reómetro Haake RheoStress RS80 (HAAKE Instrument Inc., Paramus, NJ, USA), trabajando en modo oscilatorio con geometría plato-plato de 20 mm de diámetro, 1 mm de distancia entre los platos y a una frecuencia de oscilación fija de 1 Hz. Se utilizó aceite siliconado de 20 cp alrededor del disco para evitar la pérdida de humedad de las muestras durante el ensayo reológico. La temperatura de la placa inferior del sistema de medición fue mantenida por circulación de agua desde un baño termostático.

Los datos obtenidos mediante el reómetro incluyen dos componentes del módulo complejo (G^*), el módulo de almacenamiento (G'), que representa la habilidad de almacenar energía mientras se mantiene la integridad estructural (componente elástica) y el módulo de pérdida (G''), que constituye una medida de la energía que se disipa (componente viscosa). Estos parámetros están relacionados mediante la siguiente ecuación:

$$|G^*|^2 = (G')^2 + (G'')^2 \quad (3.1)$$

Barridos de deformación. Se realizaron barridos de amplitud de deformación (γ_0) desde 0.001 hasta 0.1, a temperaturas de 20, 40 y 60°C, para determinar la región de viscoelasticidad lineal.

Barridos de temperatura. Se realizaron barridos de temperatura desde 20 a 65°C ($1.33^\circ\text{C min}^{-1}$) con una amplitud de deformación de $0.005 \pm 5 \times 10^{-5}$. Estos ensayos permitieron obtener la propiedad $\tan \delta$ ($\tan \delta = G''/G'$) variando con la temperatura y la temperatura a la cual los módulos de almacenamiento y de pérdida son iguales ($G' = G''$), denominada temperatura de cruce.

Se estudió además el efecto de la temperatura sobre la viscosidad compleja η^* ($|\eta^*| = G^* / \omega$, ω : frecuencia de oscilación) mediante una ecuación tipo Arrhenius,

$$\eta^* = A_{VISC} \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (3.2)$$

donde A_{VISC} es el factor pre-exponencial, E_a es la energía de activación (cal mol^{-1}), R es la constante de los gases ($1.9872 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T es la temperatura (K) (Rao, 1999; Tunick, 2000).

3.8. Ensayo de microscopía

La microestructura se estudió a través de la microscopía electrónica de barrido de acuerdo a la técnica propuesta por Kuo y Gunasekaran (2003) para las muestras obtenidas a 1, 14 y 41 días de maduración.

De la mitad de la placa destinada a los ensayos reológicos y de microscopía, se obtuvo una lámina de 2 mm de espesor de la zona central de la placa, de donde se obtuvo un bastón de $20 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ (Figura 3.4). Los bastones se sumergieron en una solución de glutaraldehído 2.8% en buffer fosfato 0.05 M (pH 6) por 48 h a 4°C, se deshidrataron en soluciones acuosas de etanol de 25, 50, 70, 80, 95, 100, 100 y 100%, permaneciendo 30 min en cada solución, se desgrasaron por inmersión en cloroformo durante 30 min (3 veces) y se lavaron con alcohol absoluto durante 30 min (3 veces). Luego, se realizó criofractura de los bastones con aire líquido, los especímenes resultantes se adhirieron con pintura de plata sobre portamuestras metálicos y se recubrieron con oro depositado por *sputtering* empleando un evaporador de laboratorio Veeco VE-300 (Veeco Instruments Inc., Long Island, NY, USA), operado en atmósfera de argón. Los especímenes fueron adheridos sobre

los portamuestras para que la observación sea realizada sobre la superficie resultante de la criofractura. Cabe mencionar que la metodología usada para la obtención de los especímenes permite que la observación por microscopía sea realizada aproximadamente en el centro geométrico de las placas. Los especímenes se examinaron con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-35C (JEOL Ltd., Tokio, Japón). La observación se realizó bajo el modo de imágenes de electrones secundarios utilizando una tensión de aceleración de 20 kV, a distintas magnificaciones (X): 120, 400 y 1200. En resumen, para cada tratamiento y cada tiempo de maduración se realizaron observaciones sobre 3 especímenes, cada uno obtenido de diferente placa de queso, y a 3 magnificaciones diferentes.

3.9. Análisis estadístico

3.9.1. Análisis de la variancia

La información obtenida del análisis fisicoquímico, del seguimiento de la proteólisis y de los ensayos reológicos de las muestras se evaluaron por el método de ANOVA. Se determinó la influencia en la variación de los parámetros medidos debido a los siguientes factores: tipo de tratamiento y tiempo de maduración. Además del efecto individual de cada factor se evaluó la interacción entre los mismos. Cuando el efecto de algún factor resultó significativo ($p < 0.05$), se realizó una comparación múltiple de medias utilizando el test de Tukey. Para realizar el ANOVA se usó Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA), mientras que para la comparación múltiple de medias se usó Statgraphics 3.0 (Statgraphics Inc., Rockville, MD, USA).

3.9.2. Análisis multivariado

Las técnicas analíticas utilizadas frecuentemente en el área de la química suelen generar grandes grupos de datos, producto de las mediciones realizadas para un número determinado de variables sobre un gran número de muestras. El manejo e interpretación de estos datos para extraer la información más relevante requiere del uso de los llamados Métodos de Análisis Multivariado (MVA).

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una de las técnicas de análisis multivariado más antigua y más utilizada. El análisis se aplica para reducir gran cantidad de datos que se obtiene, por ejemplo de los cromatogramas, con

mínima pérdida de información. PCA se basa en la combinación lineal de las variables medidas para producir variables derivadas denominadas componentes principales (PCs) los cuales son mutuamente ortogonales en el espacio de los componentes principales (Gardiner, 1997). Una adecuada condensación de la información se logra cuando una pequeña cantidad de PCs explica al menos el 80 a 90% de la variabilidad total (Everitt y Dunn, 2001).

Como resultados de PCA se obtienen los PC_i scores o puntaje de la muestra para el componente principal i , y los PC_i loadings o carga factorial de cada variable original al componente principal i . El análisis de los PC_i score da una idea del agrupamiento de las muestras en el espacio de los PCs de acuerdo a similitudes en sus características. Los PC_i loading son los coeficientes utilizados para construir los correspondientes PC scores derivados desde las variables medidas originales. Por lo tanto, los PC_i loading muestran la influencia de las variables originales en los componentes principales. Cuanto mayor resulta el valor de PC_i loading (positivo o negativo), mayor es su influencia en el agrupamiento de las muestras (Gardiner, 1997).

PCA resulta una herramienta útil para simplificar el análisis de los perfiles cromatográficos. Pripp *et al.* (2000) demostraron que el análisis estadístico multivariado de los perfiles cromatográficos resultó ser una herramienta de mayor poder y objetividad que el análisis visual de los mismos, para evaluar la proteólisis durante la maduración de quesos. PCA es una herramienta muy importante para la interpretación de gran cantidad de complejos grupos de datos, y además los modelos de PCA pueden ser usados para relacionar datos experimentales con parámetros tecnológicos de la elaboración de quesos, por ejemplo: efecto de la temperatura para el tratamiento térmico de la leche y de la temperatura de maduración de los quesos (Benfeldt y Sørensen, 2001)

En este estudio se usó la matriz de correlación para la aplicación de PCA de manera que todos los picos fuesen considerados con la misma importancia (Pripp *et al.*, 2000). Además se realizó una selección de picos a analizar considerando una medida de suficiencia de muestreo (MSA) de 0.7 o superior y los valores de comunalidad mayores a 0.5 (Hair *et al.*, 1999). Para realizar el análisis multivariado se utilizó el programa Minitab (Minitab Inc., State College, PA, USA).

CAPÍTULO 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayos fisicoquímicos

Los valores promedios de los parámetros fisicoquímicos obtenidos se muestran en la Tabla 4.1, mientras que los valores de las determinaciones individuales se informan en el Anexo D.

Contenido de humedad. Los valores del contenido de humedad obtenidos se muestran en la Figura 4.1. Se observa que los mismos se encuentran en el rango de valores normales para este tipo de queso (CAA, 2006).

De acuerdo al análisis estadístico se observó un efecto significativo del tiempo de maduración ($F= 17.19$, $p= 0.0000$), del tratamiento ($F= 278.73$, $p= 0.0000$) y de la interacción ($F= 3.13$, $p= 0.0008$). Las diferencias observadas por efecto del tiempo de maduración y de la interacción se deben principalmente a la precisión de la determinación y no se pudo observar una tendencia definida por efecto de estos factores.

Se observó que las muestras control tuvieron un contenido de humedad promedio menor que las muestras congeladas y almacenadas congeladas ($47.7\pm 0.7\%$ p/p y $49.3\pm 0.4\%$ p/p, respectivamente).

Contenido de cloruro. Los valores del contenido de cloruro obtenidos se muestran en la Figura 4.2. Dado que la incorporación de sal se realizó por un proceso de inmersión, en piezas de queso pequeñas y contenido de humedad alto, existen importantes gradientes de concentración entre la superficie y el centro de la muestra fundamentalmente al comienzo de la maduración. Además, la determinación de cloruro necesita poca cantidad de muestra. Por lo tanto, la determinación de cloruro se realizó por quintuplicado para mejorar la precisión del método. Dado que las muestras tuvieron diferente contenido de humedad y que el NaCl se encuentra en esta fracción, se informa el contenido de cloruro como contenido de cloruro en la humedad del queso. Los valores de contenido de cloruro en la humedad se encuentran en el rango de valores normales para este tipo de queso (Diefes *et al.*, 1993; Yun *et al.*, 1993 a y b; Guo y Kindstedt, 1995; Bertola *et al.*, 1996a; Subramanian y Gunasekaran, 1997a; Chaves *et al.*, 1999; McMahon *et al.*, 1999; Muthukumarappan *et al.*, 1999; Guinee *et al.*, 2001).

Resultados y discusión

Tabla 4.1. Valor promedio y desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos para los tratamientos estudiados. Los valores se determinaron considerando 3 placas de queso y las correspondientes repeticiones de cada ensayo fisicoquímico.

Tratamiento	Tiempo (días)	Contenido de humedad (g/100 g de queso)	Contenido de cloruro en la humedad (g/100 g de humedad)	Contenido de proteína total (g/100 g de queso)	Contenido de proteína soluble (g/100 g de queso)	pH
C	1	47±1	2.40±0.05	23.9±0.5	0.62±0.06	5.24±0.04
	7	47.5±0.2	2.39±0.07	23.3±0.9	0.84±0.07	5.26±0.05
	14	48.3±0.7	2.43±0.04	22.9±0.6	1.07±0.05	5.31±0.05
	20	47.65±0.04	2.42±0.02	22.8±0.6	1.18±0.09	5.33±0.04
	27	47.9±0.1	2.45±0.05	23±1	1.35±0.06	5.28±0.01
	34	48.0±0.4	2.48±0.04	22.9±0.7	1.48±0.09	5.272±0.004
	41	47.7±0.2	2.46±0.02	23.4±0.1	1.69±0.05	5.27±0.02
F	1	49.1±0.2	2.62±0.08	23±1	0.65±0.02	5.33±0.02
	7	49.2±0.5	2.65±0.09	22.2±0.8	0.86±0.06	5.27±0.07
	14	49.9±0.1	2.77±0.09	21.9±0.3	1.07±0.03	5.253±0.005
	20	49.3±0.2	2.60±0.07	22.3±0.6	1.16±0.09	5.29±0.02
	27	49.2±0.2	2.61±0.09	21.4±0.8	1.36±0.06	5.31±0.02
	34	49.0±0.2	2.70±0.06	22.1±0.7	1.47±0.05	5.270±0.006
	41	49.4±0.3	2.69±0.05	21.9±0.5	1.51±0.06	5.275±0.008
A	1	48.7±0.5	2.71±0.05	22.4±0.5	0.68±0.04	5.21±0.02
	7	49.3±0.2	2.85±0.07	22.4±0.7	0.92±0.04	5.22±0.01
	14	49.8±0.3	2.83±0.02	21.3±0.9	1.05±0.07	5.257±0.008
	20	49.6±0.1	2.70±0.06	22.4±0.4	1.35±0.09	5.31±0.01
	27	49.07±0.08	2.8±0.1	22.0±0.4	1.43±0.06	5.33±0.01
	34	49.7±0.3	2.7±0.1	22.0±0.4	1.58±0.07	5.37±0.02
	41	49.3±0.3	2.74±0.06	22.1±0.6	1.69±0.08	5.38±0.02

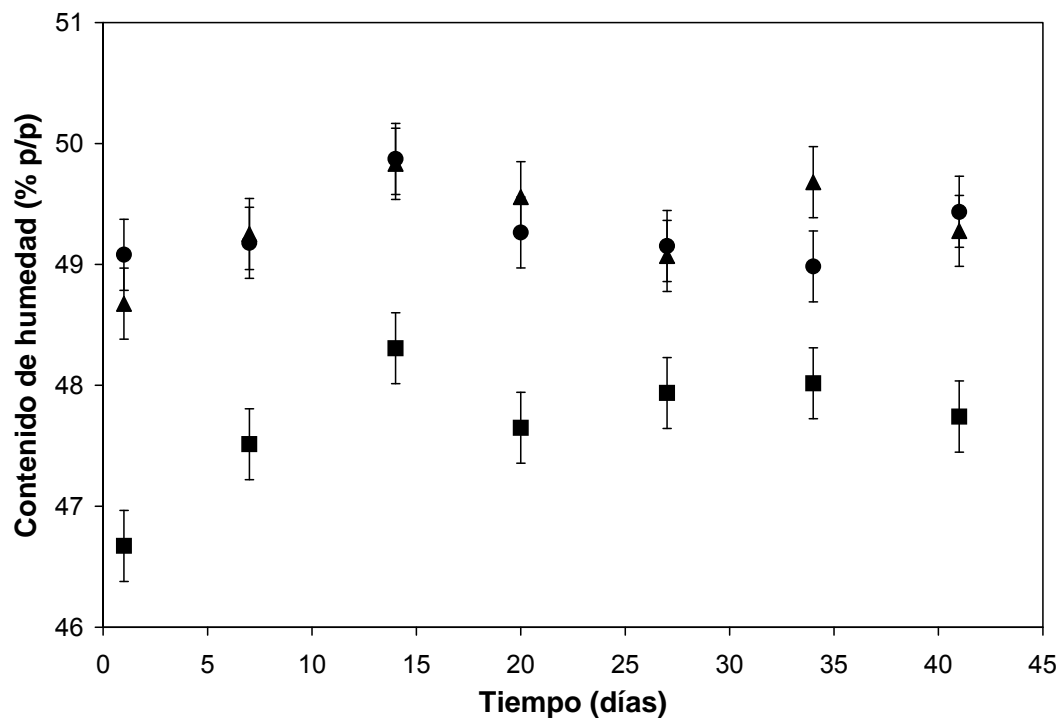


Figura 4.1. Contenido de humedad en las muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲) durante el tiempo de maduración estudiado. Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

De acuerdo al análisis estadístico se observó un efecto significativo del tiempo de maduración ($F= 10.87$, $p= 0.0000$), del tratamiento ($F= 634.99$, $p= 0.0000$) y de la interacción ($F= 7.13$, $p= 0.0000$). Las diferencias observadas por efecto del tiempo de maduración y de la interacción se deben principalmente a la precisión de la determinación y no se pudo observar una tendencia definida por efecto de estos factores.

Se observó un contenido de cloruro en la humedad promedio de $2.43 \pm 0.05\%$ p/p, $2.66 \pm 0.09\%$ p/p y $2.8 \pm 0.1\%$ p/p en las muestras control, congeladas y almacenadas congeladas, respectivamente. Los tiempos de inmersión de cada tratamiento fueron estimados por las predicciones del modelo teórico (Anexo C) para alcanzar una concentración similar entre las muestras. Se debe tener en cuenta que existe un error asociado a la predicción debido a las suposiciones intrínsecas del modelo y a la determinación de las propiedades físicas del sistema y por lo tanto estas diferencias son esperables. Cabe mencionar que la diferencia de

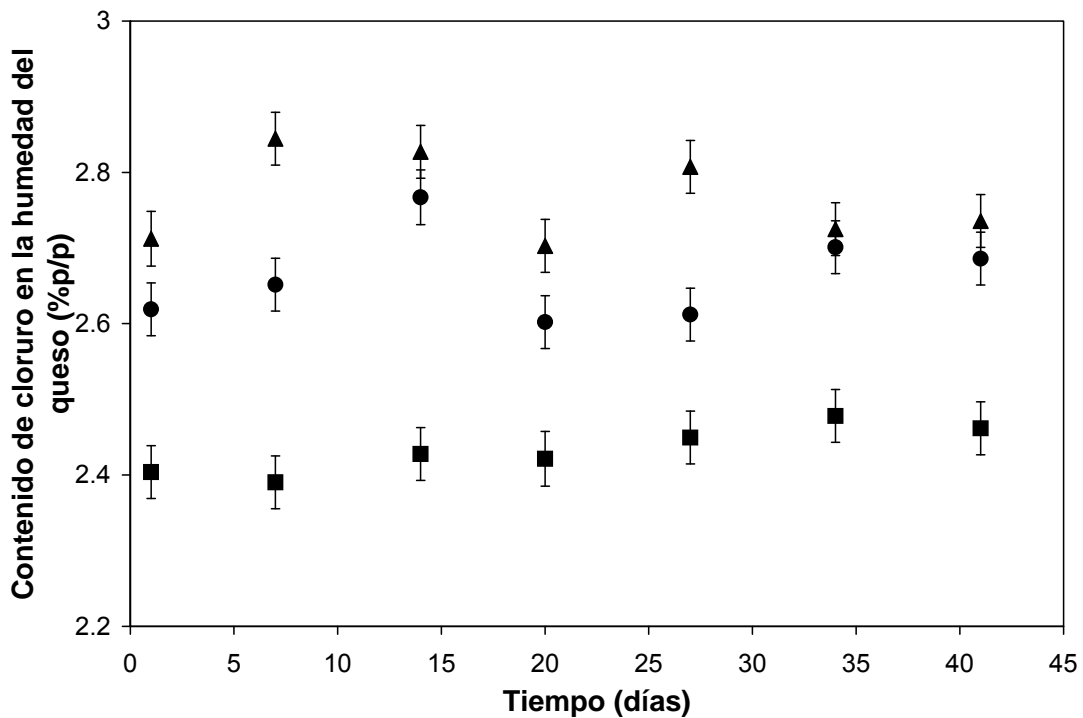


Figura 4.2. Contenido de cloruro en la humedad del queso en las muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲) durante el tiempo de maduración estudiado. Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

concentración observada es pequeña si se evalúa el efecto del NaCl sobre los principales parámetros fisicoquímicos del queso (Noomen, 1978; Olson, 1982; Cervantes, 1983). Noomen (1978) observó que el efecto del NaCl en el rango de 1.8 a 2.5% NaCl en la humedad de un queso simulado no provoca un cambio apreciable en la proteólisis de la α_{s1} -caseína y de la β -caseína por parte de los principales agentes proteolíticos. Olson (1982), evaluando el efecto del nivel de sal en las características del queso Mozzarella antes y después de su almacenamiento congelado, observó que un contenido de sal entre 0.25 y 2.4% NaCl no provoca una diferencia en la cantidad de hielo formado como para observar diferencias texturales. Cervantes (1983), evaluando un ciclo de congelación y descongelación, tampoco observó diferencias en la textura de quesos Mozzarella de 24 días de maduración y un contenido de sal entre 1.0 y 2.4%.

Contenido de NT y NS. Los valores promedios y las desviaciones estándar del contenido de proteína total y soluble para los tratamientos estudiados se muestran

en la Tabla 4.1. La discusión asociada a los contenidos de nitrógeno total y en la fracción soluble se realizará más adelante a través del índice de maduración.

pH. Los valores del pH obtenidos se muestran en la Figura 4.3. Los valores de pH se encuentran en el rango de valores normales para este tipo de queso (Yun *et al.*, 1993d). Cabe mencionar que la determinación de pH se realizó fundamentalmente como un método de control del proceso de maduración, ya que el desarrollo de ciertos microorganismos en el queso (por ejemplo, hongos) provoca el aumento de pH durante la maduración.

De acuerdo al análisis estadístico se observó un efecto significativo del tiempo de maduración ($F= 17.91$, $p= 0.0000$), del tratamiento ($F= 3.47$, $p= 0.0348$) y de la interacción ($F= 18.44$, $p= 0.0000$). Las diferencias observadas se atribuyen a la precisión del método de determinación de pH. De la comparación múltiple de medias no pudo observarse una variación notable en el pH como para establecer una tendencia definida por efecto de los factores estudiados, ya que las diferencias significativas fueron menores a 0.06 unidades de pH.

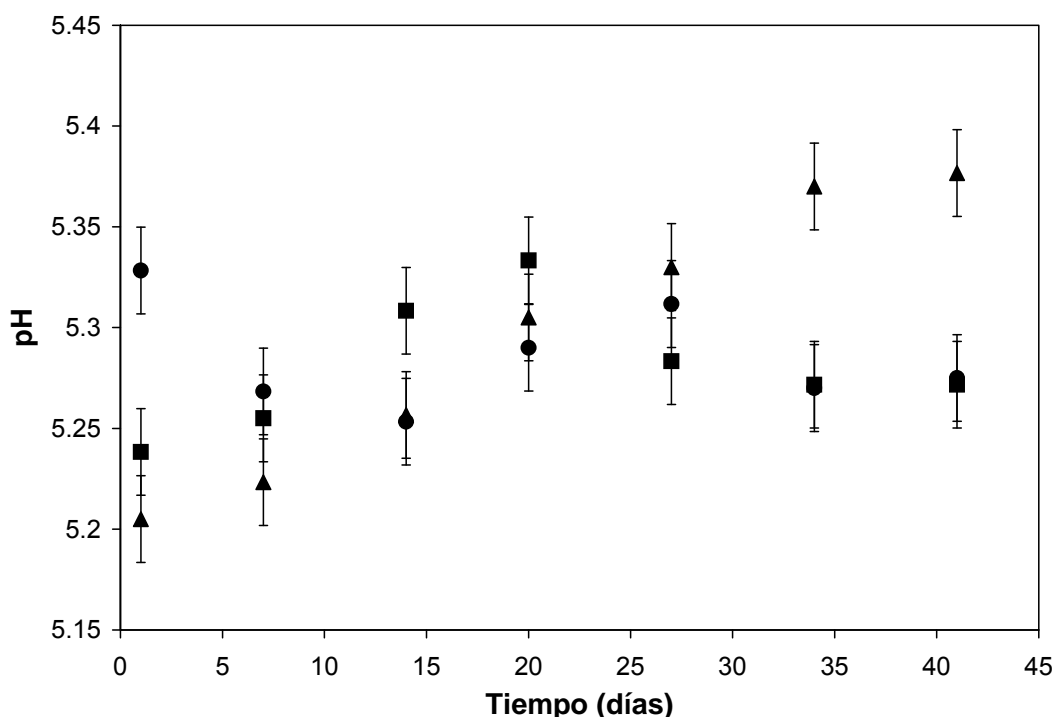


Figura 4.3. Valor de pH en las muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲) durante el tiempo de maduración estudiado. Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

4.2. Seguimiento de la proteólisis

Índice de maduración (IM). Los valores promedio y las desviaciones estándar del IM para los tratamientos estudiados se muestran en la Tabla 4.2. Para cada muestra el IM se calculó como la relación entre el contenido de NS y el promedio del contenido de NT de la muestra. Los perfiles de IM se muestran en la Figura 4.4.

Tabla 4.2. Valor promedio y desviación estándar del IM (%) para los tratamientos estudiados.

Tiempo (días)	Muestras control	Muestras congeladas	Muestras almacenadas congeladas
1	2.6±0.2	2.8±0.2	3.0±0.3
7	3.6±0.3	3.9±0.3	4.1±0.2
14	4.7±0.1	4.9±0.2	4.9±0.4
20	5.2±0.4	5.2±0.4	6.0±0.4
27	6.0±0.2	6.3±0.4	6.5±0.3
34	6.5±0.5	6.6±0.3	7.2±0.2
41	7.2±0.2	6.9±0.4	7.7±0.4

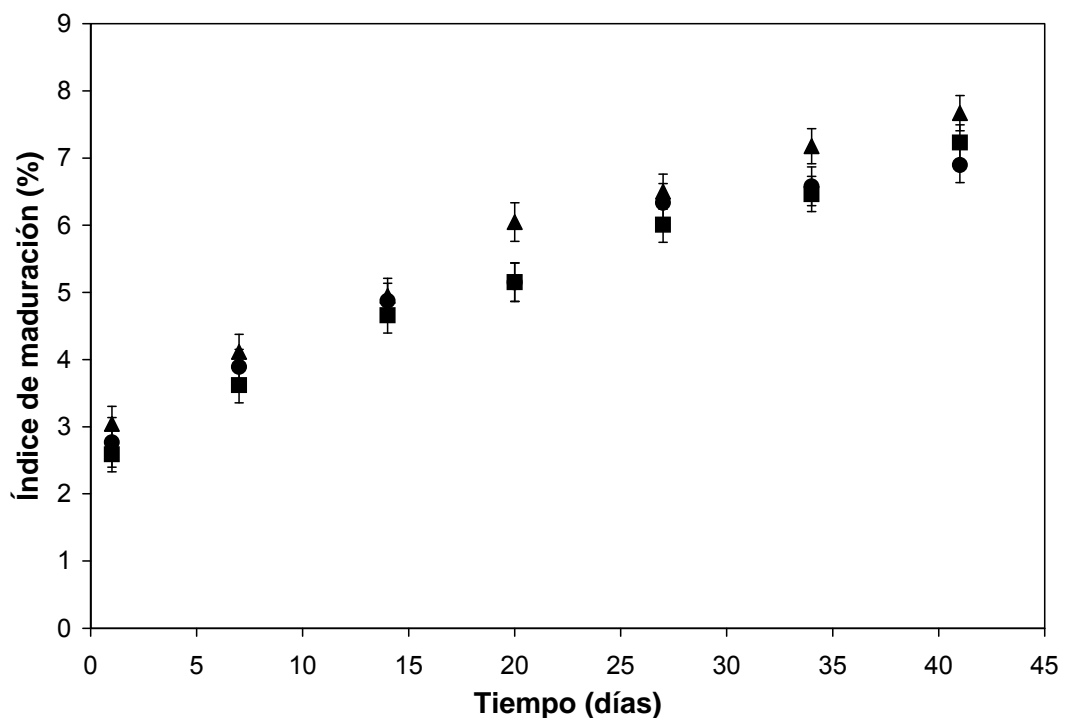


Figura 4.4. Índice de maduración en las muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲) durante el tiempo de maduración estudiado. Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

De acuerdo al análisis estadístico se observó un efecto significativo del tiempo de maduración ($F= 391.57$, $p= 0.0000$) y del tratamiento ($F= 31.44$, $p= 0.0000$), pero no de la interacción entre los factores ($F= 1.73$, $p= 0.0720$). El índice de maduración aumenta durante el tiempo de maduración estudiado, aproximadamente desde 2.8 a 7.3%. No se pudo observar una tendencia definida por efecto del tratamiento.

Ensayo electroforético. La electroforesis fue usada para caracterizar las proteínas y péptidos en el extracto en urea 8.66 M de los quesos durante la maduración. Algunos perfiles electroforéticos característicos se observan en las Figuras 4.5 y 4.6. Se identificaron cinco fracciones con movilidades diferentes en las distintas muestras analizadas (en orden creciente de movilidad): región de las γ -caseínas, β -caseína, α_{S1} -caseína, α_{S1} -I-caseína y la fracción F1 (Tabla 4.3). En el Anexo D se informan los valores de las determinaciones individuales. Las γ -caseínas provienen de la degradación de la β -caseína por acción de la plasmina y constituyen la fracción de menor movilidad. McSweeney y Fox (1997) trabajando con extractos insolubles de queso Cheddar determinaron que los péptidos que provienen de la

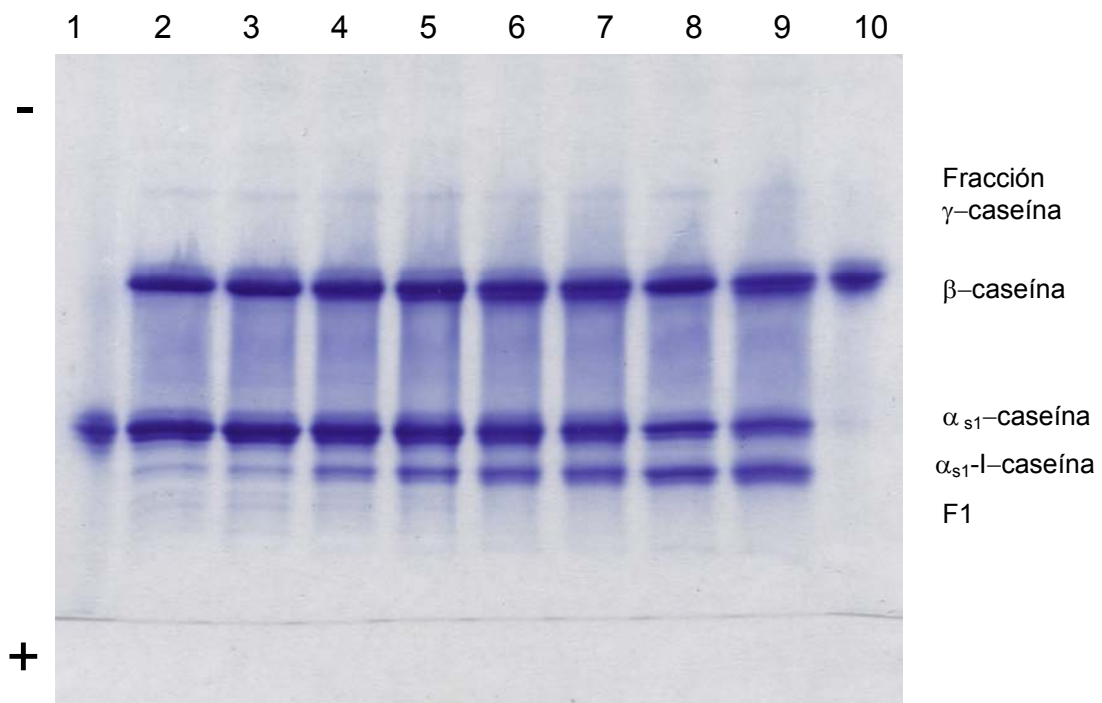


Figura 4.5. Electroforetograma de: 1: patrón de α_{S1} -caseína; 2: muestra inicial; 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9: muestras control correspondientes a 1, 7, 14, 20, 27, 34 y 41 días de maduración, respectivamente; 10: patrón de β -caseína.

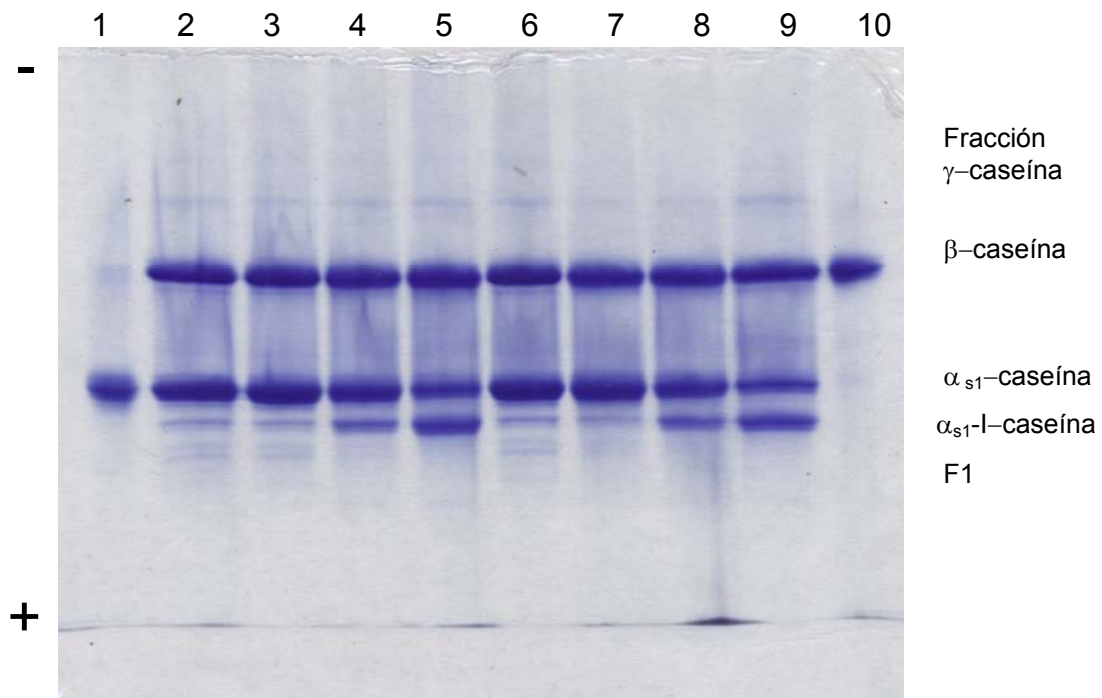


Figura 4.6. Comparación de tratamientos. 1: patrón de α_{s1} -caseína; 2 y 6: muestra inicial; 3, 4 y 5: muestras congeladas a 1, 14 y 41 días de maduración; 7, 8 y 9: muestras almacenadas congeladas a 1, 14 y 41 días de maduración; 10: patrón de β -caseína.

degradación de la α_{s1} -caseína poseen mayor movilidad electroforética que la α_{s1} -caseína. Por lo tanto, puede considerarse que la fracción F1 corresponde a productos de degradación de la α_{s1} -caseína.

El análisis electroforético de muestras congeladas y almacenadas congeladas se compara en la Figura 4.6, observándose patrones de degradación muy similares. Estadísticamente, no hay diferencias entre los tratamientos para cada una de las fracciones.

En la Figura 4.7 se observan los perfiles de las fracciones de α_{s1} , α_{s1-l} y β -caseína de las muestras control, congeladas y almacenadas congeladas durante el tiempo de maduración estudiado. Se observa que la α_{s1} -caseína disminuye, acompañada por el aumento de la fracción α_{s1-l} -caseína, lo cual es coincidente con el aumento del contenido de nitrógeno soluble.

Tabla 4.3. Valor promedio de la densidad óptica absoluta integrada (IOD) por g de queso y desviación estándar de las fracciones determinadas por urea-PAGE para los tratamientos estudiados.

Tratamiento	Tiempo (días)	γ -caseína	β -caseína	α_{S1} -caseína	α_{S1} -I-caseína	F1
C	1	2.4 ± 1.4	75.4 ± 10.6	88.3 ± 5.6	8.8 ± 1.0	4.2 ± 1.0
	7	1.7 ± 0.3	85.9 ± 2.8	82.0 ± 3.6	18.4 ± 1.3	0.5 ± 0.9
	14	1.1 ± 1.1	76.7 ± 8.8	68.0 ± 8.5	22.3 ± 5.0	0.0 ± 0.0
	20	0.4 ± 0.7	78.9 ± 9.1	68.1 ± 3.2	26.6 ± 1.2	0.0 ± 0.0
	27	1.0 ± 0.9	75.4 ± 3.5	62.7 ± 8.9	33.4 ± 2.7	0.0 ± 0.0
	34	0.9 ± 1.5	81.9 ± 13.8	55.8 ± 3.7	37.9 ± 3.8	0.0 ± 0.0
	41	2.4 ± 1.9	75.9 ± 4.5	39.2 ± 6.2	42.0 ± 1.7	0.0 ± 0.0
F	1	1.7 ± 0.3	80.5 ± 6.5	79.7 ± 4.1	6.8 ± 0.5	3.7 ± 0.4
	7	0.5 ± 0.9	76.5 ± 8.0	81.0 ± 3.5	13.3 ± 1.6	0.3 ± 0.5
	14	1.1 ± 0.9	83.3 ± 9.4	65.8 ± 5.5	21.0 ± 1.4	0.1 ± 0.2
	20	0.8 ± 0.8	84.1 ± 3.1	64.2 ± 5.2	26.7 ± 3.4	0.0 ± 0.0
	27	1.1 ± 0.9	80.0 ± 3.4	57.8 ± 7.7	33.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0
	34	0.5 ± 0.9	83.9 ± 4.0	55.5 ± 5.0	33.8 ± 2.0	0.0 ± 0.0
	41	1.8 ± 0.6	70.7 ± 7.3	41.4 ± 6.3	36.4 ± 3.9	0.0 ± 0.0
A	1	1.3 ± 1.3	96.5 ± 8.8	89.1 ± 15.4	4.5 ± 0.2	2.2 ± 2.0
	7	0.2 ± 0.4	88.5 ± 13.9	86.7 ± 6.1	16.7 ± 2.0	0.2 ± 0.3
	14	0.4 ± 0.4	85.3 ± 6.2	65.4 ± 9.5	26.1 ± 4.2	0.0 ± 0.0
	20	0.8 ± 0.7	80.3 ± 8.7	57.3 ± 8.1	32.0 ± 6.5	0.0 ± 0.0
	27	1.0 ± 1.3	82.9 ± 10.6	53.6 ± 5.0	35.6 ± 2.7	0.0 ± 0.0
	34	0.0 ± 0.0	86.0 ± 3.6	54.3 ± 3.1	40.4 ± 1.4	0.0 ± 0.0
	41	1.8 ± 1.7	77.0 ± 9.1	36.7 ± 4.6	41.2 ± 4.6	0.0 ± 0.0

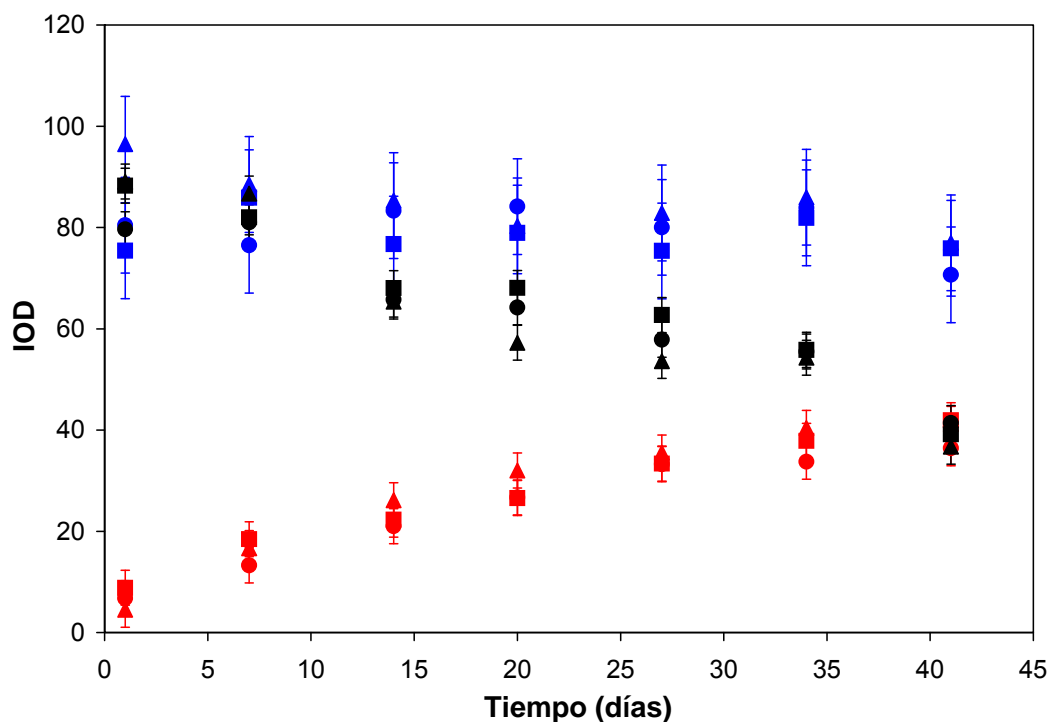


Figura 4.7. Densidad óptica absoluta integrada (IOD) por g de queso de α_{S1} (negro), α_{S1-I} (rojo) y β -caseína (azul) de muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲) durante el tiempo de maduración estudiado. Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

En queso Mozzarella la plasmina provoca la hidrólisis de la β -caseína, ya que es una proteinasa estable al calor que se encuentra en la leche (Creamer, 1976; Farkye *et al.*, 1991). Por otro lado, según Feeney *et al.* (2001) el bajo grado de proteólisis de la β -caseína por acción de quimosina podría deberse a una asociación intermolecular dependiente de la concentración de la región hidrofóbica de C-terminal de la β -caseína, la cual contiene las uniones sensibles a la quimosina. En este caso, la concentración de β -caseína se mantiene prácticamente constante durante el período estudiado; esto demostraría que la hidrólisis de la β -caseína por la acción de plasmina y quimosina residual no fue significativa.

Para representar la hidrólisis de la α_{S1} -caseína durante la maduración se propuso una cinética de primer orden (Zorrilla y Rubiolo, 1997)

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt} \quad (4.1)$$

donde C es la concentración de α_{s1} -caseína a un tiempo de maduración t , C_0 es la concentración inicial de α_{s1} -caseína y k es la constante cinética de la reacción. La Ec. (4.1) puede escribirse:

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (4.2)$$

Graficando $\ln C$ vs t , se obtiene una recta con ordenada al origen igual a $\ln C_0$ y pendiente igual a $-k$. Los valores de k y de los coeficientes de correlación de las rectas obtenidas para los distintos tratamientos estudiados se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Valores de la constante cinética para cada tratamiento estudiado.

Tratamiento	k (día ⁻¹)	r
C	0.018	0.885
F	0.015	0.885
A	0.020	0.888

Para determinar si las constantes cinéticas determinadas son iguales o no, se usó una correlación múltiple incluyendo variables indicadoras o *dummy*. Usando el tratamiento control como referencia (0,0), la codificación para las muestras congeladas F es (1,0) y para las muestras almacenadas congeladas A es (1,1).

El modelo de regresión lineal usado fue

$$\ln C = \ln C_0 + a_1 t + a_2 F + a_3 A + a_4 tA + a_5 tF + e \quad (4.3)$$

donde $\ln C$ es la variable dependiente y t , F y A son las variables independientes o explicativas.

Se observó un efecto significativo del tiempo de maduración ($F= 442.90$, $p= 0.0000$), pero no de las variables indicadoras F ($F= 3.77$, $p= 0.0537$) y A ($F= 0.04$, $p= 0.8505$), ni tampoco de las interacciones $t \times F$ ($F= 1.87$, $p= 0.1734$) y $t \times A$ ($F= 2.07$, $p= 0.1521$). Por lo tanto, se concluye que la congelación y el almacenamiento de las muestras congeladas no afectaron la cinética de degradación de la α_{s1} -caseína y que la constante cinética de degradación de queso Mozzarella tiene un valor promedio de 0.0179 día⁻¹. Este valor de constante cinética está en el orden de los valores informados por Zorrilla y Rubiolo (1997) y Sihufe (2003) para queso Fynbo.

Ensayo cromatográfico. En la Figura 4.8 se observan los perfiles cromatográficos de muestras a 41 días de maduración para los diferentes tratamientos estudiados, los cuales son muy similares. En la Figura 4.9 se observan los perfiles cromatográficos de muestras control para diferentes tiempos de maduración, visualizándose claramente el aumento del área cromatográfica a medida que aumenta el tiempo de maduración.

Los cromatogramas para todos los quesos muestran una gran cantidad de picos. En la Figura 4.10 se muestra un perfil cromatográfico característico con los picos estudiados. En general, el número y la altura de los picos aumentan durante el tiempo de maduración. En la Tabla 4.5 se muestran los valores promedios del área cromatográfica de los picos con su desviación estándar, mientras que los valores individuales se informan en el Anexo D.

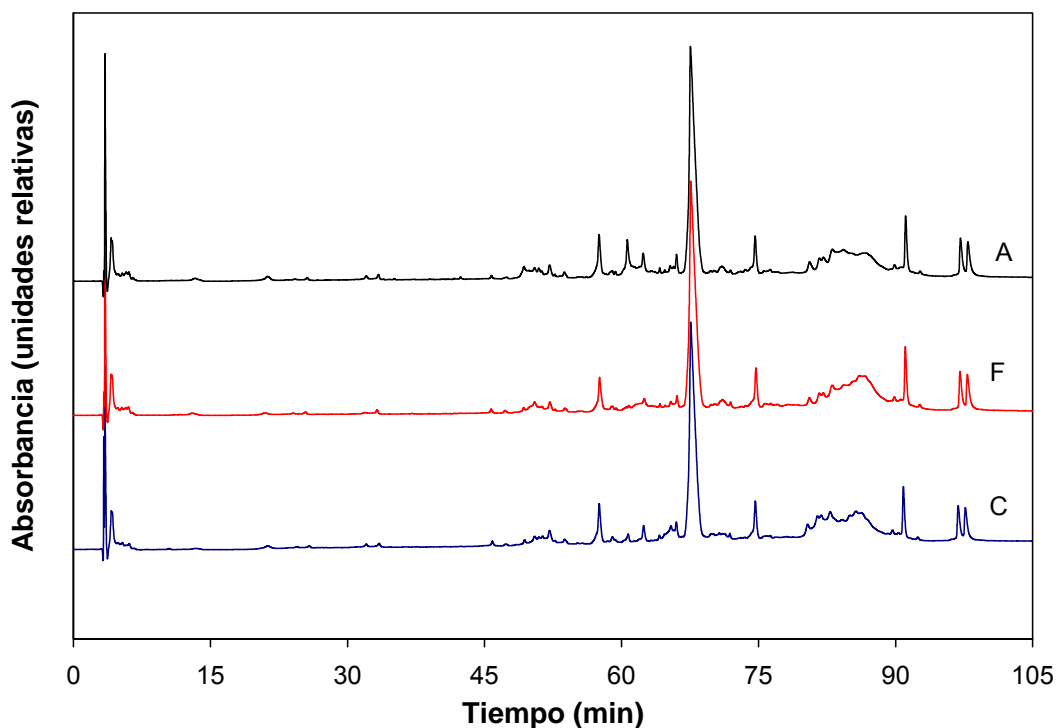


Figura 4.8. Perfiles de RP-HPLC correspondientes a FS de muestras control (C), congeladas (F) y almacenadas congeladas (A) a 41 días de maduración.

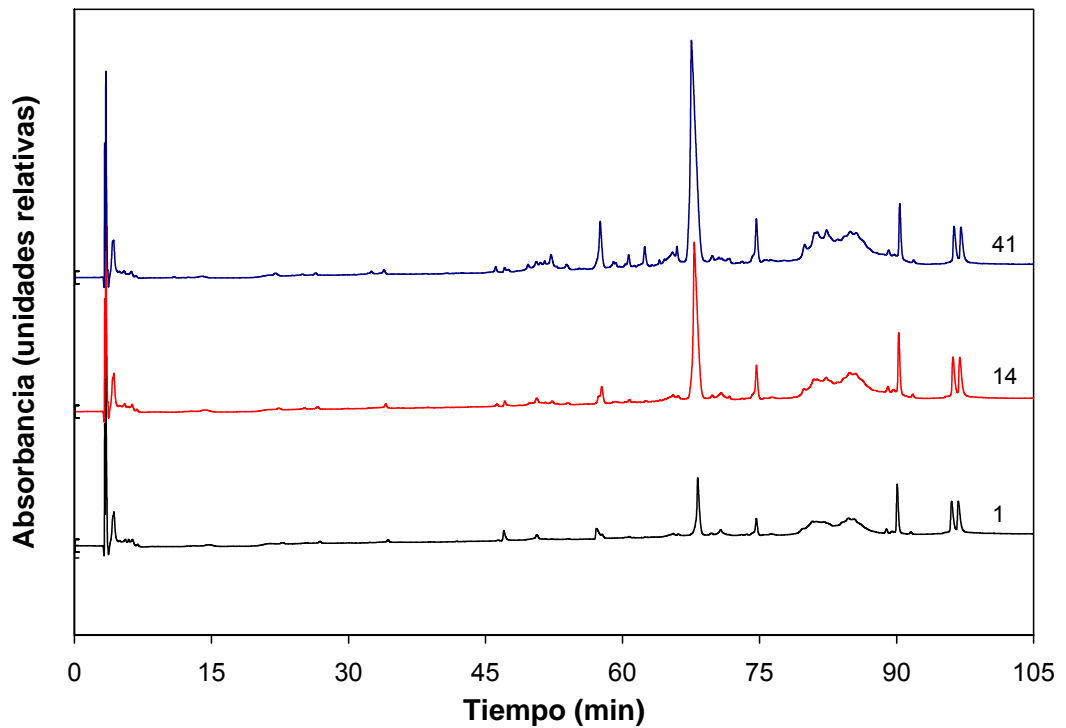


Figura 4.9. Perfiles de RP-HPLC correspondientes a FS de muestras control a 1, 14 y 41 días de maduración.

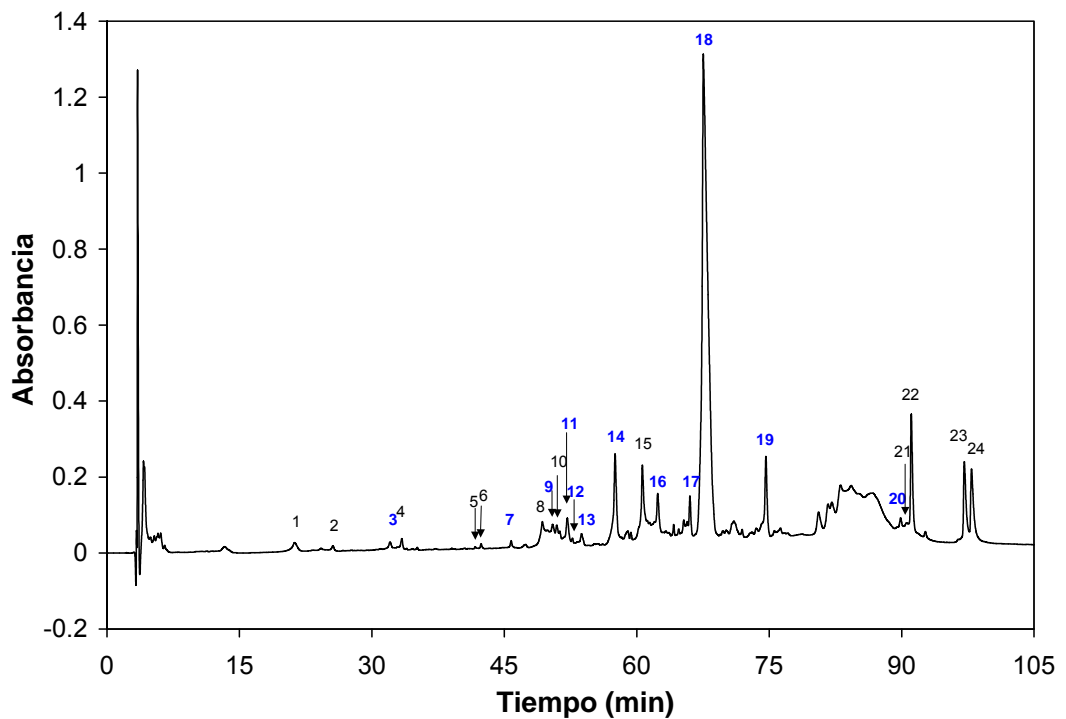


Figura 4.10. Perfiles de RP-HPLC correspondientes a FS de una muestra almacenada congelada de 41 días de maduración. Los números en azul corresponden a los picos seleccionados para realizar PCA.

Tabla 4.5. Valor promedio del área (10^6 / g queso) y desviación estándar de los picos cromatográficos para los tratamientos estudiados.

Tratamiento	Tiempo (días)	1	2	3	4	5	6
C	1	0.0 ± 0.0	7.5 ± 0.6	0.0 ± 0.0	9.9 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	7	0.0 ± 0.0	9.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0	13.5 ± 1.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	14	0.0 ± 0.0	9.4 ± 0.6	0.0 ± 0.0	13.9 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	20	0.0 ± 0.0	9.7 ± 0.7	0.0 ± 0.0	15.2 ± 1.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	27	0.0 ± 0.0	9.9 ± 0.6	5.0 ± 4.6	21.0 ± 4.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	34	5.7 ± 10.0	9.9 ± 1.1	7.6 ± 7.9	16.4 ± 1.5	0.0 ± 0.0	2.2 ± 3.8
	41	5.5 ± 9.5	9.5 ± 1.7	10.5 ± 1.7	17.1 ± 1.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
F	1	0.0 ± 0.0	8.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0	12.3 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	7	0.0 ± 0.0	5.9 ± 5.1	0.0 ± 0.0	11.6 ± 3.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	14	0.0 ± 0.0	8.7 ± 0.6	0.0 ± 0.0	13.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	20	0.0 ± 0.0	8.9 ± 0.2	0.0 ± 0.0	13.5 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	27	0.0 ± 0.0	22.6 ± 22.8	0.0 ± 0.0	15.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	34	4.7 ± 8.2	23.3 ± 24.4	3.8 ± 6.5	15.3 ± 1.6	0.0 ± 0.0	1.7 ± 3.0
	41	0.0 ± 0.0	45.1 ± 34.9	0.0 ± 0.0	14.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
A	1	0.0 ± 0.0	8.3 ± 0.7	0.0 ± 0.0	12.1 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	7	0.0 ± 0.0	8.8 ± 0.9	0.8 ± 1.4	15.2 ± 2.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	14	0.0 ± 0.0	8.5 ± 1.4	9.5 ± 16.5	13.5 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	20	0.0 ± 0.0	9.1 ± 0.8	14.0 ± 9.7	19.7 ± 8.0	1.2 ± 2.1	7.1 ± 3.4
	27	5.4 ± 9.3	9.2 ± 0.5	7.7 ± 0.4	20.5 ± 7.0	2.8 ± 2.4	4.0 ± 4.1
	34	15.1 ± 16.4	17.6 ± 15.6	10.6 ± 2.3	23.3 ± 6.1	1.7 ± 2.9	3.1 ± 2.7
	41	18.5 ± 16.0	18.9 ± 17.1	12.0 ± 1.5	18.8 ± 1.2	3.0 ± 2.7	9.3 ± 4.7

Tabla 4.5 continuación. Valor promedio del área (10^6 / g queso) y desviación estándar de los picos cromatográficos para los tratamientos estudiados.

Tratamiento	Tiempo (días)	7	8	9	10	11	12
C	1	1.8 ± 1.6	0.0 ± 0.0	22.8 ± 5.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	7	6.5 ± 0.8	1.1 ± 1.9	31.3 ± 4.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.2 ± 2.8
	14	7.9 ± 1.0	3.8 ± 1.5	29.9 ± 3.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.9 ± 1.4
	20	10.8 ± 1.5	5.9 ± 2.4	33.4 ± 8.8	1.2 ± 2.1	0.0 ± 0.0	12.7 ± 8.4
	27	12.5 ± 1.1	9.9 ± 4.2	40.2 ± 28.2	17.1 ± 19.6	13.0 ± 11.3	31.2 ± 7.1
	34	14.5 ± 2.2	35.5 ± 30.6	70.1 ± 9.0	25.6 ± 6.5	34.5 ± 6.0	51.3 ± 10.2
	41	19.6 ± 2.9	66.6 ± 69.4	65.9 ± 7.7	36.8 ± 4.9	38.3 ± 7.2	101.3 ± 14.2
F	1	2.7 ± 0.5	0.0 ± 0.0	24.6 ± 5.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	7	4.8 ± 1.1	0.0 ± 0.0	19.8 ± 6.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	14	7.5 ± 0.4	2.1 ± 1.9	27.2 ± 2.7	0.0 ± 0.0	2.8 ± 4.8	5.6 ± 4.8
	20	10.2 ± 1.6	5.0 ± 1.7	31.2 ± 8.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.3 ± 1.8
	27	12.9 ± 1.0	11.0 ± 6.5	46.1 ± 32.5	12.2 ± 21.2	8.8 ± 12.1	27.6 ± 7.5
	34	12.5 ± 0.7	11.6 ± 6.0	45.3 ± 21.9	20.7 ± 18.9	9.9 ± 13.9	34.4 ± 14.3
	41	15.1 ± 2.7	23.2 ± 14.7	53.2 ± 24.0	55.1 ± 36.1	22.9 ± 17.6	66.8 ± 34.2
A	1	2.7 ± 0.4	0.0 ± 0.0	25.5 ± 11.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	7	5.9 ± 0.2	0.0 ± 0.0	24.5 ± 9.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.3 ± 2.9
	14	8.3 ± 0.3	5.4 ± 1.2	19.2 ± 13.7	10.5 ± 18.3	0.0 ± 0.0	14.0 ± 0.6
	20	10.7 ± 2.5	13.2 ± 3.0	57.5 ± 26.4	79.6 ± 34.9	26.8 ± 34.0	32.7 ± 4.4
	27	13.1 ± 1.5	52.9 ± 53.7	80.8 ± 11.9	53.8 ± 18.7	8.8 ± 15.2	68.7 ± 11.2
	34	13.2 ± 1.8	87.8 ± 53.7	68.3 ± 10.7	27.9 ± 5.5	31.3 ± 6.8	83.3 ± 22.3
	41	14.3 ± 6.0	40.3 ± 17.5	41.4 ± 31.0	43.6 ± 11.6	14.7 ± 24.8	85.1 ± 47.7

Tabla 4.5 continuación. Valor promedio del área (10^6 / g queso) y desviación estándar de los picos cromatográficos para los tratamientos estudiados.

Tratamiento	Tiempo (días)	13	14	15	16	17	18
C	1	0.0 ± 0.0	37.8 ± 49.8	4.4 ± 5.2	0.0 ± 0.0	5.9 ± 1.8	368.0 ± 26.2
	7	1.8 ± 3.2	63.8 ± 55.5	2.8 ± 2.6	1.7 ± 3.0	10.3 ± 1.4	936.6 ± 64.0
	14	8.2 ± 1.0	83.1 ± 29.2	14.4 ± 10.8	9.4 ± 5.2	18.6 ± 5.0	1427.2 ± 92.4
	20	12.1 ± 1.9	120.2 ± 29.1	12.0 ± 5.5	19.2 ± 11.7	25.8 ± 6.6	1761.5 ± 113.5
	27	21.2 ± 14.8	149.1 ± 34.7	29.0 ± 11.2	30.5 ± 20.1	27.6 ± 6.1	2072.9 ± 73.8
	34	16.3 ± 1.1	201.5 ± 34.4	60.9 ± 40.6	45.1 ± 14.3	68.2 ± 37.2	2588.0 ± 151.3
	41	29.4 ± 9.5	305.4 ± 32.9	107.6 ± 66.6	107.9 ± 21.6	106.2 ± 18.8	2986.1 ± 106.3
F	1	0.0 ± 0.0	11.3 ± 2.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.8 ± 0.2	352.2 ± 17.4
	7	0.0 ± 0.0	31.0 ± 22.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.6 ± 0.6	761.0 ± 128.8
	14	4.1 ± 3.5	65.0 ± 11.5	10.7 ± 7.0	5.8 ± 6.2	14.8 ± 1.3	1372.7 ± 32.0
	20	10.1 ± 0.7	100.9 ± 19.9	9.5 ± 5.4	10.1 ± 9.8	28.7 ± 7.7	1723.0 ± 161.8
	27	11.9 ± 0.8	150.9 ± 5.6	23.9 ± 7.1	26.7 ± 7.9	52.2 ± 10.6	2355.8 ± 33.9
	34	14.0 ± 1.2	170.6 ± 13.0	46.4 ± 31.2	29.5 ± 8.0	49.6 ± 22.0	2361.2 ± 220.5
	41	15.6 ± 2.2	218.4 ± 34.2	32.4 ± 6.5	50.5 ± 24.5	66.8 ± 40.7	2785.5 ± 327.6
A	1	0.0 ± 0.0	16.6 ± 7.6	5.7 ± 9.9	0.0 ± 0.0	7.9 ± 0.9	395.4 ± 5.8
	7	2.0 ± 3.5	46.8 ± 7.4	10.3 ± 1.2	6.1 ± 5.4	17.9 ± 7.6	1056.3 ± 8.4
	14	11.5 ± 2.1	108.0 ± 6.3	12.0 ± 3.5	23.5 ± 8.5	35.6 ± 5.3	1828.2 ± 12.4
	20	14.7 ± 6.2	156.2 ± 8.6	29.8 ± 10.5	63.0 ± 34.0	58.3 ± 52.0	2123.4 ± 158.2
	27	16.8 ± 1.5	210.7 ± 24.3	109.2 ± 72.4	67.3 ± 28.4	89.2 ± 45.8	2922.0 ± 167.7
	34	18.2 ± 10.7	211.4 ± 18.2	35.2 ± 15.2	47.5 ± 6.1	63.5 ± 15.3	2691.9 ± 88.4
	41	30.6 ± 12.0	280.3 ± 24.4	258.1 ± 182.0	129.8 ± 21.0	88.2 ± 42.1	2912.4 ± 165.5

Tabla 4.5 continuación. Valor promedio del área (10^6 / g queso) y desviación estándar de los picos cromatográficos para los tratamientos estudiados.

Tratamiento	Tiempo (días)	19	20	21	22	23	24
C	1	87.3 ± 3.9	16.5 ± 1.3	11.2 ± 4.1	197.2 ± 12.2	163.2 ± 14.9	168.8 ± 15.1
	7	137.4 ± 2.5	20.3 ± 0.6	17.9 ± 3.0	233.6 ± 4.7	198.4 ± 10.9	201.6 ± 6.4
	14	171.3 ± 7.6	26.1 ± 3.2	29.6 ± 7.2	240.1 ± 2.9	204.5 ± 15.0	208.4 ± 9.8
	20	198.4 ± 11.6	24.2 ± 2.7	24.8 ± 2.3	246.4 ± 3.2	210.5 ± 5.1	216.7 ± 5.9
	27	231.1 ± 35.5	22.6 ± 2.9	16.6 ± 6.8	235.9 ± 6.0	209.8 ± 3.7	216.8 ± 2.4
	34	238.2 ± 9.2	30.6 ± 10.5	22.8 ± 3.7	253.5 ± 17.2	216.9 ± 11.9	222.9 ± 14.8
	41	256.6 ± 21.3	36.1 ± 16.7	23.8 ± 9.4	240.3 ± 12.2	206.4 ± 7.7	211.8 ± 9.3
F	1	90.8 ± 3.5	18.8 ± 2.0	16.4 ± 0.1	229.1 ± 13.5	198.6 ± 7.3	200.1 ± 4.3
	7	115.8 ± 17.4	20.8 ± 3.9	23.6 ± 4.0	219.1 ± 38.1	178.6 ± 48.2	181.7 ± 48.0
	14	153.5 ± 12.8	23.6 ± 1.3	19.5 ± 6.9	246.6 ± 10.5	214.4 ± 10.1	215.6 ± 7.7
	20	183.0 ± 8.6	23.3 ± 4.1	18.1 ± 4.7	233.2 ± 10.7	213.1 ± 21.3	212.7 ± 16.6
	27	218.9 ± 20.2	25.7 ± 2.5	22.1 ± 8.2	257.5 ± 19.8	222.5 ± 24.0	222.4 ± 23.7
	34	240.6 ± 13.4	26.5 ± 3.1	18.6 ± 16.6	242.5 ± 13.7	211.3 ± 10.7	213.8 ± 8.0
	41	243.9 ± 12.2	27.2 ± 6.8	22.6 ± 0.2	244.9 ± 8.2	203.5 ± 1.7	209.2 ± 1.0
A	1	104.2 ± 4.8	19.2 ± 3.7	18.7 ± 6.5	224.5 ± 14.4	178.5 ± 7.5	184.4 ± 7.2
	7	142.3 ± 6.4	23.9 ± 6.6	28.0 ± 10.3	239.3 ± 6.1	193.6 ± 12.0	198.1 ± 10.5
	14	160.8 ± 4.9	25.8 ± 4.4	28.9 ± 5.2	238.9 ± 14.7	201.8 ± 14.4	203.2 ± 9.3
	20	189.9 ± 2.4	28.5 ± 6.1	27.0 ± 6.2	248.4 ± 18.5	203.0 ± 7.8	207.2 ± 7.3
	27	193.5 ± 6.0	27.3 ± 1.8	20.3 ± 2.2	241.5 ± 9.9	200.1 ± 13.9	204.5 ± 11.6
	34	211.4 ± 18.8	38.8 ± 11.4	34.4 ± 9.6	257.3 ± 17.5	209.0 ± 18.4	212.1 ± 15.7
	41	206.7 ± 21.2	27.2 ± 7.9	13.0 ± 11.6	243.3 ± 13.2	202.8 ± 18.7	203.8 ± 13.3

Tabla 4.6. ANOVA de los picos cromatográficos.

Pico	Tiempo retención (min)	Tratamiento		Tiempo		Interacción	
		F	p	F	p	F	p
1	21.3	3.44	0.041	3.34	0.009	1.03	0.438
2	25.6	2.76	0.074	2.49	0.038	1.16	0.343
3	32.0	11.73	0	3.37	0.008	1.47	0.173
4	33.4	8.05	0.001	7.57	0	1.15	0.346
5	41.7	7.94	0.001	1.94	0.097	1.94	0.057
6	42.4	17.17	0	4.09	0.003	3.79	0.001
7	45.8	1.74	0.188	54.43	0	1.05	0.423
8	49.3	3.98	0.026	6.09	0	1.6	0.129
9	50.5	2.02	0.145	8.66	0	1.71	0.099
10	50.9	11.18	0	12.36	0	4.34	0
11	51.4	1.04	0.362	6.12	0	1.46	0.179
12	52.1	8.98	0.001	39.11	0	1.94	0.057
13	53.7	5.85	0.006	23.18	0	0.86	0.594
14	57.5	13.07	0	96.13	0	1.64	0.117
15	60.6	5.76	0.006	8.65	0	2.62	0.01
16	62.4	22.49	0	44.25	0	3.42	0.002
17	66.0	3.93	0.027	14.48	0	1.17	0.337
18	67.5	95.24	0	482.88	0	104.21	0
19	74.6	6.84	0.003	126.12	0	3.13	0.003
20	89.9	1.68	0.198	5.02	0.001	0.82	0.631
21	90.6	1.98	0.151	2.37	0.046	1.61	0.126
22	91.1	1.06	0.356	5.34	0	1.39	0.207
23	97.1	1.12	0.335	4.79	0.001	0.97	0.488
24	97.9	0.92	0.405	5.48	0	1.04	0.431

De acuerdo al ANOVA (Tabla 4.6) de los 24 picos, 23 presentaron efecto significativo con el tiempo, 15 con el tratamiento, y sólo 6 presentaron interacción significativa. Generalmente cuando el tratamiento fue significativo, las muestras almacenadas congeladas poseían mayor área cromatográfica que las congeladas.

De acuerdo al PCA con los 24 picos, se eliminaron los picos 1, 2, 5, 6, 10, 15, 21, 22, 23 y 24 por tener una medida de suficiencia de muestreo (MSA) regular o despreciable. También se eliminaron del análisis los picos 4 y 8 por tener valores de comunalidad menores a 0.5. Por lo tanto, se realizó PCA con los picos 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 y 20. La información fue resumida en dos dimensiones, acumulando las nuevas variables el 77.4% de la variabilidad total de los datos. Se relacionó al PC1 (70.0%) con el tiempo de almacenamiento y al PC2 (7.4%) con el

tratamiento, observándose las principales diferencias en las muestras almacenadas congeladas a partir de los 20 días de maduración (Figura 4.11).

Los picos presentaron PC1 *loading* negativos, esto se relacionó con el hecho que todos ellos crecen con el tiempo de maduración (Figura 4.12). Al analizar los perfiles de las áreas cromatográficas durante la maduración, se observaron algunas diferencias de acuerdo al signo de PC2 *loading*.

El área cromatográfica del pico 19 (Figura 4.13), representativo del grupo donde los picos poseen PC2 *loading* positivo, aumentó desde el primer día de maduración, pero sin diferencias entre los tratamientos. Un comportamiento similar fue observado en los picos 7, 13, 14, 16 y 18.

Los picos que poseen PC2 *loading* negativo (picos 3, 9, 11, 12, 17 y 20) mostraron un área cromatográfica pequeña. En general aparecen alrededor de los 20 días de maduración para las muestras almacenadas congeladas, mientras que no se observan para los otros tratamientos, o aparecen luego de los 20 días de maduración.

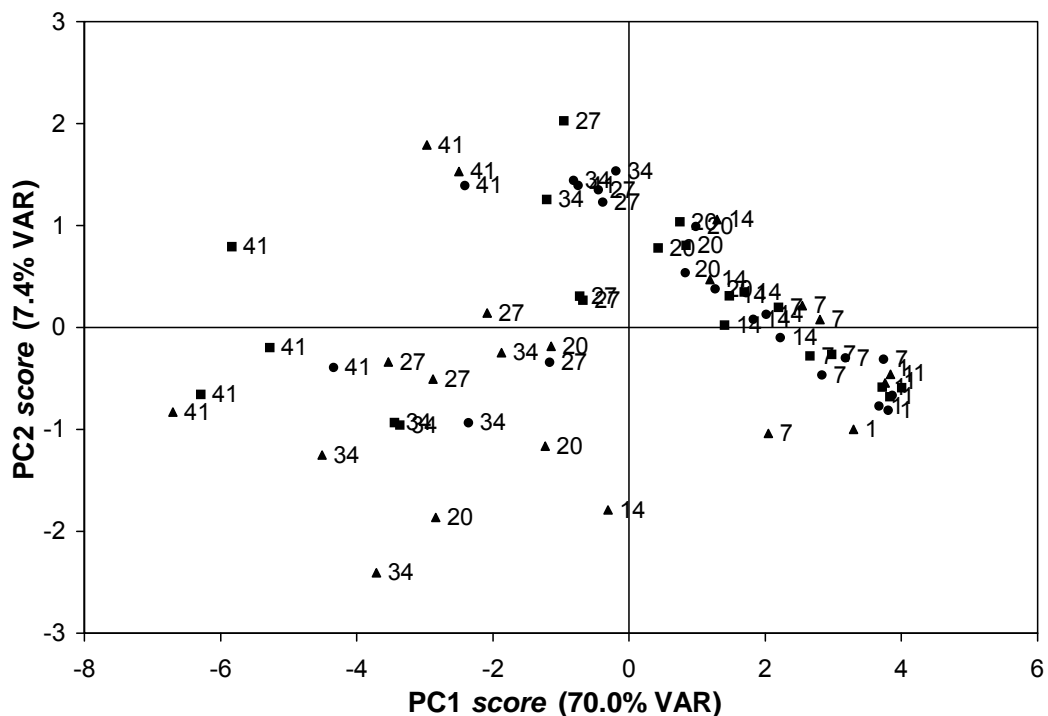


Figura 4.11. Distribución de las muestras en el plano definido por los dos componentes principales. Los números indican los días de maduración de las muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲).

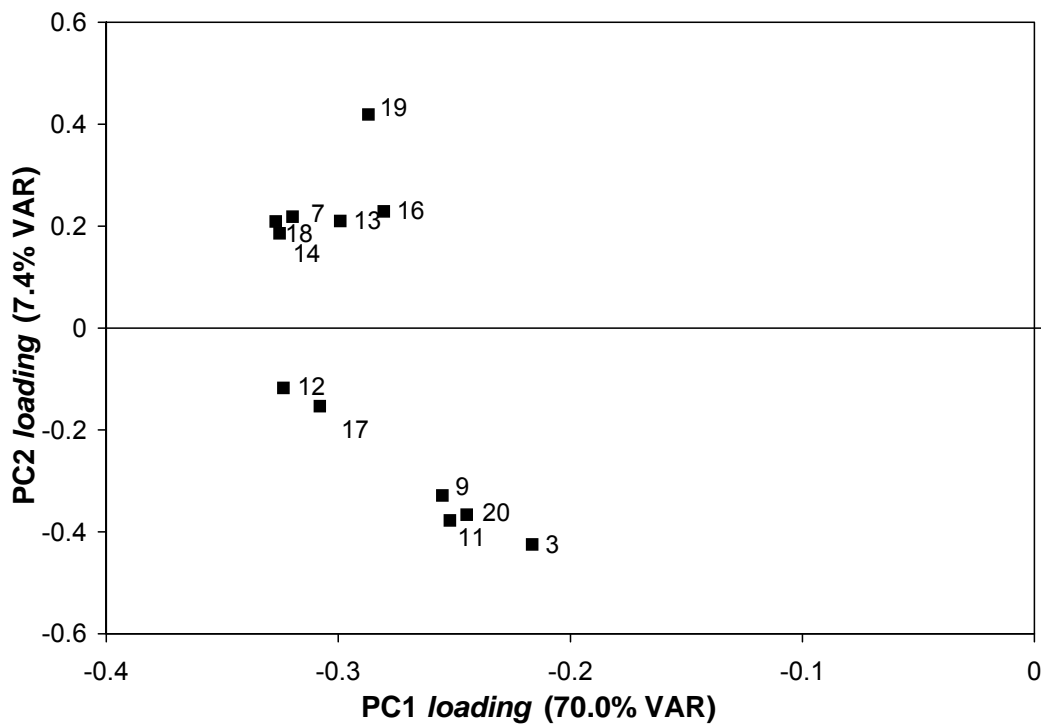


Figura 4.12. Gráfico de PC loadings correspondientes a los 12 picos analizados en la FS seleccionados para realizar PCA.

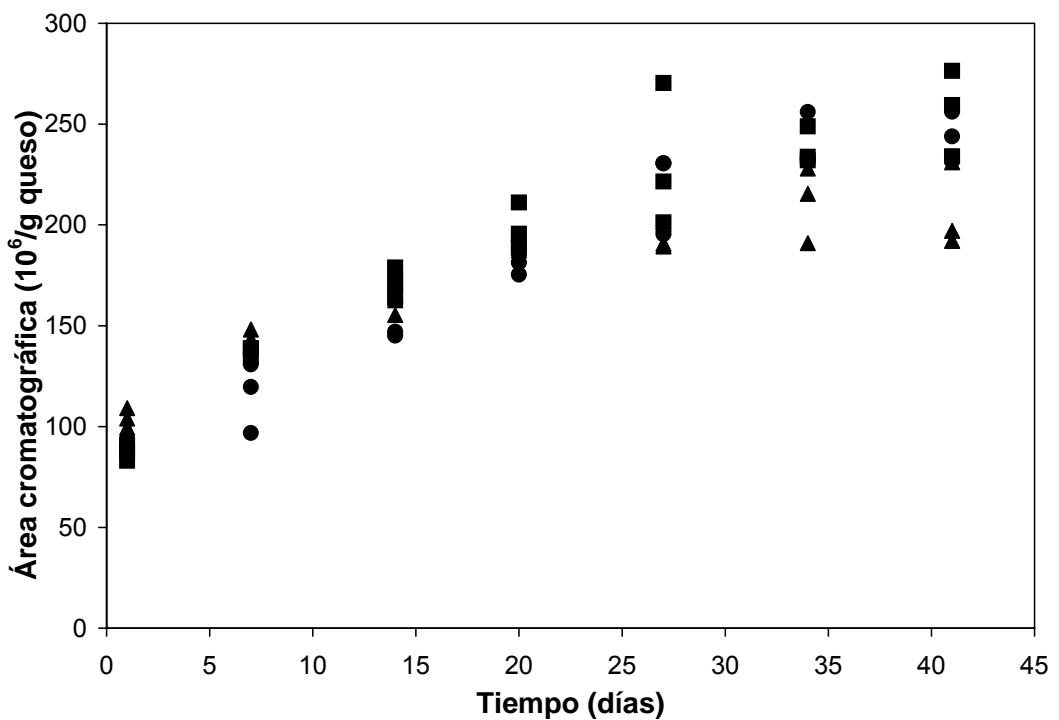


Figura 4.13. Área cromatográfica del pico 19 en las muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲).

4.3. Ensayos reológicos

Los métodos reológicos dinámicos han conducido a un mayor entendimiento de la naturaleza viscoelástica del queso Mozzarella (Ak y Gunasekaran, 1996; Subramanian y Gunasekaran, 1997a). En el análisis por barridos oscilatorios de pequeña amplitud (SAOS), se aplican a la muestra pequeñas deformaciones oscilatorias para medir la fuerza o flexibilidad de las uniones internas, permitiendo determinar valores cuantitativos para las propiedades viscoelásticas del queso (Diefes *et al.*, 1993; Van Hekken *et al.*, 2004). Las mediciones obtenidas son valores verdaderos para la elasticidad y viscosidad, contrariamente a lo que ocurre con las aproximaciones obtenidas por otros métodos reológicos (Dave *et al.*, 2003b).

Barridos de deformación. En las Figuras. 4.14 y 4.15, se muestran barridos de amplitud de deformación típicos para las muestras de queso Mozzarella estudiadas. Se observa que los módulos disminuyen con el tiempo de maduración, lo cual coincide con lo informado por Diefes *et al.* (1993), Ak y Gunasekaran (1996) y Subramanian y Gunasekaran (1997a). Este comportamiento puede ser explicado teniendo en cuenta los cambios que ocurren durante la maduración. La pérdida de la estructura de red proteica debido a la proteólisis de la matriz de caseína implica una disminución del módulo elástico G' durante la maduración (Ak y Gunasekaran, 1996). La disminución de la viscosidad y elasticidad evidencian el ablandamiento del queso (Creamer y Olson, 1982; Subramanian y Gunasekaran, 1997b). Si bien, se podría esperar que G'' aumente con el tiempo de maduración, este módulo al igual que el módulo elástico, disminuye durante la maduración. De acuerdo a Ak y Gunasekaran (1996), esta disminución estaría relacionada con la disipación viscosa que produce la solvatación de los nuevos grupos iónicos que se generan por la hidrólisis de las caseínas.

Se observó además que los módulos disminuyeron con la temperatura de los ensayos reológicos (Figuras 4.14 y 4.15), lo cual coincide con lo informado por Mounsey y O'Riordan (1999). Esto puede ser causado por el debilitamiento de las interacciones proteína-proteína dentro de la matriz de caseína con el aumento de la temperatura, acompañado por la licuefacción y deformación de los glóbulos de grasa, los cuales al actuar como plastificante de la matriz de proteína, mejoran la fluidez (Hennelly *et al.*, 2006).

A 20 y 40°C, en general G' es mayor que G'' , lo cual indica un comportamiento principalmente elástico (Figuras 4.14 y 4.15). Este comportamiento también se observa a 60°C y 1 día de maduración. Sin embargo, a los 14 y 41 días de maduración y 60°C, G'' en general es mayor que G' , lo cual se asocia con un comportamiento principalmente viscoso. A partir de una amplitud de deformación de 0.02 a 40°C y 14 días de maduración, los módulos disminuyen en forma pronunciada. Este comportamiento se podría relacionar por un lado, con los cambios que sufre la grasa dentro del queso y por otro, con el cambio estructural que está sufriendo la matriz de caseína debido a la hidratación y proteólisis. La grasa que actúa como un relleno de la estructura a bajas temperaturas (<40°C), actúa como factor de dilución o plastificante de las caseínas fundidas a una temperatura de 40°C, ya que la red de caseína está sustancialmente disociada y la grasa está completamente líquida (Muthukumarappan *et al.*, 1999). A 41 días de maduración, la región de viscoelasticidad lineal se amplía probablemente debido a la redistribución del agua durante el almacenamiento y al cambio de interacciones intermoleculares asociado (Muthukumarappan *et al.*, 1999; McMahon *et al.*, 1999; Guinee *et al.*, 2001).

De la observación de los barridos de deformación, se determinó que $\gamma_0 = 0.005$ permite que las determinaciones reológicas se realicen en la región de viscoelasticidad lineal. En los trabajos realizados por Tunick *et al.* (1993a), Ak y Gunasekaran (1996), Subramanian y Gunasekaran (1997a), Gunasekaran y Ak (2000), Gunasekaran y Ak (2003) y por Yu y Gunasekaran (2005), se reportaron regiones de viscoelasticidad lineal similares.

Con los módulos de almacenamiento y de pérdida obtenidos a $\gamma_0 = 0.005$, se realizó un ANOVA definiendo como factores fijos a la temperatura para realizar el ensayo reológico (20, 40 y 60°C), al tiempo de maduración (1, 7, 14, 20, 27, 34 y 41 días) y al tratamiento (control, congelación y congelación más almacenamiento de las muestras congeladas). En el Anexo D se informan los valores de las determinaciones individuales. Se encontró que todos los factores y sus interacciones afectaron significativamente ambos módulos.

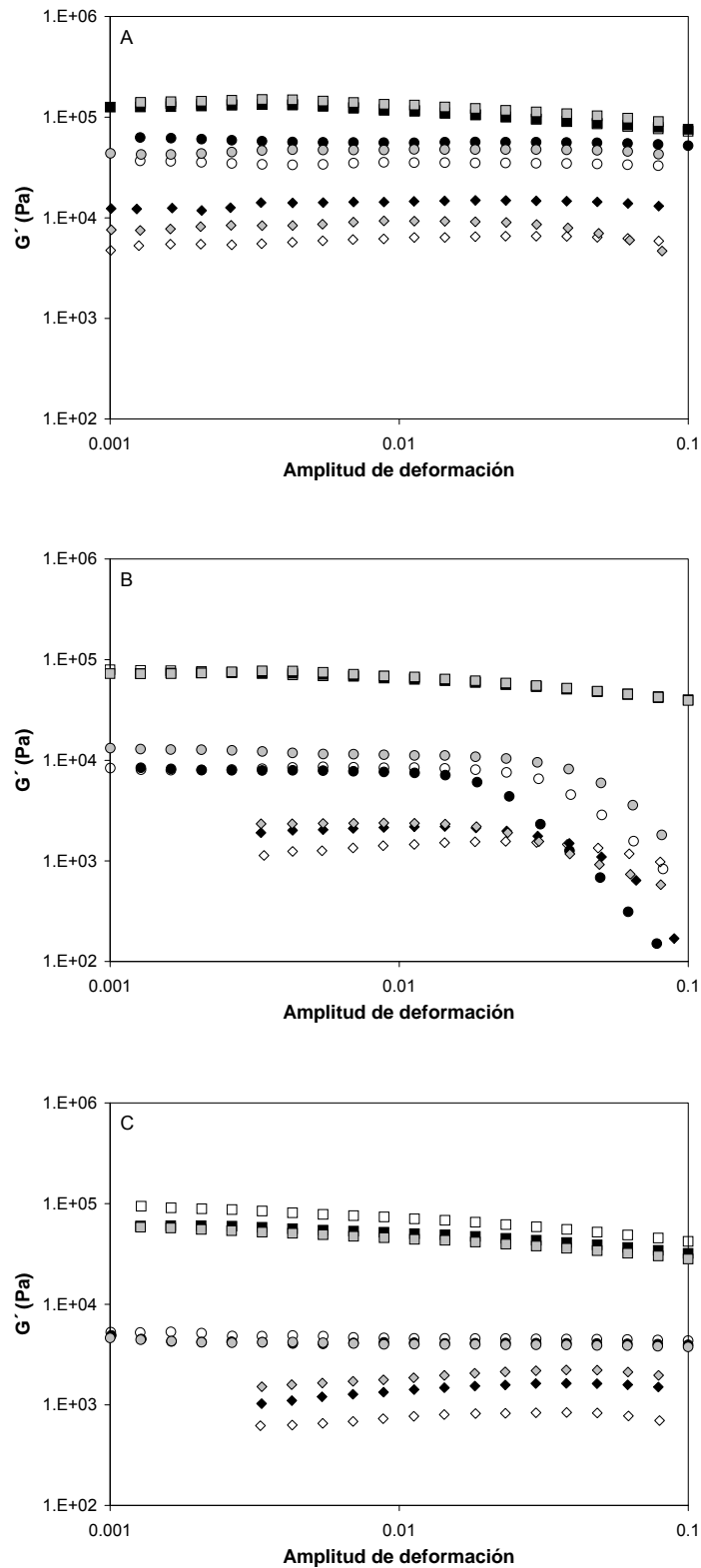


Figura 4.14. Barridos de amplitud de deformación a 20°C (□), 40°C (○) y 60 °C (◇); muestras control (símbolos vacíos), congeladas (símbolos negros) y almacenadas congeladas (símbolos grises). G' para 1 (A), 14 (B) y 41 (C) días de maduración.

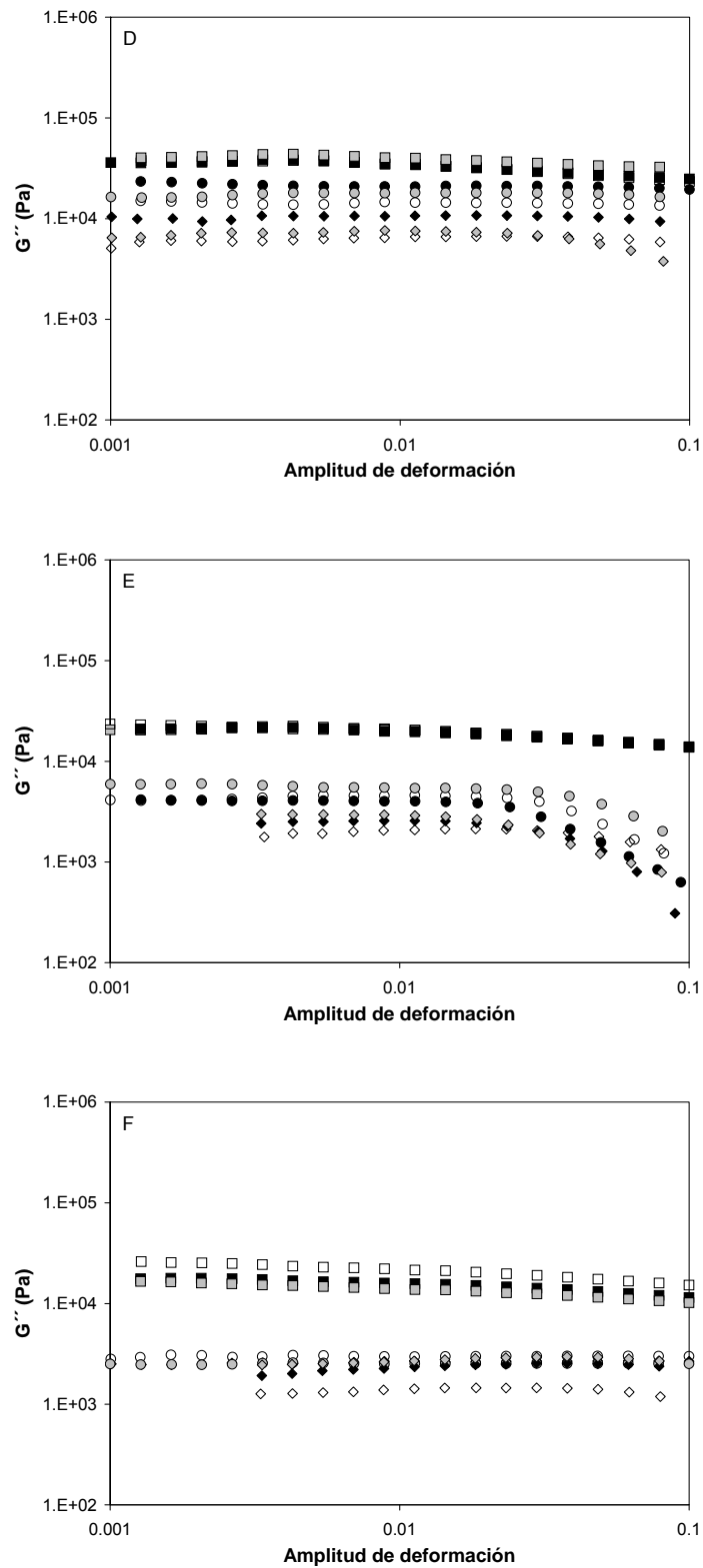


Figura 4.15. Barridos de amplitud de deformación a 20°C (□), 40°C (○) y 60 °C (◇); muestras control (símbolos vacíos), congeladas (símbolos negros) y almacenadas congeladas (símbolos grises). G'' para 1 (A), 14 (B) y 41 (C) días de maduración.

La disminución de los módulos con el tiempo de maduración fue más pronunciada durante la primera semana de maduración (Figura 4.16). Luego de los 14 días no se observaron diferencias entre tratamientos. Un comportamiento similar en la disminución de los módulos durante la primera semana fue observado a las distintas temperaturas evaluadas, siendo la disminución más marcada a 20°C (Figura 4.17). La disminución del valor promedio de los módulos cuando la temperatura cambia de 20 a 40°C es mayor que al pasar de 40 a 60°C (Figura 4.18). Respecto al efecto del tratamiento, las diferencias no fueron tan marcadas, observándose que las muestras control presentaron módulos levemente mayores que las muestras congeladas y las muestras almacenadas congeladas, pero sólo a 20°C.

Barridos de temperatura. La reología dinámica puede proveer información muy útil sobre los cambios inducidos por calor que ocurren en queso Mozzarella. A partir de los barridos de temperatura se estudió la influencia de la temperatura sobre algunas propiedades reológicas del queso. Así, se obtuvo la variable $\tan \delta$, índice muy útil para estudiar la viscoelasticidad de los materiales (Mounsey y O’Riordan, 2001). En las Figuras 4.19, 4.20 y 4.21, se observa que a medida que transcurre el tiempo de maduración, el queso cambia a un comportamiento principalmente viscoso ($\tan \delta > 1$) a una temperatura cada vez menor. Además, los cambios en $\tan \delta$ más importantes se observan a partir de 40°C.

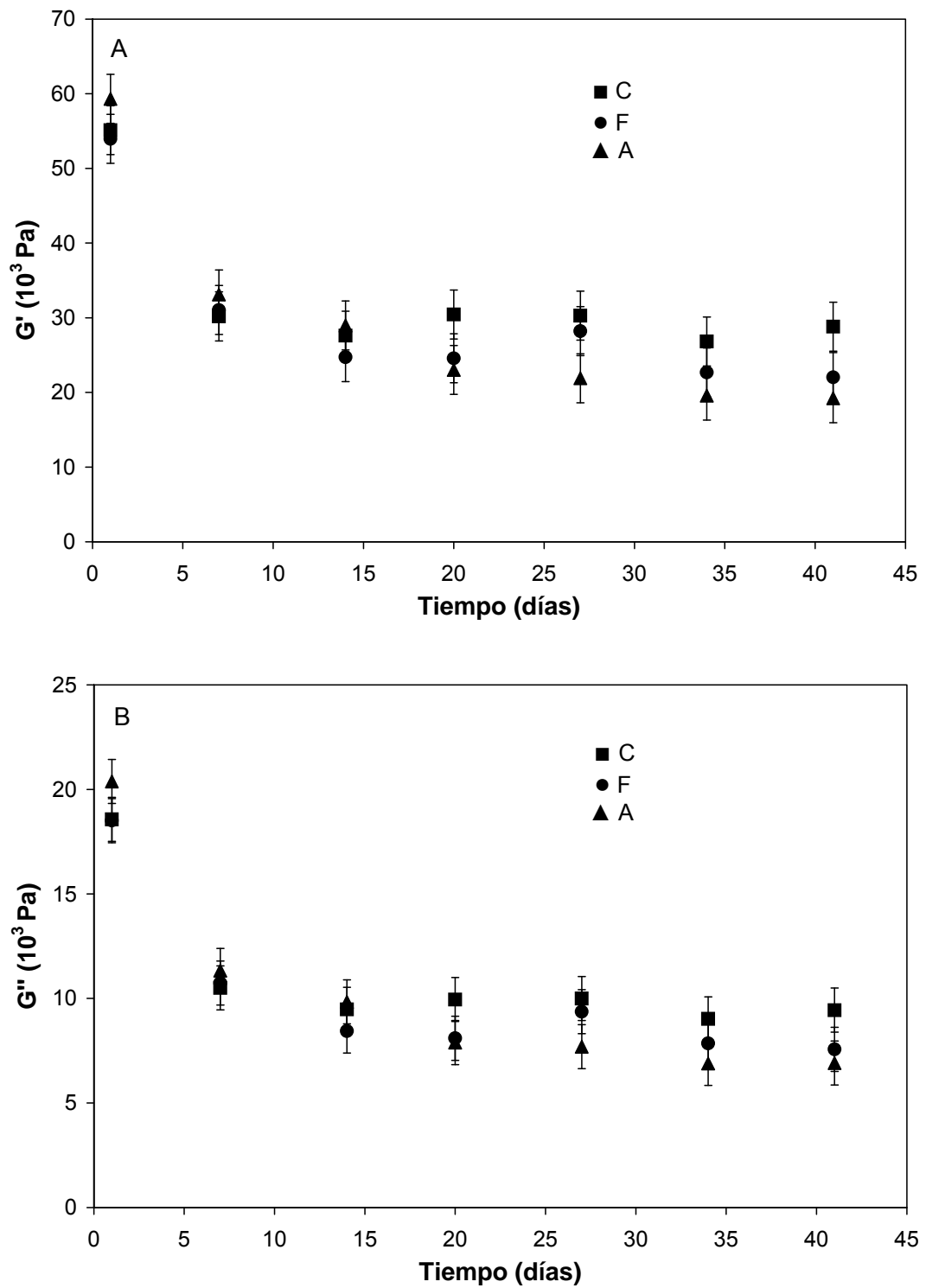


Figura 4.16. Gráficos de interacción de los factores principales proceso-tiempo obtenidos del ANOVA, (A) del módulo elástico, (B) del módulo viscoso. Las barras corresponden a intervalos de confianza del 95%.

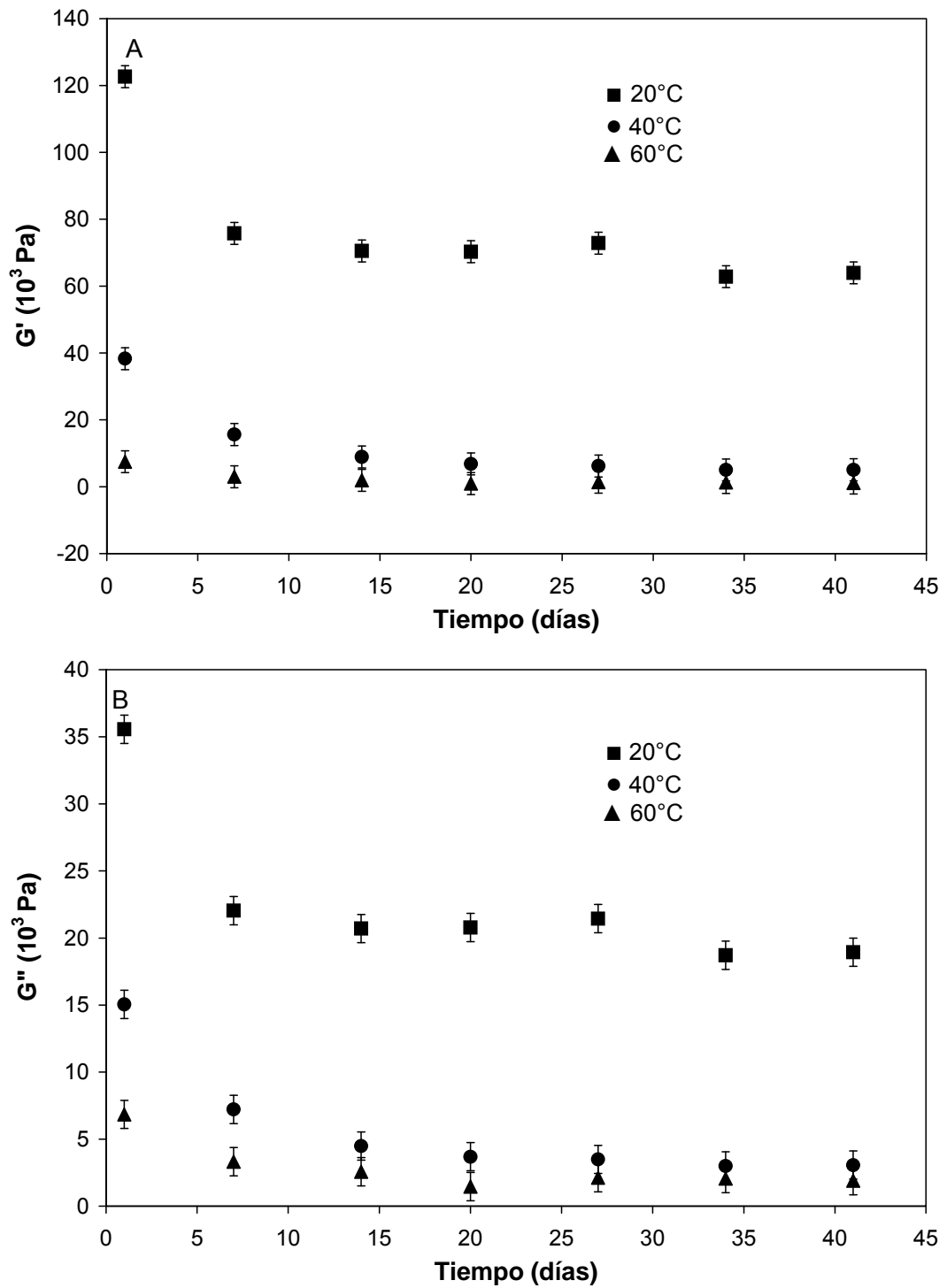


Figura 4.17. Gráficos de interacción de los factores principales temperatura-tiempo obtenidos del ANOVA, (A) del módulo elástico y (B) del módulo viscoso. Las barras corresponden a intervalos de confianza del 95%.

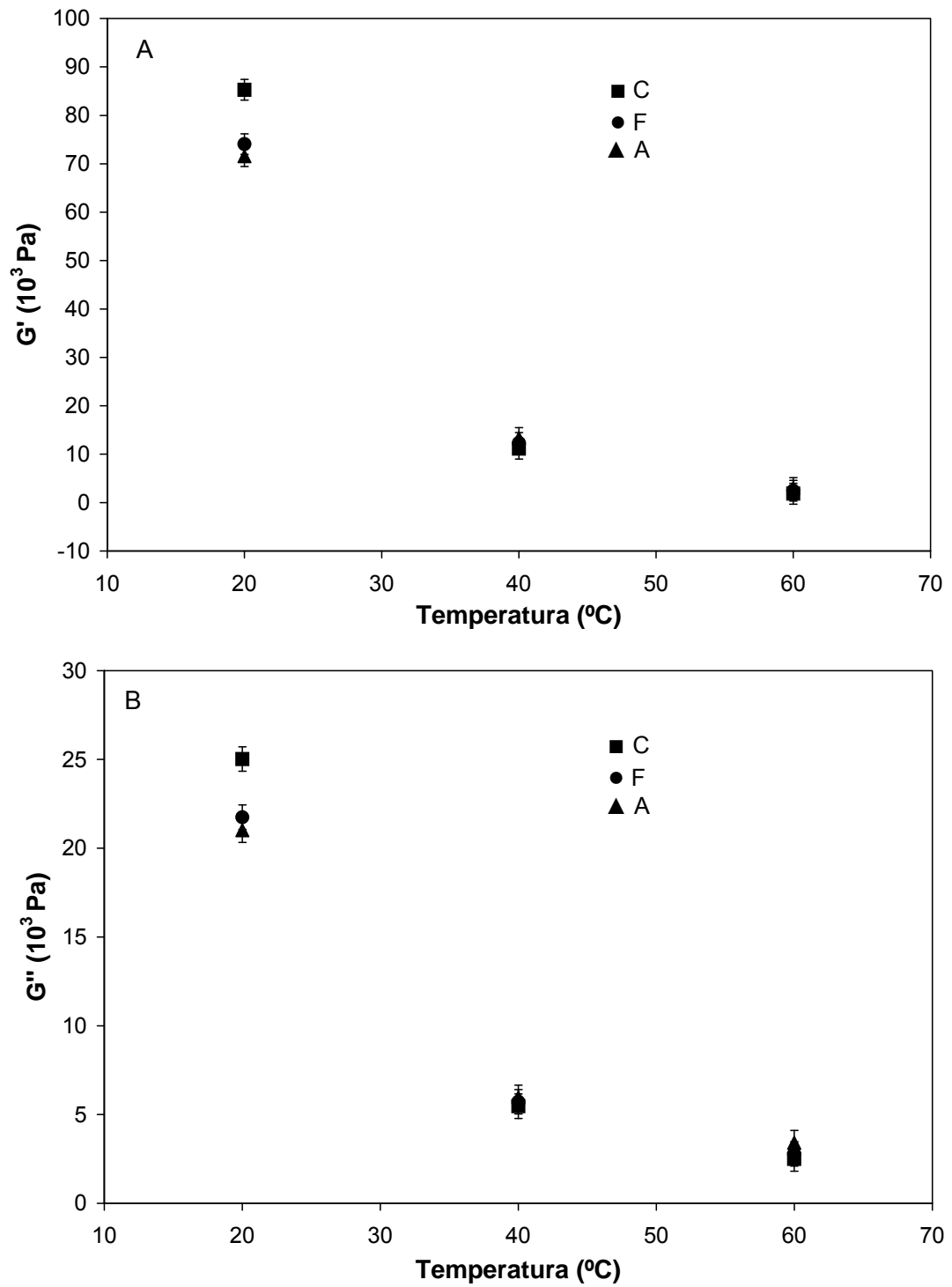


Figura 4.18. Gráficos de interacción de los factores principales proceso-temperatura obtenidos del ANOVA, (A) del módulo elástico y (B) del módulo viscoso. Las barras corresponden a intervalos de confianza del 95%.

El comportamiento observado en la variable $\tan \delta$ con el tiempo de maduración podría ser explicado no sólo teniendo en cuenta la proteólisis sino también los cambios en los estados del agua y de la proteína en el queso. Por un lado, al comienzo del almacenamiento, cuando el queso es calentado, las interacciones relativamente fuertes entre las moléculas de proteína se mantienen. Los quesos resisten la tendencia a fluir aún cuando el agua extraíble y la grasa dentro de los canales de grasa y suero estén presentes (McMahon *et al.*, 1999). Por otro lado, durante las primeras semanas de almacenamiento del queso Mozzarella, el agua extraíble es transferida desde los canales de grasa y suero a la matriz proteica. Como las proteínas que constituyen la matriz comienzan a estar más hidratadas, aumenta su volumen hidrodinámico y comienza a extenderse alrededor de los glóbulos de grasa. Desde el punto de vista de la funcionalidad del queso, una estructura proteica más hidratada permitiría que las proteínas se deslicen una sobre otra más fácilmente y, cuando se combina con las propiedades lubricantes de la grasa, resulta en una adecuada capacidad para fluir (Tunick *et al.*, 1993 a; Tunick *et al.*, 1995).

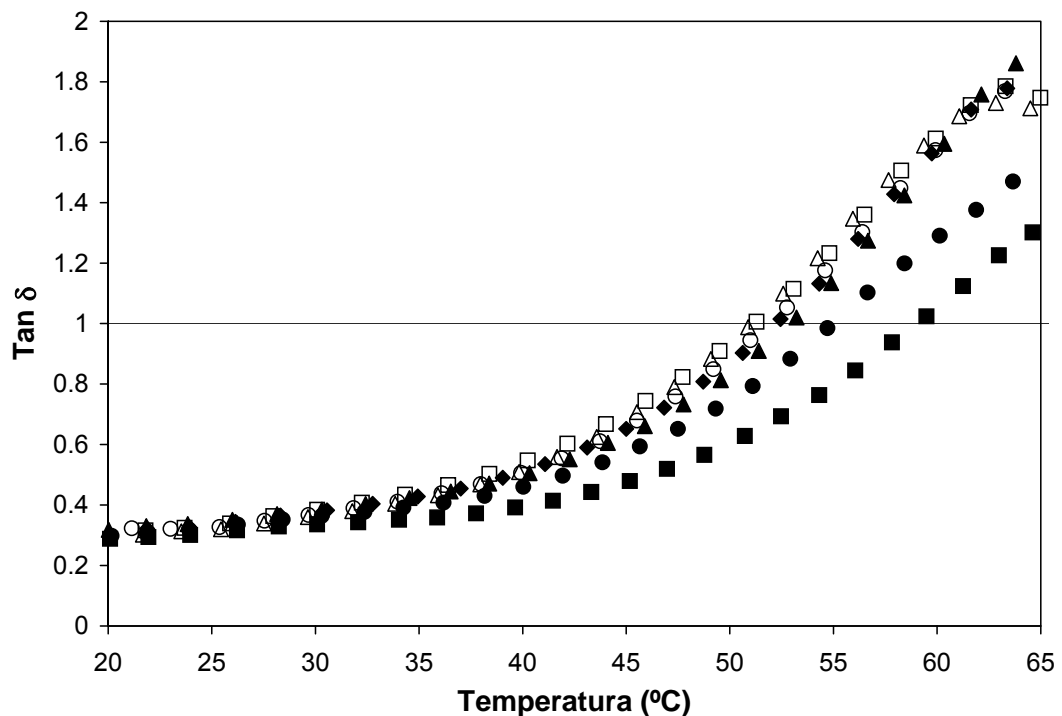


Figura 4.19. Barridos de temperatura para muestras control a 1 (■), 7 (●), 14 (▲), 20 (◆), 27 (□), 34 (○) y 41 (△) días de maduración.

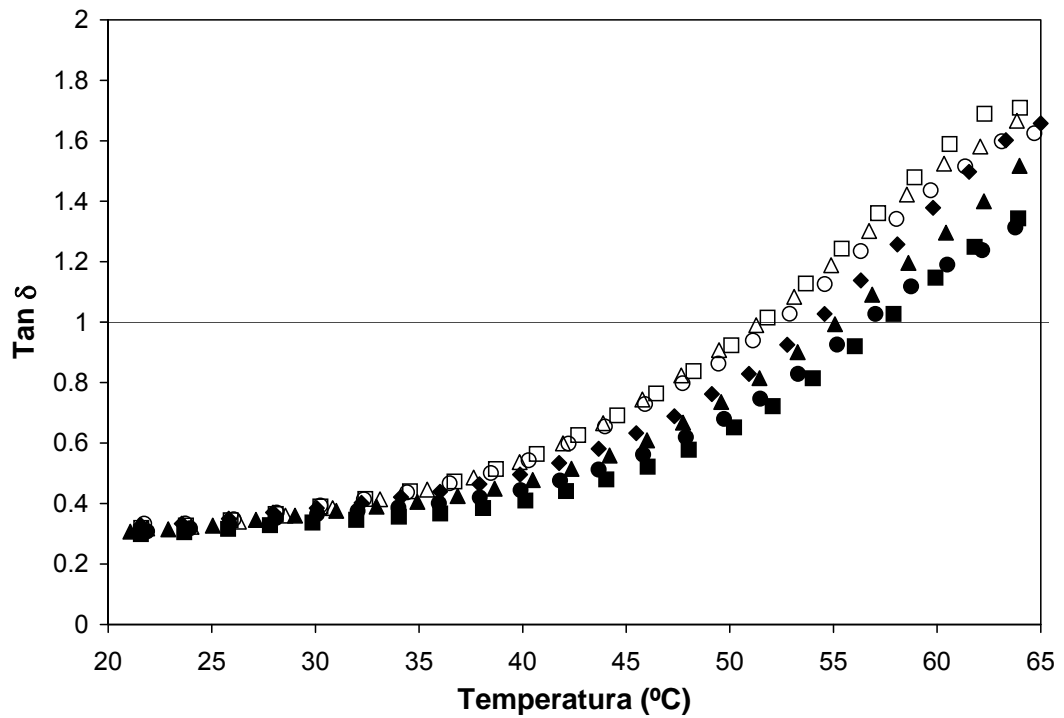


Figura 4.20. Barridos de temperatura para muestras congeladas a 1 (■), 7 (●), 14 (▲), 20 (◆), 27 (□), 34 (○) y 41 (△) días de maduración.

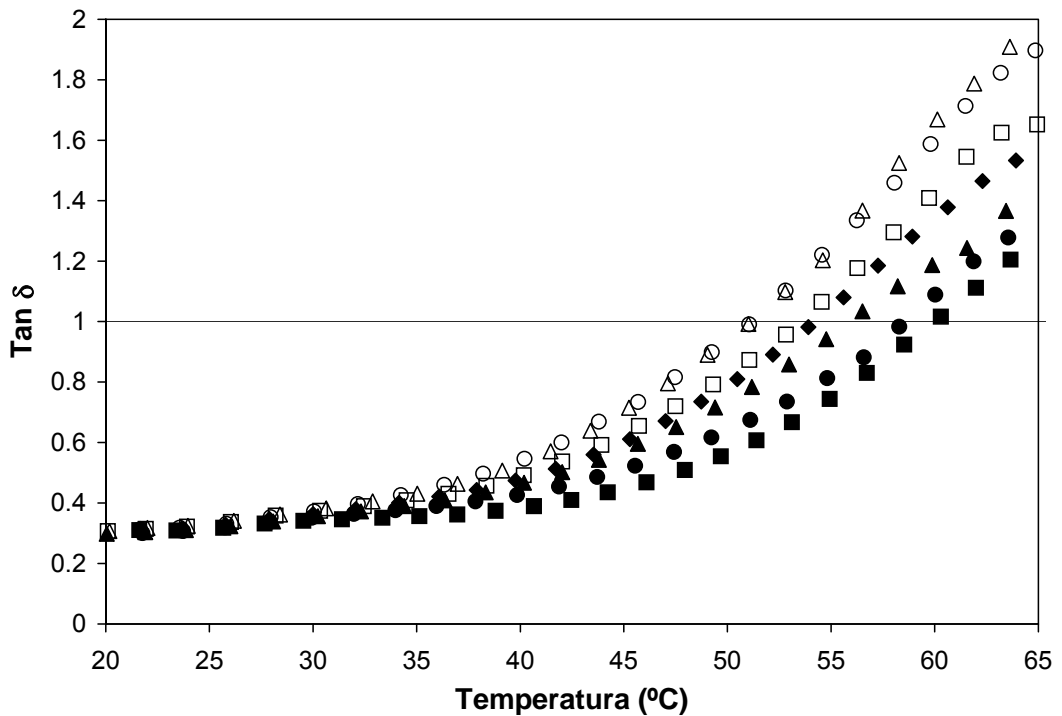


Figura 4.21. Barridos de temperatura para muestras almacenadas congeladas a 1 (■), 7 (●), 14 (▲), 20 (◆), 27 (□), 34 (○) y 41 (△) días de maduración.

En la Figura 4.22, se observa que la temperatura de cruce disminuye en función del tiempo de maduración y que a partir de los 20 días, las mismas son similares para los 3 tratamientos estudiados. En el Anexo D se informan los valores de las determinaciones individuales. En general, las muestras congeladas y las muestras almacenadas congeladas presentaron una mayor temperatura de cruce que las muestras control. Además se observa que las muestras control poseen un descenso inicial de la temperatura de cruce más marcado que las muestras congeladas y las muestras almacenadas congeladas, pero todas las muestras presentaron una temperatura de cruce similar luego de 20 días de maduración. Esto está de acuerdo con la bibliografía (Bertola *et al.*, 1996 a y b; Bevilacqua, 1997; Chaves *et al.*, 1999; Kuo y Gunasekaran, 2003) donde se informa que un queso Mozzarella que se congela, necesita un período de maduración de 7 a 20 días a 4°C para lograr que sus propiedades texturales y funcionales sean similares a las de un queso Mozzarella que no fue congelado.

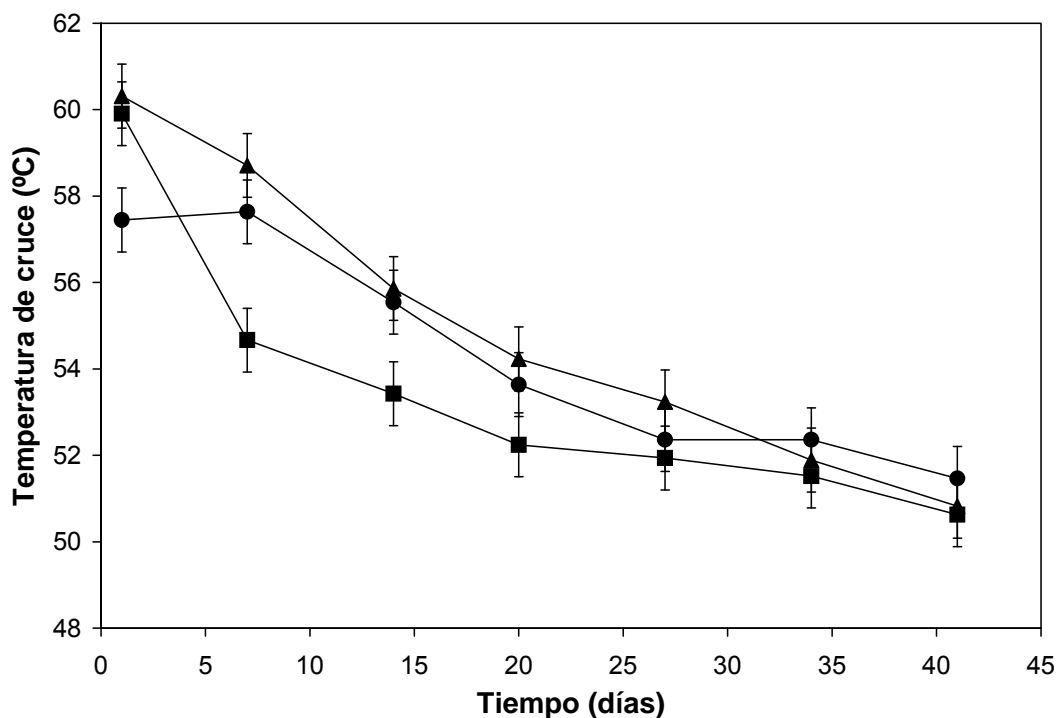


Figura 4.22. Temperaturas de cruce para muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲). Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

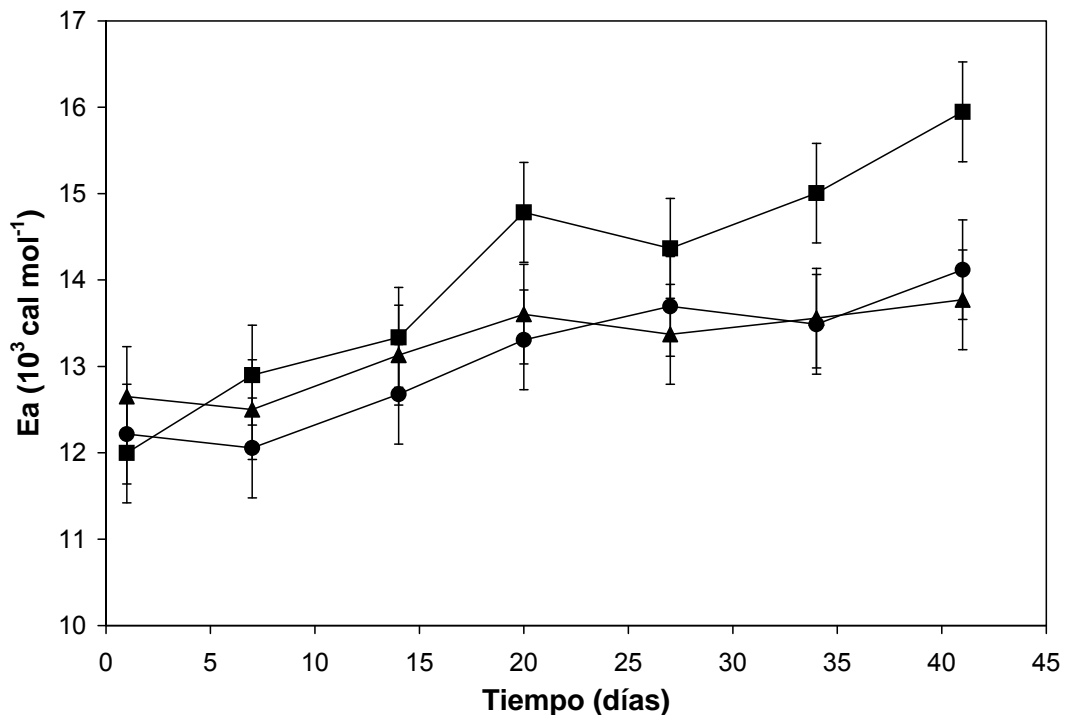


Figura 4.23. Energía de activación para muestras control (■), congeladas (●) y almacenadas congeladas (▲). Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

En la Figura 4.23, se observan los valores de E_a obtenidos para las condiciones estudiadas. En el Anexo D se informan los valores de las determinaciones individuales. Estos valores están en el orden de magnitud de los encontrados en la bibliografía. Por ejemplo, para quesos Cheddar y Mozzarella se informan 32 y 8 Kcal mol $^{-1}$, respectivamente (Gunasekaran y Ak, 2003). En este caso, la energía de activación es afectada significativamente por el proceso de congelación, observándose al final del período de maduración estudiado valores mayores para las muestras control que para las congeladas y las almacenadas congeladas.

4.4. Ensayo de microscopía

El análisis de las micrografías se realizó en forma cualitativa. Los especímenes se analizaron a una magnificación de 120X para determinar si la criofractura fue adecuada. Además, de acuerdo a esta observación se determinó la homogeneidad estructural de los mismos. Luego se aumentó la magnificación para

mejorar la resolución de la observación de la microestructura del queso (400 y 1200X). En el Anexo D se muestra la totalidad de las micrografías obtenidas.

Cuando la microestructura de los quesos fue analizada a baja magnificación y a 1 día de maduración no se observaron diferencias entre los tratamientos (Figura 4.24). Las muestras presentaron una matriz proteica continua, separada por canales interconectados de bordes lisos, los cuales contenían al suero y a la grasa que fueron eliminados durante la preparación de la muestra.

Al aumentar la magnificación no se observaron diferencias en la

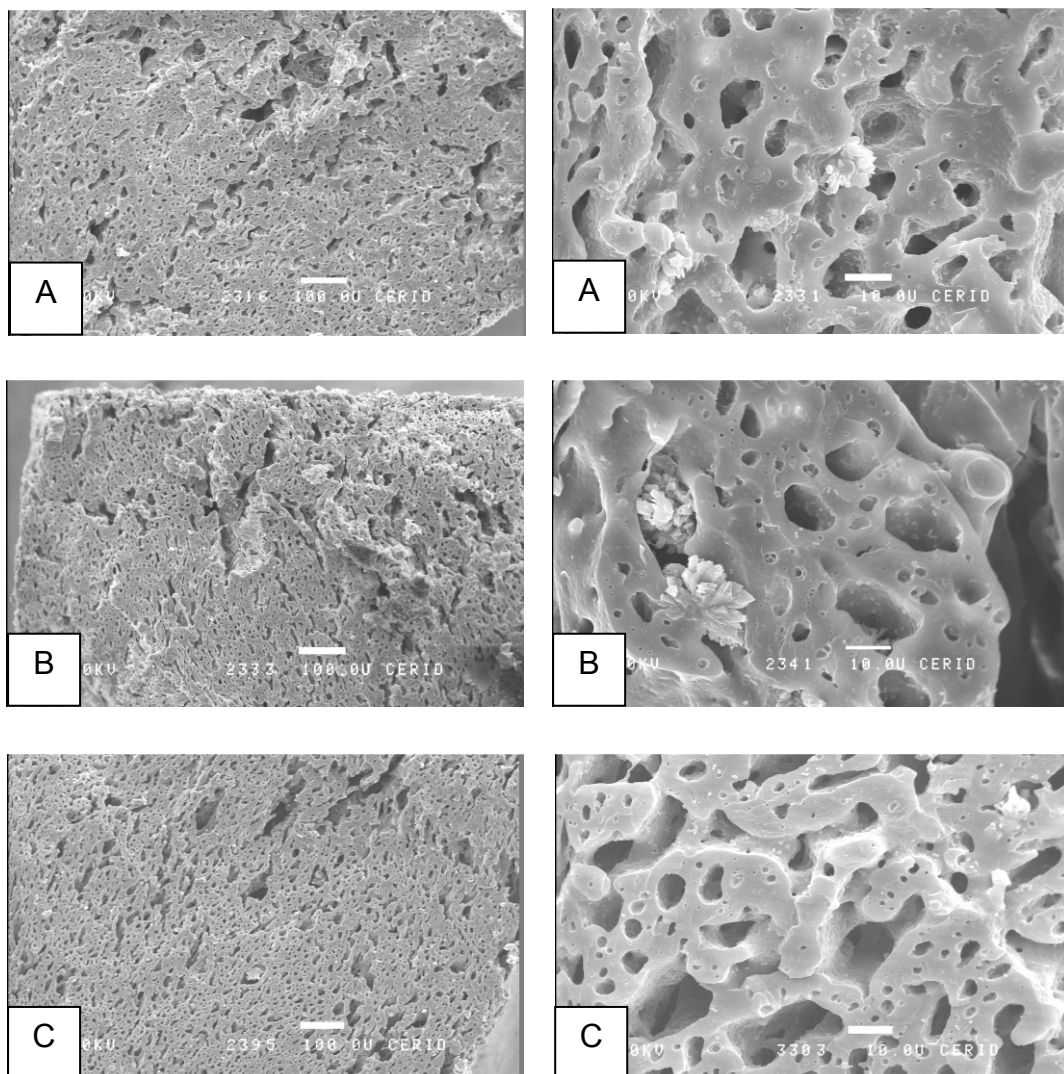


Figura 4.24. Micrografías SEM a 120X de las muestras control (A), congeladas (B) y almacenadas congeladas (C) a 1 día de maduración.

Figura 4.25. Micrografías SEM a 1200X de las muestras control (A), congeladas (B) y almacenadas congeladas (C) a 1 día de maduración.

microestructura de las muestras (Figura 4.25). Se observaron estructuras cristalinas, las cuales podrían corresponder a cristales de NaCl formados debido al proceso de deshidratación usado durante la preparación de las muestras. El espesor de los canales estuvo comprendido entre 5 y 20 μm , y en sus paredes se observaron pegados algunos cuerpos ovoides, que de acuerdo con McMahon *et al.* (1999) corresponderían a las membranas de las bacterias del fermento. Además se observaron vacuolas de un tamaño de 1 a 25 μm dispersas por toda la matriz.

A los 14 días de maduración no se observaron diferencias entre las muestras (Figura 4.26). Las paredes de los canales cambian de apariencia, de suave y lisa al día 1, a rugosa debido a la presencia de múltiples depresiones de un diámetro comprendido entre 1 y 10 μm al día 14. Tales depresiones, de acuerdo con McMahon *et al.* (1999), están asociadas a la presión que ejerce la matriz sobre los componentes sólidos contenidos en los canales de suero y grasa, los cuales corresponden a los glóbulos grasos que se encuentran en estado sólido a la temperatura de maduración del queso. Por otro lado, las vacuolas y canales disminuyen su tamaño, proceso que se asocia a la migración del agua que contienen los canales hacia la matriz de proteína, provocando que la misma aumente de tamaño y disminuya su porosidad (Bertola *et al.*, 1996 a y b; Guo *et al.*, 1997; McMahon *et al.*, 1999; Rowney *et al.*, 1999; Kuo y Gunasekaran, 2003).

Al los 41 días de maduración las depresiones se vuelven más profundas debido a que la matriz de proteína se extiende dentro de los canales, ocupando completamente el espacio intersticial entre los glóbulos de grasa (Figura 4.27). Esto permite distinguir depresiones esféricas, observándose una estructura similar a un panal de abeja. La observación a altas magnificaciones (400, 1200X) permitió encontrar pequeñas diferencias entre las muestras. En las muestras almacenadas congeladas se observó que la estructura similar a panal de abeja no está tan claramente definida como en los otros tratamientos. Además se observaron pequeños desgarros o grietas en la matriz de proteína.

Diefes *et al.* (1993) y Kuo y Gunasekaran (2003) explicaron que la deshidratación local de las proteínas y la formación de cristales de hielo durante la congelación y el almacenamiento de las muestras congeladas podría causar rupturas en la estructura proteica. Más aún, un almacenamiento muy extendido de las muestras congeladas podría resultar en una ruptura más extensa de la estructura del queso debido a la recristalización de los cristales de hielo. Así, luego de la descongelación, las proteínas son incapaces de ligar el agua completamente.

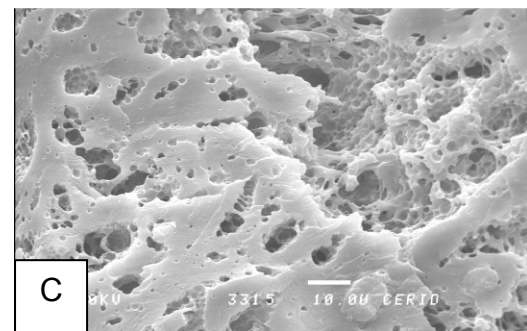
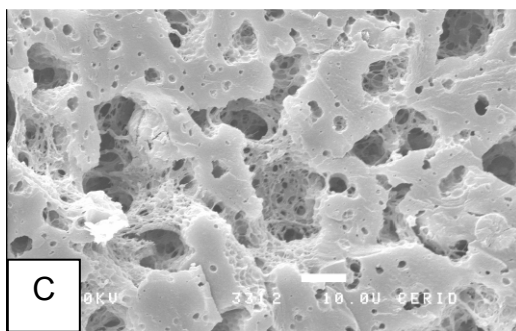
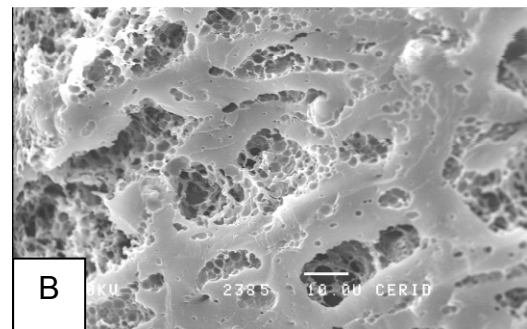
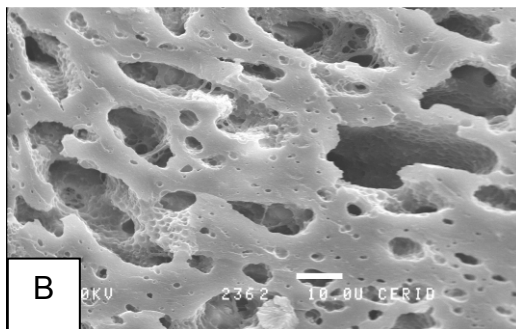
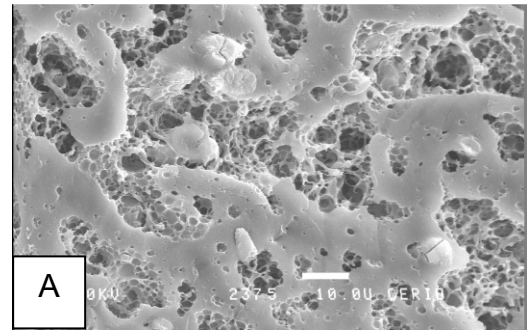
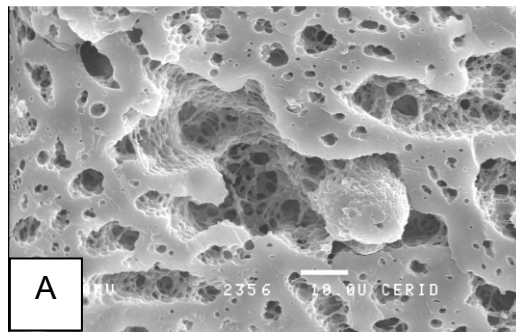


Figura 4.26. Micrografías SEM a 1200X de las muestras control (A), congeladas (B) y almacenadas congeladas (C) a 14 días de maduración.

Figura 4.27. Micrografías SEM a 1200X de las muestras control (A), congeladas (B) y almacenadas congeladas (C) a 41 días de maduración.

En este caso se supone que la estructura del queso Mozzarella congelado y almacenado congelado podría haber sido afectada por la rehidratación parcial de la matriz de proteína. Cabe aclarar que las diferencias observadas son muy pequeñas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos relacionados con las propiedades viscoelásticas, a través de las observaciones de la microestructura se podría explicar el comportamiento de la energía de activación, la cual está asociada a la variación de la viscosidad compleja con la temperatura. La energía de

activación es la barrera energética que debe ser sobrepasada para que ocurra un flujo viscoso (Rao, 1999; Tunick, 2000). La menor energía que necesitan las muestras congeladas para comenzar a fluir a los 41 días de maduración se podría relacionar con los desgarros o pérdida de integridad estructural. Sin embargo, cabe recordar que la temperatura de cruce (propiedad relacionada con la capacidad de fundido) no fue afectada por el proceso de congelación estudiado.

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Las principales variables de control del proceso de congelación por inmersión de queso Mozzarella son la temperatura de la solución y el tiempo de inmersión. Cuando la temperatura de la solución es cercana al punto inicial de congelación suele observarse el fenómeno de sobreenfriamiento, el cual es la causa principal del ingreso no controlado de soluto.

Una importante ventaja de la congelación por inmersión de queso Mozzarella es que la deshidratación y pérdida de peso son muy pequeñas comparadas con la congelación tradicional o con el salado por inmersión cuando se realizan como procesos independientes.

El punto inicial de congelación de queso Mozzarella sin sal fue de aproximadamente -1.7°C . A medida que ingresa NaCl, este valor es afectado por la concentración de soluto.

Los modelos matemáticos para la representación del proceso de congelación por inmersión teniendo en cuenta la información descrita anteriormente permitieron seleccionar una condición experimental apropiada para estudiar el efecto del proceso de congelación y del almacenamiento de las muestras congeladas sobre los principales cambios bioquímicos, reológicos y microestructurales que ocurren durante la maduración del queso Mozzarella.

El estudio electroforético mostró que no existe efecto significativo de la congelación por inmersión ni del almacenamiento congelado sobre la proteólisis de las caseínas. La α_{S1} -caseína disminuye aproximadamente un 53% a 41 días de maduración respecto al contenido inicial en el queso, indicando que la acción del coagulante residual es importante, aún cuando su concentración pudo ser reducida durante la elaboración.

El estudio cromatográfico de la fracción soluble en agua a pH 4.6 mostró que las diferencias entre los tratamientos estudiados son pequeñas y se observan recién a partir de los 20 días a través de la aparición de picos de pequeña área cromatográfica.

El análisis reológico mostró que los módulos de almacenamiento y de pérdida disminuyeron tanto con el aumento de la temperatura de los ensayos reológicos como con el tiempo de maduración. Analizando la temperatura de cruce, se observó que la misma disminuye a medida que el queso madura. Las muestras congeladas y las almacenadas congeladas presentaron mayor temperatura de cruce que las

muestras control. Sin embargo, a partir de los 20 días de maduración las temperaturas de cruce fueron similares. El efecto de la temperatura sobre las propiedades viscoelásticas fue estudiado mediante la relación de la viscosidad compleja con la temperatura a través de una expresión tipo Arrhenius. Las muestras control presentaron valores de energía de activación diferentes a las muestras congeladas y almacenadas congeladas, siendo significativamente mayores ($p < 0.05$) al final del período de maduración estudiado y observándose valores de 15.9 ± 0.4 , 14.1 ± 0.5 y 13.8 ± 0.6 Kcal mol⁻¹ a 41 días para las muestras control, congeladas y almacenadas congeladas, respectivamente.

Los estudios de microscopía mostraron claramente los cambios microestructurales durante la maduración, fundamentalmente la formación de una estructura tipo panal de abeja característica de la migración del agua desde los canales de suero y grasa hacia la matriz de proteína. Además se observó que la congelación por inmersión no afectó la microestructura del queso Mozzarella y que el almacenamiento de las muestras congeladas la afectó levemente.

Si bien la congelación por inmersión afectó estadísticamente algunos de los parámetros estudiados, las diferencias observadas son pequeñas, por lo que se considera que el proceso de congelación por inmersión podría ser muy útil para la elaboración y conservación del queso Mozzarella.

Anexo

***A PRINCIPALES VARIABLES DE
OPERACIÓN QUE AFECTAN LA
CONGELACIÓN DE QUESOS
MOZZARELLA POR INMERSIÓN***

Para seleccionar el diseño experimental principal de esta Tesis fue necesario conocer la influencia de determinadas variables del proceso de inmersión. Por tal motivo se desarrolló una experiencia para determinar cómo influyen la composición y la temperatura de la solución, y el tiempo de inmersión sobre los perfiles de temperatura central, los contenidos de humedad y NaCl y la pérdida de peso durante el proceso de congelación por inmersión de queso Mozzarella.

A.1. Materiales y métodos

Muestra. Barras de queso Mozzarella comercial fueron compradas en un mercado local (peso: 3500 g, dimensiones: 28×10×10 cm³, humedad: 45.79±0.04%, grasa: 23.2±0.4%, proteína: 21±2%, NaCl: 1.45±0.04%). Placas de 3 cm de espesor se cortaron en forma perpendicular al eje mayor de la barra de queso. Cilindros de 1 cm de radio (unidad de muestreo) se cortaron de cada placa con un molde metálico afilado a 1 cm del borde.

Solución de inmersión. Para cada caso estudiado, la relación de volumen solución/sólido fue aproximadamente de 50 para no afectar la temperatura de la solución al inicio de la experiencia. Las soluciones no fueron agitadas y se colocaron en una Cámara TABAI Comstar PR 4GM (TABM ESPEC CORP., Osaka, Japón) para alcanzar la temperatura deseada. Las temperaturas de la solución y del aire se midieron con termocuplas T de 24 AWG (OMEGA Engineering, Inc., Stamford, USA).

Diseño experimental. Se usó un modelo completamente aleatorizado de tres factores: tiempo de inmersión, temperatura y concentración de NaCl de la solución. En la Tabla A.1 se muestra un resumen del diseño experimental utilizado.

Perfiles de temperatura central. En cada experiencia se usaron 3 cilindros. En cada cilindro de queso se insertó una termocupla T de 30 AWG (OMEGA Engineering, Inc., Stamford, USA) siguiendo el eje principal del cilindro hasta una profundidad de 1.5 cm. El cilindro se colocó en una pequeña canasta construida con tela plástica para permitir el ingreso de la solución y evitar que el cilindro flote. Los valores de temperatura fueron obtenidos a través de un sistema de adquisición de datos Data Shuttle DS-16-8-TC (OMEGA Engineering Inc., Stamford, USA) con una velocidad de 1 s⁻¹. Cada experiencia fue repetida 2 veces.

Tabla A.1. Diseño experimental.

Factor	Tipo de Factor	Niveles
Concentración de la solución de inmersión	Fijo	20 y 23% p/p
Temperatura de la solución de inmersión	Aleatorio	-10 , -15 y -20°C
Tiempo de inmersión	Aleatorio	5, 10, 20, 30, 45 y 60 min

Contenido de humedad, contenido de NaCl y pérdida de peso. Dieciocho cilindros se pesaron y luego se colocaron en una canasta de tela plástica, la cual mantuvo separados a los cilindros. Las muestras se retiraron de a tres, a los 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min, se enjuagaron con agua destilada refrigerada, se secaron con papel absorbente y se pesaron. Se envolvieron en papel aluminio y se colocaron en freezer a -20°C hasta la determinación de los contenidos de humedad y de NaCl. El contenido de humedad fue determinado en un horno microondas CEM AVC 80 (CEM, Mattheus, USA). El contenido de NaCl fue determinado según Fox (1963) con un titulador automático modelo DL 40 RC (Mettler Instrumente AG, Suiza). La pérdida de peso se determinó como la relación entre la diferencia de pesos de las muestras antes y después de la congelación y el peso inicial.

Análisis estadístico. Los datos experimentales fueron estudiados mediante análisis de la variancia multifactorial usando Statgraphics 3.0 (Statgraphics Inc., Rockville, MD, USA). El nivel de significación usado fue $p < 0.05$.

A.2. Resultados y discusión

Perfiles de temperatura central. Se observaron valores de temperatura inicial de congelación (T_f) entre -3.7 y -5°C (Figuras A.1 y A.2). En las experiencias realizadas a -10°C , algunas muestras no se congelaron aunque su temperatura estaba por debajo de T_f y otras se congelaron pero a distintos tiempos. Esto fue observado tanto en la solución de 20% como en la de 23%. Este fenómeno puede ser debido a que la temperatura de la solución de inmersión es cercana a la T_f , haciendo que el proceso de congelación sea más lento y que no se inicie en la superficie de la muestra (Lucas *et al.*, 1999a).

Cuando se trabajó a -15°C , se observó que la congelación se inició aproximadamente a los 6 min, para las experiencias en ambas soluciones, alcanzándose -10°C a 17 y 16 min, para 20 y 23%, respectivamente (Figura A.1 y A.2).

Teniendo en cuenta el punto inicial de congelación de la solución de inmersión a -20°C , se obtiene un sistema monofásico para la solución de 23% y uno bifásico para la solución de 20%. Las muestras sumergidas en la solución de 20% no presentaron sobreenfriamiento, pero sí las sumergidas en la solución de 23%, alcanzando -10°C a los 15 y 12 min, para 20 y 23%, respectivamente (Figura A.2). La diferencia de tiempo para alcanzar -10°C se debe a la diferencia de temperatura entre las soluciones de inmersión. La temperatura de la solución bifásica se mantuvo a -17.5°C mientras que la de la monofásica se mantuvo a -18.5°C .

Se puede inferir que cuanto más baja es la temperatura de la solución, más rápido se congelan las muestras, y en tiempos más uniformes. Además la presencia de cristales de hielo en la solución de inmersión provocaría una congelación sin la presencia de sobreenfriamiento. Esta condición necesita un mayor estudio debido a que es un factor a tener en cuenta cuando se busca obtener una congelación homogénea y más rápida.

Contenido de humedad. Se encontró que los factores tiempo y temperatura fueron significativos junto con las interacciones tiempo-temperatura-concentración, temperatura-concentración y tiempo-concentración. La mayor deshidratación se observó a -10°C ($<4\%$, Figura A.3a). Con la solución de 20%, el contenido de humedad de las muestras se mantuvo aproximadamente en 45.4% , mientras que con la solución de 23%, al cabo de 60 min se observa un contenido de humedad de aproximadamente 44.8% (Figura A.3b). Esto demuestra que sólo ocurre una deshidratación pequeña en cualquiera de las condiciones estudiadas.

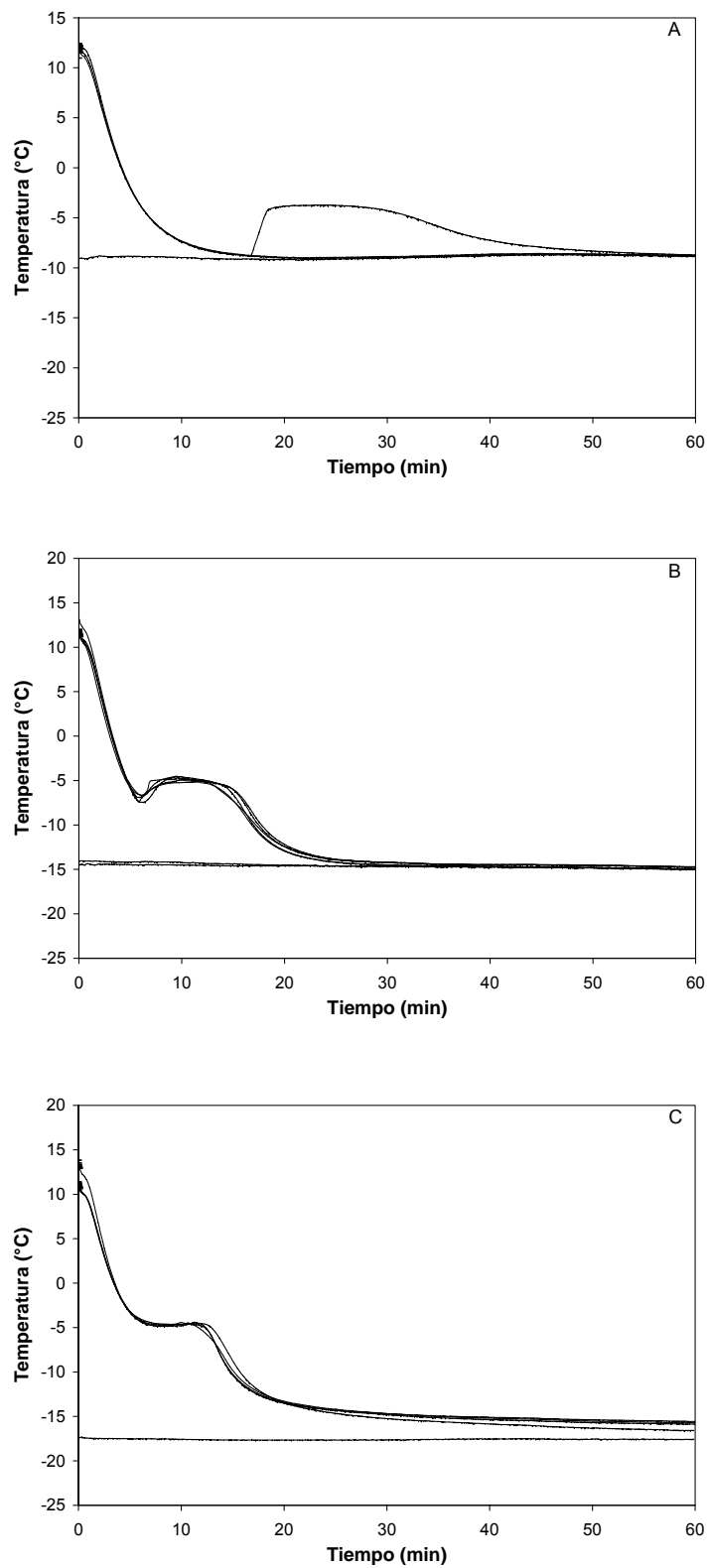


Figura A.1. Perfiles de temperatura observados para una solución al 20% NaCl, A: -10°C, B: -15°C y C: -20°C.

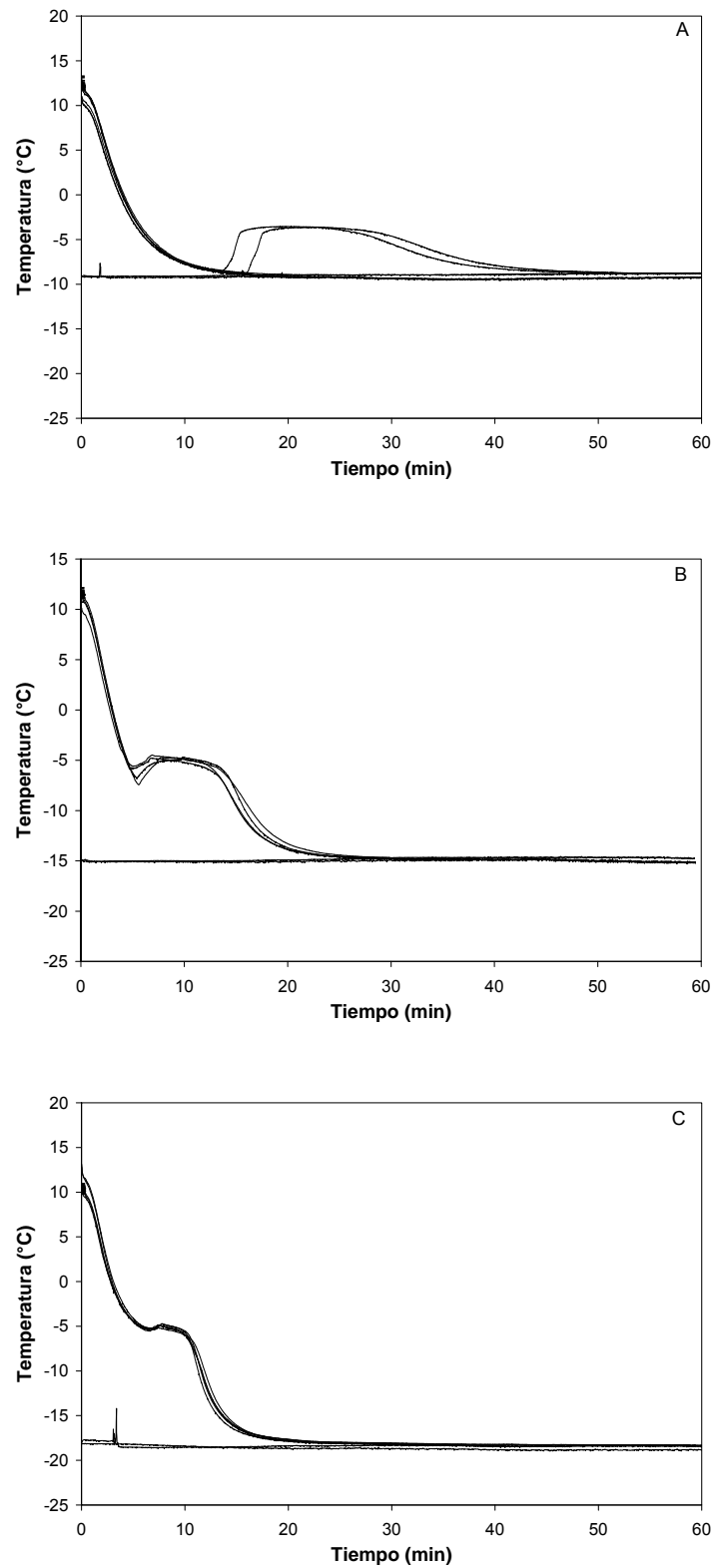


Figura A.2. Perfiles de temperatura observados para una solución al 23% NaCl, A: -10°C , B: -15°C y C: -20°C .

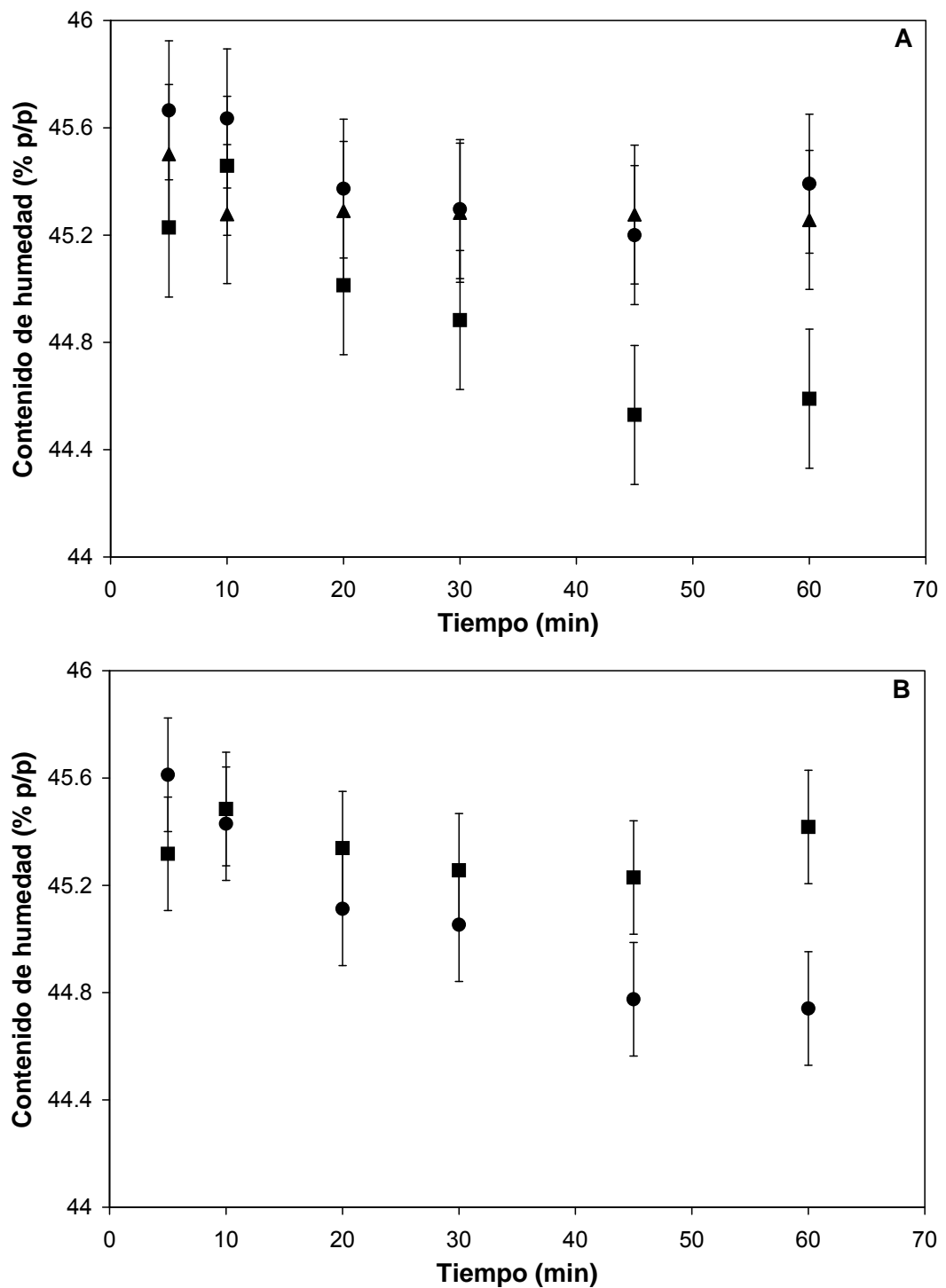


Figura A.3. Gráficos de interacción entre factores principales obtenidos del ANOVA para el contenido de humedad. A: -10°C (■), -15°C (●) y -20°C (▲), B: 20% (■), 23% (●). Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

Contenido de NaCl. Se encontró que los factores tiempo y temperatura fueron significativos junto con la interacción tiempo-temperatura. Se observa que a -10°C se produce la mayor ganancia de soluto (Figura. A.4). A los 60 min, se observan contenidos de NaCl de aproximadamente 2.3, 2.0 y 1.7% para -10 , -15 y -20°C , respectivamente. Esto demuestra que para controlar el ingreso de soluto en este proceso, las principales variables de control son la temperatura de la solución de inmersión y el tiempo de inmersión.

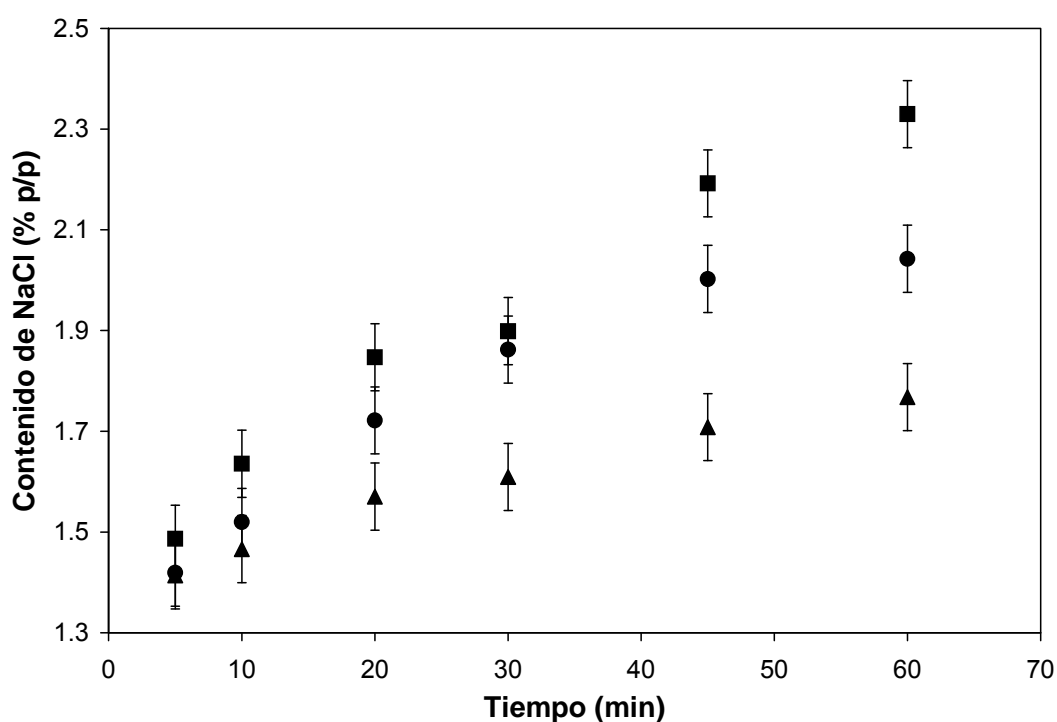


Figura A.4. Gráfico de interacción entre factores principales obtenido del ANOVA para el contenido de NaCl: -10°C (■), -15°C (●) y -20°C (▲). Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

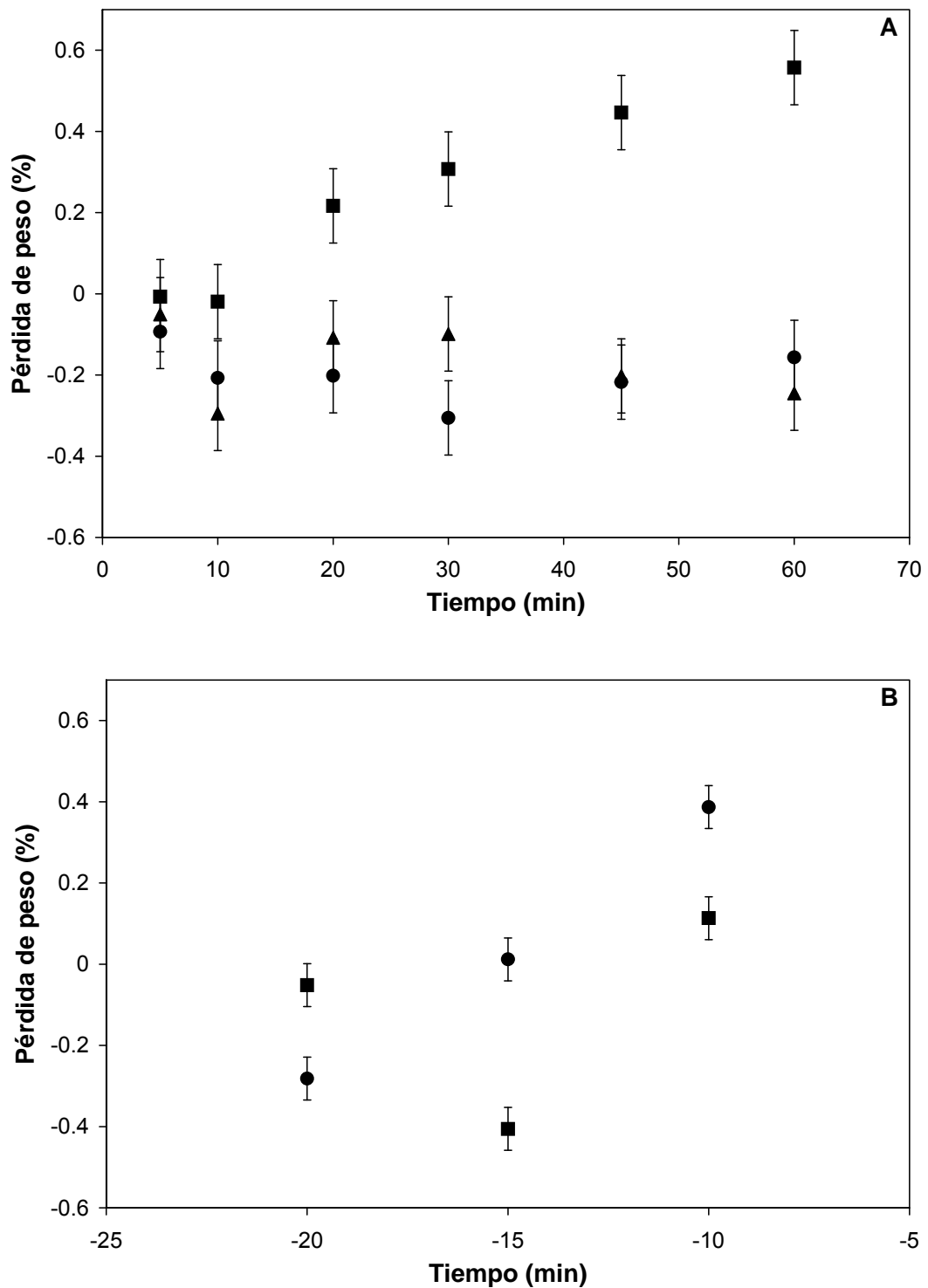


Figura A.5. Gráficos de interacción entre factores principales obtenidos del ANOVA para la pérdida de peso. A: -10°C (■), -15°C (●) y -20°C (▲), B: 20% (■), 23% (●). Los valores corresponden al promedio para cada día de maduración con un intervalo de confianza del 95%.

Pérdida de peso. Se encontró que los factores tiempo y temperatura fueron significativos, junto con las interacciones tiempo-temperatura, temperatura-concentración y tiempo-concentración. Se observó que a -15 y -20°C las muestras prácticamente no pierden peso (Figura. A.5a). En la condición más deshidratante, es decir a -10°C y 60 min, sólo se observó una pérdida de peso de aproximadamente 0.4%. La mayor pérdida de peso se observó para la solución de inmersión de 23% (Figura. A.5b). Sin embargo, al disminuir la temperatura de la solución de inmersión, la pérdida de peso disminuye, alcanzándose valores cercanos a cero. Se destaca que las pérdidas de peso en ningún caso superaron el 0.9%, lo que constituye una ventaja significativa del presente método de congelación.

A.3. Conclusiones

Las principales variables de control del proceso de congelación por inmersión de queso Mozzarella son la temperatura de la solución y el tiempo de inmersión. En el centro de las muestras estudiadas se alcanzó -10°C en aproximadamente 12 min cuando se usó una solución de 23% a -20°C . Se observa una pérdida de peso muy pequeña, lo cual es una importante ventaja del método. La mayor pérdida de humedad y fundamentalmente la mayor ganancia de NaCl se observaron cuando se usan las soluciones de -10°C debido a la presencia del fenómeno de sobreenfriamiento que mantiene las muestras descongeladas, favoreciendo el fenómeno de transferencia de materia.

Anexo B

***PUNTO INICIAL DE
CONGELACIÓN DE QUESO
MOZZARELLA***

La mayoría de los alimentos contiene grandes cantidades de agua. Cuando estos alimentos son enfriados debajo de 0°C, se alcanza una temperatura a partir de la cual comienza a formarse hielo. Mientras que el agua posee un solo punto de congelación, los alimentos poseen un rango de temperaturas de congelación debido a la presencia de diferentes solutos en solución.

El punto inicial de congelación de un alimento es la temperatura más elevada a la cual el hielo en el alimento puede existir en equilibrio térmico (Miles, 1991). Esta es una de las propiedades termodinámicas más importantes que se requiere para la predicción de propiedades térmicas y físicas en un alimento congelado. Valores del punto inicial de congelación pueden ser usados para calcular propiedades tales como el peso molecular efectivo, la actividad de agua, la fracción de agua unida, libre o congelada y la entalpía del producto congelado, o para construir el diagrama de estado (Rahman *et al.*, 2002). Por lo tanto, el conocimiento del punto inicial de congelación es importante para analizar los procesos de congelación o descongelación de alimentos.

Desafortunadamente, en el caso de quesos los datos de punto inicial de congelación no son abundantes en la literatura (Polley *et al.*, 1980; Esteban *et al.*, 1987; Pham, 1996; Miles *et al.*, 1997). El punto inicial de congelación es afectado fundamentalmente por la concentración acuosa de solutos de bajo peso molecular. Esteban *et al.* (1987) relacionaron el punto inicial de congelación de soluciones acuosas de extractos de quesos con la actividad de agua del queso. Los autores indicaron que en quesos frescos la disminución de la presión del vapor de agua es determinada prácticamente sólo por la presencia de cloruro de sodio. Sin embargo, en muestras de queso sin sal, se puede observar un descenso en el punto inicial de congelación, probablemente debido a la presencia de los sólidos solubles generalmente asociados a los productos derivados de la degradación inicial de las proteínas. Por lo tanto, nuestros objetivos fueron medir el punto inicial de congelación y estudiar la contribución de los sólidos solubles a pH 4.6 en el descenso del punto inicial de congelación de queso Mozzarella fresco sin salar.

B.1. Materiales y métodos

Muestra. Queso Mozzarella sin salar y sin maduración (peso: 3500 g, dimensiones: 30×10×10 cm³) fue suministrado por una empresa de la zona. La composición inicial

fue: humedad: $50.6\pm 0.1\%$, proteína: $26.3\pm 0.3\%$, grasa: $17.00\pm 0.01\%$, NaCl: No detectado.

Perfiles de temperatura central en queso Mozzarella. Se usaron cilindros de queso Mozzarella de 3 cm de altura y 1 cm de radio. En cada uno de ellos se insertó una termocupla T de 30 AWG (OMEGA Engineering, Inc., Stanford, USA) siguiendo el eje principal del cilindro hasta una profundidad de 1.5 cm. Los cilindros fueron congelados por inmersión en una solución de NaCl 20% p/p, enfriada mediante un equipo de enfriamiento HAAKE EK45 (Thermo Haake International, Karlsruhe, Alemania). Los valores de temperatura fueron obtenidos a través de un sistema de adquisición de datos Data Shuttle DS-16-8-TC (OMEGA Engineering Inc., Stanford, USA) con una velocidad de 1 s^{-1} . Se obtuvieron los perfiles de temperatura usando 6 cilindros.

Obtención de la fracción de sólidos solubles. La fracción de sólidos solubles en agua a pH 4.6 se obtuvo utilizando el método propuesto por Kuchroo y Fox (1982). Se pesaron aproximadamente 20 g de queso previamente rallado y se agregaron 30 ml de agua destilada. La mezcla se homogeneizó con un equipo Ultra-Turrax T25 (Ika Werke, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Alemania) durante 2 min llegando a velocidad máxima y temperatura ambiente. La mezcla obtenida se trasvasó a un vaso de precipitado y se dejó reposar en baño a 40°C durante 1 h. Posteriormente, se llevó a pH de 4.6 con HCl 1 N agitando continuamente hasta obtener una lectura estable durante 5 min. Luego se centrifugó durante 30 min a 5°C y una velocidad de 4800 rpm utilizando una centrífuga Biofuge 28 RS (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Alemania). Luego de eliminar la capa superficial de grasa se separó el sobrenadante del precipitado, descartándose este último. El sobrenadante se filtró con papel Whatman N°42 (Whatman Int. Ltd., Maidstone, Reino Unido). La solución filtrada se liofilizó utilizando un liofilizador Freeze Dryer FD 2.5 (Heto Lab Equipment A/S, Allerød, Dinamarca) constituyendo la fracción SS.

Para la cuantificación del contenido de nitrógeno se empleó el método Kjeldahl según el procedimiento establecido por Büchi Labortechnik AG (1998), utilizando: un digestor automático Büchi 430, una unidad de destilación Büchi 322, una unidad de control Büchi 342 (Büchi, Flawil, Suiza) y un titulador automático Mettler DL40 RC (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Suiza).

Determinación del punto inicial de congelación a partir del perfil térmico.

Cuando una solución acuosa es enfriada sin agitación por debajo de su punto inicial de congelación (sobreenfriamiento), la temperatura inicialmente disminuye para inducir la nucleación y cuando se alcanza un punto donde el número o tamaño de los núcleos es suficiente, se inicia una auto-cristalización. A partir de ese momento, la temperatura aumenta rápidamente desde la temperatura de sobreenfriamiento hasta una meseta de temperatura relativamente constante que corresponde al punto inicial de congelación de la muestra (cuando el calor de cristalización es balanceado por la remoción de calor de la solución por el refrigerante). La vibración mecánica durante la nucleación también puede inducir una auto-cristalización (Chen *et al.*, 1996). El método del crioscopio usado en este estudio se basa en este principio.

Un esquema del sistema usado para la medición del punto inicial de congelación se muestra en la Figura B.1. El recipiente que contiene la solución fue construido en vidrio de 2 mm de espesor, y se sumerge en un baño con 4.5 L de una solución de NaCl 23% p/p, enfriada a $-15\pm 1^\circ\text{C}$ con un sistema de enfriamiento HAAKE EK45 (Thermo Haake International, Karlsruhe, Alemania). En el tubo interior se colocan 20 mL de la solución a la que se le determinará el punto inicial de congelación (FP). La temperatura se midió con 3 termocuplas T de 30 AWG

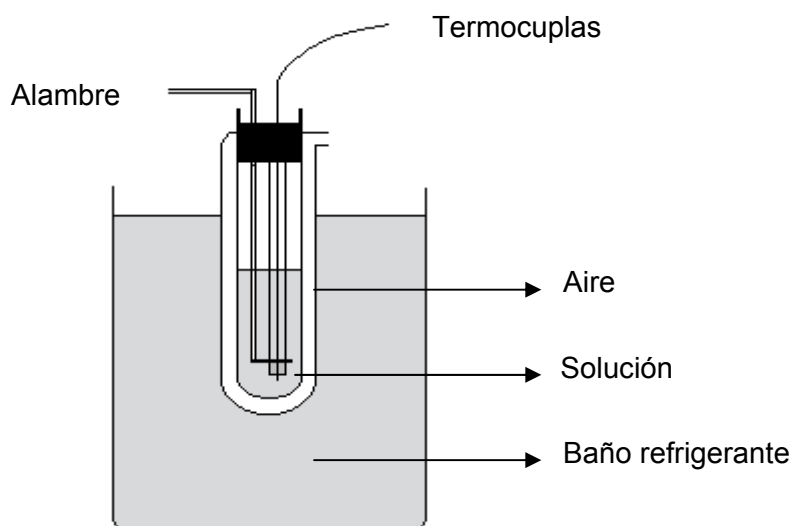


Figura B.1. Esquema del sistema usado para la determinación del FP.

(OMEGA Engineering Inc., Stamford, USA) colocadas en la solución. Los valores de temperatura fueron obtenidos a través de un sistema de adquisición de datos Data Shuttle DS-16-8-TC (OMEGA Engineering Inc., Stamford, USA) con una velocidad de 1 s^{-1} . El diseño del sistema permitió obtener una velocidad de enfriamiento menor a 1°C por min, la cual es recomendada para lograr una adecuada visualización de la meseta de congelación (Fennema *et al.*, 1973).

Para determinar el valor de FP inicial de una solución, la muestra es enfriada lentamente debajo de su punto FP (usualmente se deja que la temperatura descienda aproximadamente 2°C por debajo del mismo), luego se agita con un alambre para inducir la cristalización. La temperatura de la muestra aumenta inmediatamente. Una vez lograda la cristalización (momento en que se alcanza la meseta de congelación), se sigue leyendo la temperatura por aproximadamente 3 min. Para corregir el efecto del sobreenfriamiento sobre la determinación del FP se utiliza la técnica de extrapolación de la meseta de congelación a la curva de enfriamiento del líquido como se muestra en la Figura B.2 (Fennema *et al.*, 1973).

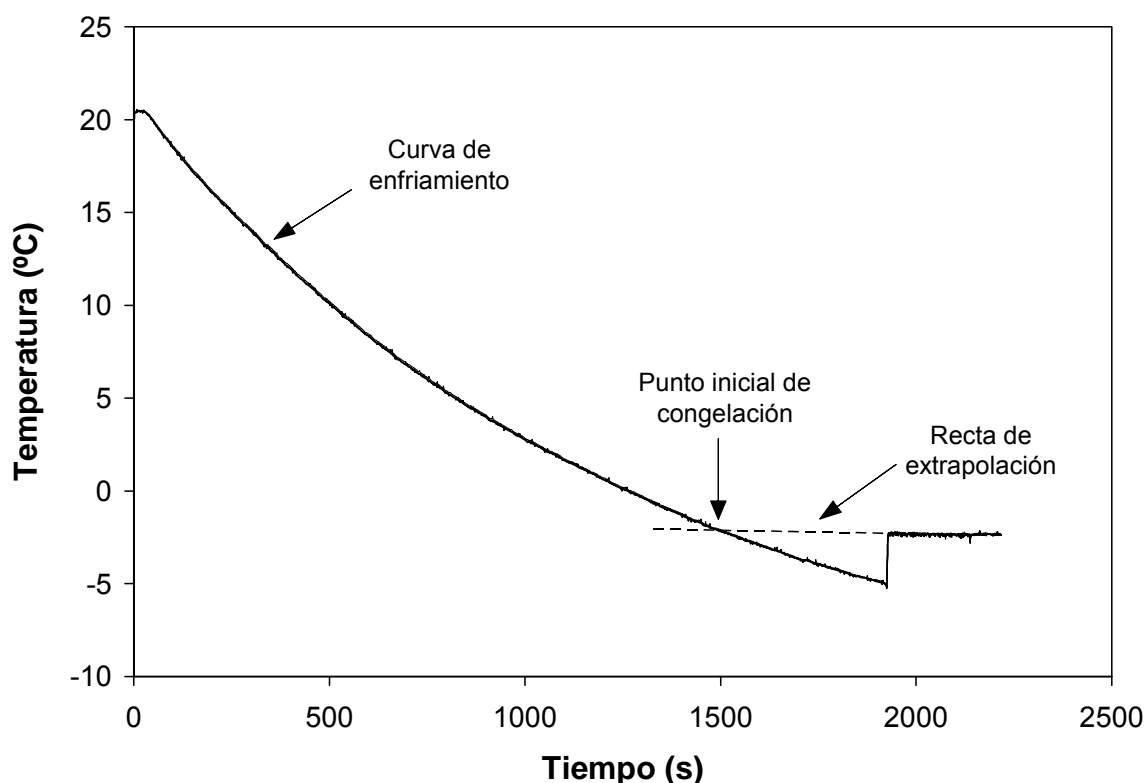


Figura B.2. Curva de enfriamiento de una solución de NaCl 4% p/p. Se muestran los valores de temperatura correspondientes a la lectura de 3 termocuplas.

Determinación del punto inicial de congelación de soluciones cloruro de sodio. El sistema fue utilizado para la determinación de FP de soluciones de NaCl en un rango de concentración comprendido entre 0 y 4%. Las soluciones acuosas fueron obtenidas usando NaCl de calidad pro-análisis y agua bidestilada. Las determinaciones fueron realizadas por cuatuplicado.

Determinación de punto inicial de congelación de soluciones de NaCl y sólidos solubles. Para preparar una solución de características similares a la ocluida en el queso se determinó el contenido de nitrógeno en la fracción de sólidos solubles de queso. Se determinó un valor de 0.093 ± 0.008 meq N /g queso ó 0.18 ± 0.02 meq N/ g agua. Luego se determinó el contenido de nitrógeno en el material liofilizado. Se prepararon las soluciones como se muestra en la Tabla B.1 y se determinaron los contenidos de nitrógeno de las soluciones. Las determinaciones de FP fueron realizadas por duplicado.

B.2. Resultados y discusión

Perfiles de temperatura central en queso Mozzarella. En las muestras de queso Mozzarella sin salar y sin madurar se observaron valores de temperatura inicial de congelación entre -1.2 y -2.4°C (Figura B.3).

Tabla B.1. Concentraciones de las soluciones de NaCl y SS.

Solución	Concentración de NaCl (% p/p)	Concentración de SS (% p/p)
1	0	8.515
2	1.007	8.616
3	2.033	8.782
4	3.024	8.708
5	4.005	8.761

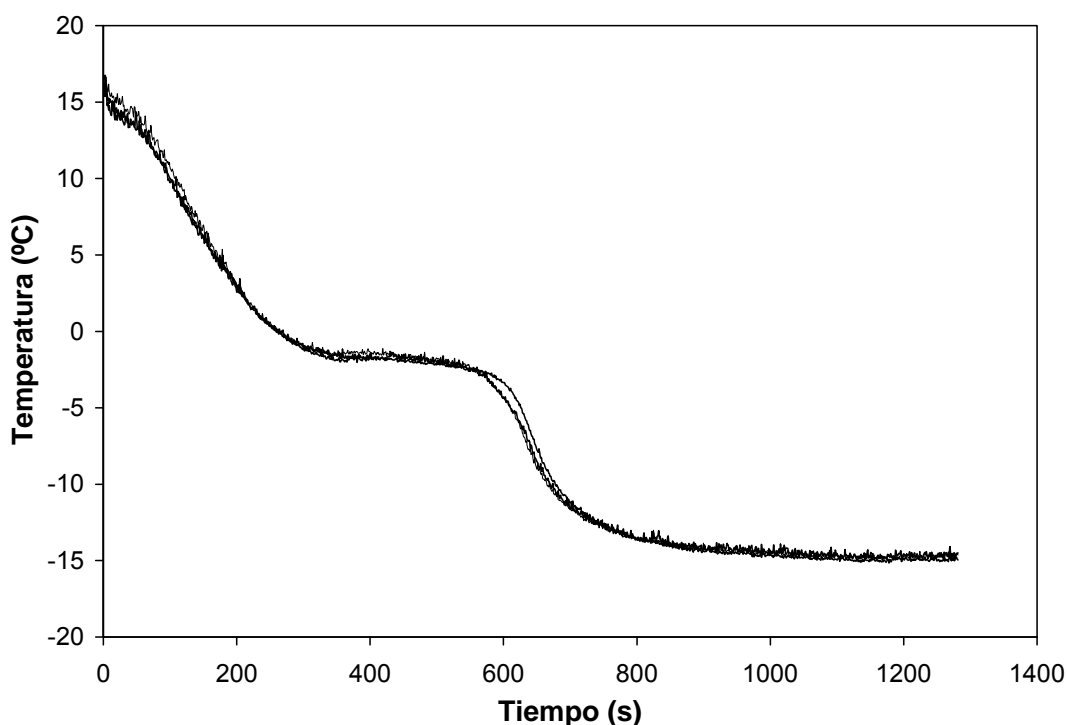


Figura B.3. Perfiles de temperatura central de 3 cilindros de queso Mozzarella.

Punto inicial de congelación de soluciones de NaCl. En la Tabla B.2, se muestran los valores de FP obtenidos para las soluciones de NaCl. El dispositivo construido para la determinación de la temperatura inicial de congelación es satisfactorio, los valores obtenidos tuvieron una desviación estándar del orden de 0.2°C , es de fácil manejo y construcción, y permite obtener el valor de FP en un tiempo relativamente corto, justificando la validez del método utilizado. Las desviaciones estándar estuvieron en el orden de aquellas obtenidas por otros métodos utilizados para la determinación de FP en alimentos (Rahman *et al.*, 2002; James *et al.*, 2005). Los resultados se compararon con datos disponibles en la literatura (Rahman, 1995). Se puede observar que las diferencias entre los valores medidos y publicados son pequeñas (Figura B.4).

Tabla B.2. Valores de FP para las soluciones de NaCl.

Concentración de NaCl (% p/p)	FP experimental ($^{\circ}\text{C}$)	FP teórico ($^{\circ}\text{C}$)
0.000	-0.01 ± 0.04	0
0.982	-0.5 ± 0.2	-0.583
1.988	-1.2 ± 0.4	-1.186
2.922	-1.9 ± 0.3	-1.752
3.884	-2.3 ± 0.2	-2.345

Punto inicial de congelación de soluciones de NaCl y sólidos solubles.

Cuando no se agrega sal al queso, la fase acuosa del queso fresco podría contener principalmente aminoácidos, péptidos, ácido láctico y lactosa. En este caso, los componentes basados en nitrógeno fueron seleccionados como componentes claves para la reconstitución de la solución debido a que la determinación analítica del contenido de nitrógeno es fácil y más precisa que la determinación de otros componentes.

En la Tabla B.3 se muestran los contenidos de N y los valores de FP obtenidos para las soluciones preparadas con NaCl y el extracto liofilizado de los sólidos solubles. Los contenidos de N de las soluciones preparadas estuvieron en el orden de los valores determinados en el extracto de queso. Se puede observar claramente que los sólidos solubles en la fase acuosa del queso intervienen en el descenso crioscópico observado en queso Mozzarella. Esto es, los valores de FP del queso sin sal, que estuvieron entre -1.2 y -2.4°C , son valores comparables con el valor de FP de aproximadamente -1.7°C determinado para la solución de los sólidos solubles con una concentración de N equivalente a la de la fracción soluble del queso sin sal. Más aún, la depresión adicional de aproximadamente -1.7°C permanece cuando se preparan soluciones de sólidos solubles con diferentes concentraciones de NaCl (Figura B.4).

Tabla B.3. Contenido de N, valores de punto inicial de congelación y peso molecular predicho de los sólidos solubles usando la Ec. (B.1) para las soluciones de NaCl y de SS.

Solución	Contenido de N (meq N/ ml sol.)	FP experimental ($^{\circ}\text{C}$)	Peso molecular para SS predicho (g/gmol)
1	0.20 ± 0.01	-1.7 ± 0.1	98.6
2	0.191 ± 0.009	-2.13 ± 0.02	120.9
3	0.185 ± 0.005	-2.6 ± 0.2	151.0
4	0.20 ± 0.02	-3.5 ± 0.2	122.7
5	0.21 ± 0.01	-4.5 ± 0.2	102.6

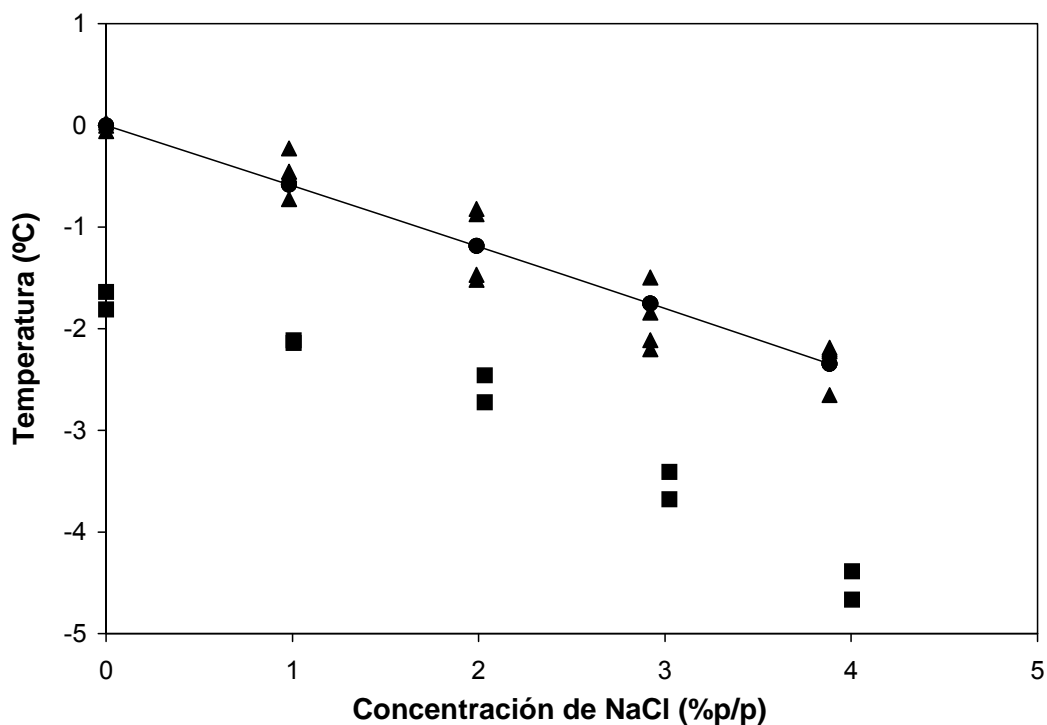


Figura B.4. Valores de FP de las soluciones de NaCl (experimental: ▲; teórico●) y de las soluciones de NaCl y SS (■).

Los modelos para la predicción del punto inicial de congelación están basados en la relación de Clausius-Clapeyron y la ley de Raoult (Pham, 1996; Miles *et al.*, 1997; Van der Sman y Boer, 2005), las cuales establece que el FP está relacionado con la fracción molar de agua libre o la actividad de agua. Para chequear la validez de la determinación del punto inicial de congelación, se usó la ecuación generalizada propuesta por Miles *et al.* (1997) para estimar el punto inicial de congelación.

$$\Delta T = \frac{RT_0^2 \sum \frac{\tau_i X_i}{M_i}}{\Delta H_{melt} \left[\frac{x_w}{M_w} + \sum \frac{\tau_i X_i}{M_i} \right]} \quad (\text{B.1})$$

donde ΔT es la depresión del punto inicial de congelación de una solución ideal, R es la constante de los gases, T_0 es la temperatura de fusión del hielo puro en agua pura (K), $\Delta H_{melt,m}$ es la entalpía molar de fusión del hielo, x_i es la fracción másica del i -ésimo componente y M_i es su peso molecular, y x_w es la fracción másica del agua y M_w es su peso molecular. Los factores τ_i permiten incluir la disociación molecular

y otros comportamientos no ideales. Un valor de 1 fue asignado a cada τ_i como lo sugiere Miles *et al.* (1997). Esto fue considerado dado que los iones relacionados con el NaCl están completamente disociados.

El peso molecular de los sólidos solubles fue obtenido a partir del FP usando la Ec. (B.1), obteniendo un valor de $119 \pm 21 \text{ g mol}^{-1}$ (Tabla B.3). Puede considerarse que el peso molecular permanece casi constante debido a que la dispersión observada podría estar relacionada al error experimental. Estos resultados refuerzan la idea del método experimental satisfactorio usado para la determinación del punto inicial de congelación. Sin embargo, es importante remarcar que la contribución de los componentes con alto peso molecular a la depresión del punto inicial de congelación es despreciable Miles *et al.* (1997), y por lo tanto en este caso, el peso molecular determinado podría estar relacionado con los aminoácidos y otros componentes pequeños que se encuentran en la fracción de sólidos solubles de los quesos (Feeney *et al.*, 2002; Oommen *et al.*, 2002; Dave *et al.*, 2003c).

B.3. Conclusiones

Se mostró que los sólidos solubles a pH 4.6 de queso influyen sobre el descenso crioscópico que se observa durante la congelación de queso Mozzarella sin salar. El punto inicial de congelación de queso Mozzarella sin sal y sin maduración estuvo comprendido en el rango de -1.2 y -2.4°C , mientras que el punto inicial de congelación de la solución del extracto acuoso liofilizado de sólidos solubles, de concentración similar a una ocluida en la matriz del queso sin salar, fue de aproximadamente -1.7°C . Más aún, los puntos iniciales de congelación de las soluciones de sólidos solubles y NaCl mostraron una depresión adicional de aproximadamente -1.7°C comparados con los puntos iniciales de congelación de las soluciones de NaCl. Por esto, fue claramente demostrado que no sólo el NaCl sino también otros sólidos solubles presentes en la fase acuosa contribuyen a la depresión del punto inicial de congelación del queso Mozzarella. El peso molecular de los sólidos solubles en el queso Mozzarella determinados usando la ecuación generalizada propuesta por Miles *et al.* (1997), estuvo en el orden de los pesos moleculares de los sólidos solubles que se espera encontrar en quesos frescos.

El método propuesto para medir el punto inicial de congelación fue apropiado para este estudio debido a su precisión y simplicidad. Las muestras de queso en

general poseen una composición variable que depende de la composición de la leche, del coagulante utilizado, de la metodología de elaboración, de la estación del año, etc. Por lo tanto, no se justifica utilizar una metodología con mayor exactitud que por otro lado, resultaría de mayor costo.

Anexo C

***MODELO MATEMÁTICO PARA LA
CONGELACIÓN POR INMERSIÓN DE
QUESO MOZZARELLA***

Los modelos matemáticos ayudan a entender mejor el fenómeno asociado con el enfriamiento y la congelación por inmersión (ICF) y así controlar u optimizar las variables del proceso. La formulación matemática puede representar el complejo fenómeno de transferencia de calor y materia con cambio de fase, en donde las propiedades de los alimentos dependen fuertemente de la temperatura y de la composición. Zorrilla y Rubiolo (2005 a y b) desarrollaron un modelo matemático basado en las ecuaciones de transporte para un medio poroso para representar procesos de ICF en geometrías multidimensionales.

El objetivo en este caso fue usar el modelo matemático descrito en Zorrilla y Rubiolo (2005 a y b) para predecir la temperatura y la concentración de NaCl en queso Mozzarella durante el proceso de congelación por inmersión.

C.1. Materiales y métodos

Teoría. Zorrilla y Rubiolo (2005a) desarrollaron un modelo para el enfriamiento y la congelación de alimentos por inmersión en soluciones acuosas mantenidas a baja temperatura. Se supuso a los alimentos sólidos como un medio poroso con una solución ocluida. Se consideraron 3 fases, una matriz sólida y rígida, una fase líquida y la fase hielo. Las ecuaciones de transporte para un medio continuo fueron aplicadas para cada caso. El método de promediación en el volumen desarrollado por Whitaker (1977) se usó para obtener las ecuaciones para predecir la concentración de soluto y la temperatura como una función de la posición y el tiempo. El conjunto de ecuaciones resultante puede resolverse numéricamente.

Geometría unidimensional. En la Tabla C.1 se muestran las ecuaciones para describir la transferencia de calor y materia durante el enfriamiento y la congelación de alimentos considerando una geometría 1-D (Zorrilla y Rubiolo, 2005a). El dominio $0 \leq x \leq a$ representa una región 1-D donde "a" es la mitad del espesor de una placa infinita, el radio de un cilindro infinito, o el radio de una esfera.

En la ecuación de balance de calor (C.1), la entalpía es la variable dependiente primaria, mientras que la temperatura es la variable dependiente secundaria (Mannapperuma y Singh, 1989). El método entálpico se usa para resolver problemas con cambios de fase en situaciones en las cuales el material se solidifica o funde en un rango extendido de temperaturas (Ozisik, 1994). Para que esta formulación tenga sentido debe existir una relación entre la entalpía y la temperatura.

Tabla C.1. Resumen de las ecuaciones para describir la transferencia de calor y materia durante el enfriamiento y la congelación de alimentos por inmersión para una geometría 1-D.

Ecuaciones de transferencia de calor y materia ($0 < x < a$; $t > 0$)

$$\langle \rho \rangle \frac{\partial \langle h \rangle}{\partial t} = \frac{1}{x^{(\rho-1)}} \frac{\partial}{\partial x} \left(k_{eff} x^{(\rho-1)} \frac{\partial \langle T \rangle}{\partial x} \right) \quad (C.1)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} \left(\varepsilon_{\beta} \langle \rho_1 \rangle^{\beta} \right) + \left\langle \dot{m} \right\rangle = 0 \quad (C.2)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} \left(\varepsilon_{\beta} \langle \rho_2 \rangle^{\beta} \right) = \frac{1}{x^{(\rho-1)}} \frac{\partial}{\partial x} \left(D_{eff} x^{(\rho-1)} \frac{\partial \langle \rho_2 \rangle^{\beta}}{\partial x} \right) \quad (C.3)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} \left(\varepsilon_{\alpha} \langle \rho_{\alpha} \rangle^{\alpha} \right) = \left\langle \dot{m} \right\rangle \quad (C.4)$$

Condiciones de contorno ($t > 0$)

$$\frac{\partial \langle T \rangle}{\partial x} = 0 \quad x = 0 \quad (C.5)$$

$$k_{eff} \frac{\partial \langle T \rangle}{\partial x} = h_c (T_{\infty} - \langle T \rangle) \quad x = a \quad (C.6)$$

$$\frac{\partial \langle \rho_2 \rangle^{\beta}}{\partial x} = 0 \quad x = 0 \quad (C.7)$$

$$\langle \rho_2 \rangle^{\beta} = \rho_{2\infty} \quad x = a \quad (C.8)$$

Condiciones iniciales ($t = 0$; $0 \leq x \leq a$)

$$\langle T \rangle = \langle T \rangle_0 \quad (C.9)$$

$$\langle \rho_1 \rangle^{\beta} = \langle \rho_1 \rangle_0^{\beta} \quad (C.10)$$

$$\langle \rho_2 \rangle^{\beta} = \langle \rho_2 \rangle_0^{\beta} \quad (C.11)$$

$$\varepsilon_{\beta} = \varepsilon_{\beta 0} \quad (C.12)$$

$$\varepsilon_{\alpha} = \varepsilon_{\alpha 0} \quad (C.13)$$

$p=1, 2$ y 3 para sistema de coordenadas rectangulares, cilíndricas y esféricas, respectivamente.

El fenómeno de transferencia de materia (Ecs. (C.2) a (C.4)) básicamente tiene en cuenta el cambio en la concentración de soluto debido al proceso difusional desde la solución de inmersión y debido a la formación de hielo durante el proceso de congelación. Las Ecs. (C.5) y (C.7) son las condiciones de simetría en el centro del alimento sólido. La Ec. (C.6) es una condición de tipo convectivo mientras que la Ec. (C.8) es una condición de tipo de variable fija. Esta última condición es aceptable para la transferencia de materia debido a que la difusión en el alimento sólido es usualmente quien controla este tipo de procesos (Schwartzberg y Chao, 1982). Las Ecs. (C.9) a (C.13) son las condiciones iniciales, supuestas como valores conocidos para el alimento.

El sistema de ecuaciones (C.1) a (C.13) puede resolverse numéricamente con un método basado en diferencias finitas sobre un volumen de control (Mannapperuma y Singh, 1989). Al comienzo debe generarse una grilla. Una grilla logarítmica reduce convenientemente el tiempo computacional, debido a los dramáticos cambios de la concentración de soluto cerca de la superficie durante el proceso de ICF. Una variable adimensional definida como

$$\eta = \frac{10^{x/a} - 1}{10^{a/a} - 1} \quad 0 \leq \eta \leq 1 \quad (\text{C.14})$$

ayuda a generar la grilla logarítmica. El nuevo dominio se divide en N subregiones iguales, cada una de un espesor de $\Delta\eta = \frac{1}{N}$, como se ilustra en la Figura C.1a. Por lo tanto, la distancia a un punto interno de la grilla $i = 1, 2, \dots, N+1$ en el dominio $0 \leq x \leq a$ puede ser calculado por (Figura C.1b)

$$x_i = a \log_{10}(1 + 9(i-1)\Delta\eta) \quad (\text{C.15})$$

El balance de calor para un nodo i -ésimo entre niveles de tiempo n y $n+1$ conduce a

$$\langle h \rangle_i^{n+1} = \langle h \rangle_i^n + \frac{\Delta t}{\langle \rho \rangle} \left(\frac{Q_{i+1}^n - Q_i^n}{S_i} \right) \quad (\text{C.16})$$

donde

$$S_i = \frac{x_{i+\frac{1}{2}}^p - x_{i-\frac{1}{2}}^p}{p} \quad (\text{C.17})$$

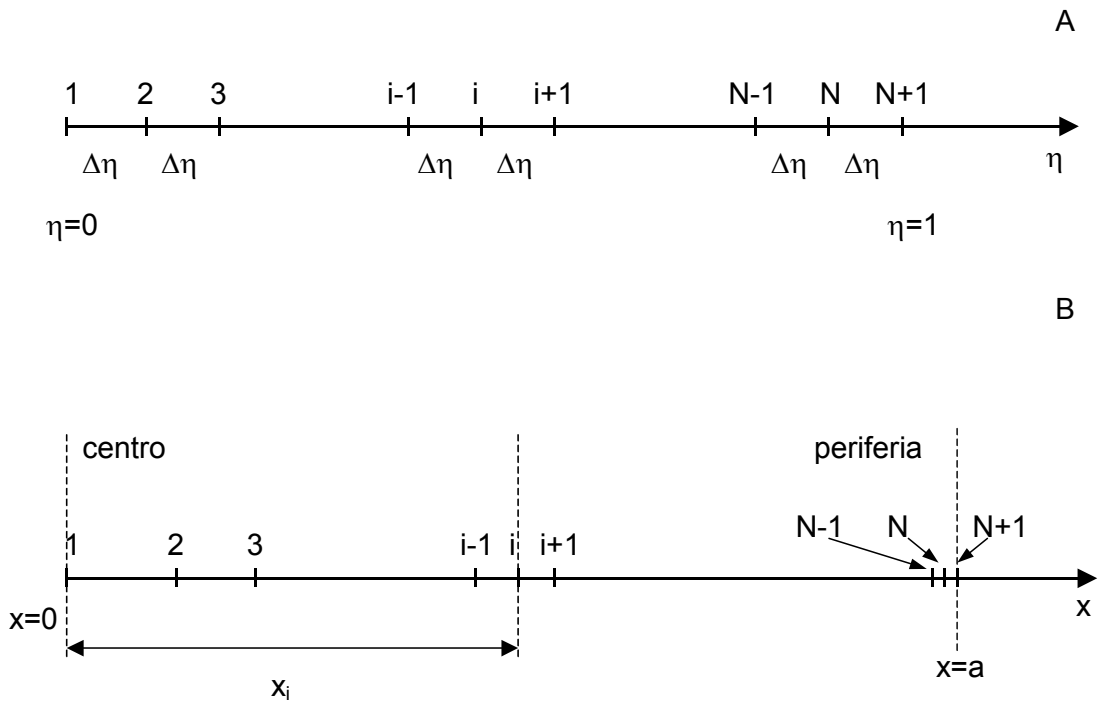


Figura C.1. Representación de los nodos para la geometría 1-D. A: grilla en el dominio η , B: grilla en el dominio x .

$$x_{i\pm\frac{1}{2}} = \frac{x_i + x_{i\pm 1}}{2} \quad (C.18)$$

$$Q_i^n = A_{i-\frac{1}{2}} k_{eff\ i-\frac{1}{2}}^n \frac{(\langle T \rangle_i^n - \langle T \rangle_{i-1}^n)}{(x_i - x_{i-1})} \quad (C.19)$$

$$k_{eff\ i-\frac{1}{2}}^n = \frac{k_{eff\ i}^n + k_{eff\ i-1}^n}{2} \quad (C.20)$$

$$A_{i-\frac{1}{2}} = x_{i-\frac{1}{2}}^{(p-1)} \quad (C.21)$$

S_i y $A_{i-\frac{1}{2}}$ son factores de volumen y de área del volumen control que excluyen términos comunes tanto para el área como para el volumen de las diferentes geometrías. El balance de materia para un nodo i entre los niveles de tiempo n y $n+1$ conduce a:

$$\left(\varepsilon_{\beta}\langle\rho_2\rangle^{\beta}\right)_i^{n+1} = \left(\varepsilon_{\beta}\langle\rho_2\rangle^{\beta}\right)_i^n + \Delta t \left(\frac{F_{i+1}^n - F_i^n}{S_i}\right) \quad (C.22)$$

donde

$$F_i^n = A_{i-\frac{1}{2}} D_{\text{eff } i-\frac{1}{2}}^n \frac{\left[\left(\langle\rho_2\rangle^{\beta}\right)_i^n - \left(\langle\rho_2\rangle^{\beta}\right)_{i-1}^n\right]}{(x_i - x_{i-1})} \quad (C.23)$$

$$D_{\text{eff } i-\frac{1}{2}}^n = \frac{D_{\text{eff } i}^n + D_{\text{eff } i-1}^n}{2} \quad (C.24)$$

Q y F cambian de acuerdo a los nodos vecinos y a las condiciones de contorno. Las Ecs. (C.16) y (C.22) para los nodos 1 y N+1 pueden ser usadas considerando

$$x_{\frac{1}{2}} = 0 \quad (C.25)$$

$$x_{N+\frac{3}{2}} = a \quad (C.26)$$

$$Q_1^n = 0 \quad (C.27)$$

$$Q_{N+2}^n = a^{(p-1)} h_c \left(T_{\infty} - \langle T \rangle_{N+1}^n\right) \quad (C.28)$$

$$F_1^n = 0 \quad (C.29)$$

$$F_{N+2}^n = F_{N+1}^n \quad (C.30)$$

La descripción matemática es completada con la estimación de las propiedades térmicas, de la relación termodinámica entre la temperatura y la fracción de soluto en presencia de hielo y del coeficiente de difusión efectivo (Zorrilla y Rubiolo, 2005a):

$$\langle h \rangle_i^n = \left(\langle T \rangle_i^n - T_{\text{ref}}\right) \left[C_{\text{pf}} + \frac{e_1 \Delta H_0 (T_0 - T_{fi}^n)}{(T_0 - T_{\text{ref}})(T_0 - \langle T \rangle_i^n)} \right] \quad \text{para } \langle T \rangle_i^n \leq T_{fi}^n \quad (C.31)$$

$$C_{peff_i}^n = C_{pf} + \frac{e_1 \Delta H_0 (T_0 - T_{fi}^n)}{(T_0 - \langle T \rangle_i^n)^2} \quad \text{para } \langle T \rangle_i^n \leq T_{fi}^n \quad (C.32)$$

$$k_{eff_i}^n = k_f + (k_u - k_f) \frac{(T_0 - T_{fi}^n)}{(T_0 - \langle T \rangle_i^n)} \quad \text{para } \langle T \rangle_i^n \leq T_{fi}^n \quad (C.33)$$

$$\langle h \rangle_i^n = (T_{fi}^n - T_{ref}) \left[C_{pf} + \frac{y_1 \Delta H_0}{(T_0 - T_{ref})} \right] + C_{p0} (\langle T \rangle_i^n - T_{fi}^n) \quad \text{para } \langle T \rangle_i^n > T_{fi}^n \quad (C.34)$$

$$C_{peff_i}^n = C_{pu} \quad \text{para } \langle T \rangle_i^n > T_{fi}^n \quad (C.35)$$

$$k_{eff_i}^n = k_u \quad \text{para } \langle T \rangle_i^n > T_{fi}^n \quad (C.36)$$

Para $\langle T \rangle_i^{n+1} \leq T_{fi}^{n+1}$, la relación termodinámica fue estimada por

$$\langle T \rangle_i^{n+1} = T_{f0} - \left[b \frac{(\langle \rho_2 \rangle^\beta)_i^{n+1}}{\langle \rho_\beta \rangle^\beta} + c \left(\frac{(\langle \rho_2 \rangle^\beta)_i^{n+1}}{\langle \rho_\beta \rangle^\beta} \right)^2 + d \left(\frac{(\langle \rho_2 \rangle^\beta)_i^{n+1}}{\langle \rho_\beta \rangle^\beta} \right)^3 \right] \quad (C.37)$$

El coeficiente de difusión efectivo fue estimado por

$$D_{eff_i}^n = \frac{D \varepsilon_{\beta i}^n}{\tau} \quad (C.38)$$

La Ec. (C.37) puede ser usada para calcular T_{fi}^n considerando la fracción de volumen inicial

$$T_{fi}^n = T_{f0} - \left[b \frac{(\langle \rho_2 \rangle^\beta \varepsilon_\beta)_i^n}{\langle \rho_\beta \rangle^\beta \varepsilon_{\beta 0}} + c \left(\frac{(\langle \rho_2 \rangle^\beta \varepsilon_\beta)_i^n}{\langle \rho_\beta \rangle^\beta \varepsilon_{\beta 0}} \right)^2 + d \left(\frac{(\langle \rho_2 \rangle^\beta \varepsilon_\beta)_i^n}{\langle \rho_\beta \rangle^\beta \varepsilon_{\beta 0}} \right)^3 \right] \quad (C.39)$$

El esquema de diferencias finitas dado por las Ecs. (C.16) y (C.22) corresponden a un método explícito y requiere un análisis de criterios de estabilidad (Mannapperuma y Singh, 1988). Los criterios de estabilidad en el centro ($i = 1$) y en la superficie ($i=N+1$) son:

$$\frac{1}{\Delta t} \geq \frac{2\rho k_{eff}^n}{x_{i+1}^2 C_{peff}^n \langle \rho \rangle} \quad i=1 \quad (C.40)$$

$$\frac{1}{\Delta t} \geq \frac{2\rho D_{eff}^n}{x_{i+1}^2 \varepsilon_{\beta i}^n} \quad i=1 \quad (C.41)$$

$$\frac{1}{\Delta t} \geq \frac{\rho \left(x_i^{(p-1)} h_c + \frac{x_{i-\frac{1}{2}}^{(p-1)} k_{eff}^n}{(x_i - x_{i-1})} \right)}{\left(x_i^p - x_{i-\frac{1}{2}}^p \right) C_{peff}^n \langle \rho \rangle} \quad i=N+1 \quad (C.42)$$

$$\frac{1}{\Delta t} \geq \frac{\rho \left(\frac{x_{i+\frac{1}{2}}^{(p-1)} D_{eff}^n}{(x_{i+1} - x_i)} + \frac{x_{i-\frac{1}{2}}^{(p-1)} D_{eff}^n}{(x_i - x_{i-1})} \right)}{\left(x_{i+\frac{1}{2}}^p - x_{i-\frac{1}{2}}^p \right) \varepsilon_{\beta i}^n} \quad i=N \quad (C.43)$$

El esquema de cálculo consiste de seleccionar el mayor incremento de tiempo Δt que satisface los criterios de estabilidad (Ecs. C.40 a C.43), computando T_{fi}^n (Ec. C.39), las propiedades térmicas y másicas (Ecs. C.31 a C.38), $\langle h \rangle_i^{n+1}$ (Ec. C.16) y $\left(\langle \rho_2 \rangle^\beta \varepsilon_\beta \right)_i^{n+1}$ (Ec. C.22), y calculando $\langle T \rangle_i^{n+1}$ de la relación entre la temperatura y la entalpía. T_{fi}^{n+1} es calculada a través de la Ec. (C.39) para $\left(\langle \rho_2 \rangle^\beta \varepsilon_\beta \right)_i^{n+1}$. Si $\langle T \rangle_i^{n+1} \leq T_{fi}^{n+1}$ entonces la (C.37) se usa para calcular $\left(\langle \rho_2 \rangle^\beta \varepsilon_\beta \right)_i^{n+1}$. Entonces, $\varepsilon_{\beta i}^{n+1}$ se calcula a partir de $\left(\langle \rho_2 \rangle^\beta \varepsilon_\beta \right)_i^{n+1}$, sino

$\varepsilon_{\beta_i}^{n+1} = \varepsilon_{\beta 0}$. Finalmente, las propiedades térmicas y de material son actualizadas y el procedimiento se repite.

El esquema de cálculo descrito puede extenderse fácilmente para las geometrías 2-D y 3-D (Zorrilla y Rubiolo, 2005b).

C.2. Resultados y discusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Anexo A, se seleccionó como temperatura de la solución de inmersión $T_{\infty} = -15$ °C para el proceso de congelación por inmersión, ya que esta temperatura permite que el alimento se congele rápidamente pero a la vez permite el ingreso de soluto.

Se realizaron simulaciones trabajando con cilindros de queso de 1 cm de radio, 3 cm de altura, $h_c = 200$ W m⁻² °C⁻¹ (Lema *et al.*, 2001) y considerando los datos mostrados en la Tabla C.2. y las condiciones experimentales: $\rho_{2\infty} = 230$ g L⁻¹, $T_{\infty} = -15$ °C, $\langle T \rangle_0 = 15$ °C, para comparar los resultados con los valores experimentales de temperatura central obtenidos en el Anexo B. En la relación termodinámica entre la temperatura de congelación y la concentración de soluto se consideró la influencia de los solutos disueltos en la fase acuosa del queso de acuerdo a lo mostrado en el Anexo B usando $T_{f0} = -2.1$ °C. Como puede observarse en la Figura C.2. existe una buena coincidencia entre los valores teóricos y los experimentales en la predicción de la temperatura central. Las predicciones se realizaron considerando un modelo 2-D.

Por otra parte, se realizaron simulaciones trabajando con placas de queso de 2.5 cm de espesor y considerando los datos mostrados en la Tabla C.2. y la condición experimental: $\rho_{2\infty} = 230$ g L⁻¹. Como puede observarse en la Figura C.3. existe una buena coincidencia entre los valores teóricos y los experimentales en la predicción de la temperatura central. Las predicciones se realizaron considerando un modelo 1-D.

Tabla C.2. Datos usados para la simulación.

Parámetro	Valor	Fuente
Propiedades físicas		
$\langle \rho_\alpha \rangle^\alpha = \langle \rho_\beta \rangle^\beta = \langle \rho_\sigma \rangle^\sigma = \langle \rho \rangle$	1000 kg m ⁻³	(a)
D / τ	3×10^{-10} m ² s ⁻¹	(a)
C_{Pu}	2956 J kg ⁻¹ °C ⁻¹	(b)
C_{Pf}	2077 J kg ⁻¹ °C ⁻¹	(b)
k_u	0.4 W m ⁻¹ °C ⁻¹	(b)
k_f	1.3 W m ⁻¹ °C ⁻¹	(b)
h_c	160 W m ⁻² °C ⁻¹	(a)
Condiciones Iniciales		
$\langle \rho_2 \rangle_0^\beta$	1 g L ⁻¹	(a)
$\varepsilon_{\alpha 0}$	0	(a)
$\varepsilon_{\beta 0}$	0.5059	(a)
$\langle T \rangle_0$	11.2 °C	(c)
Datos de la solución de inmersión		
$\rho_{2\infty}$	270 g L ⁻¹	(c)
T_∞	-15 °C	(c)

(a) Supuestos para este estudio.

(b) Propiedades basadas en la composición del alimento: contenido de grasa: 17% p/p, contenido de agua: 50.59% p/p, contenido de sólidos no grasos 32.41% p/p (Cleland y Valentas, 1997).

(c) Condiciones experimentales.

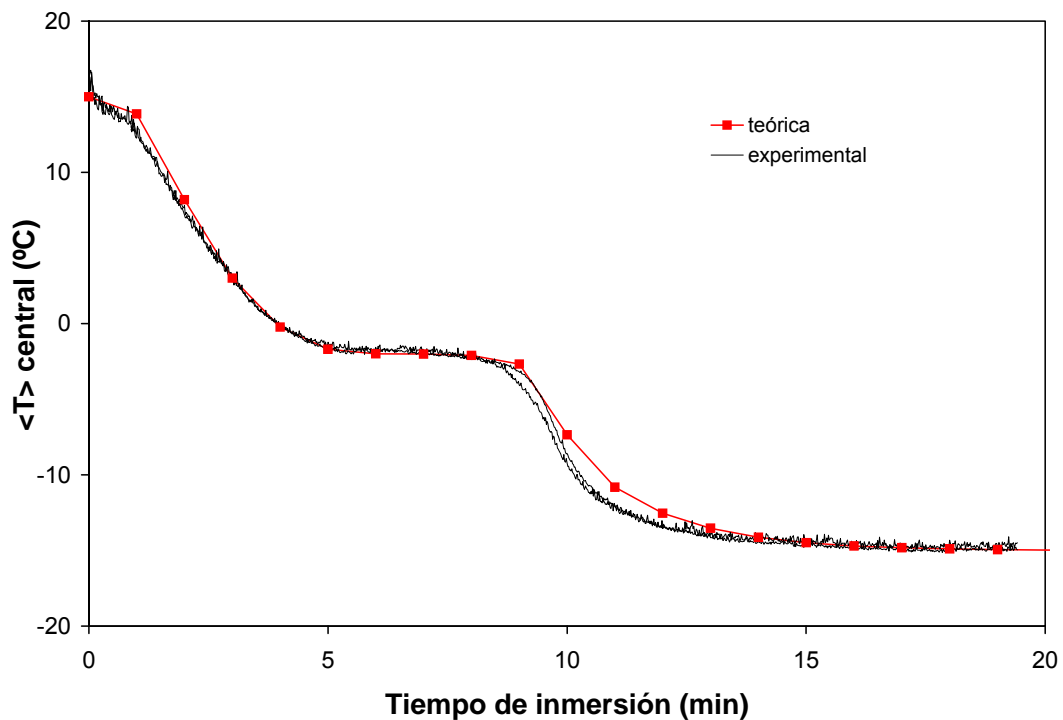


Figura C.2. Valores de temperatura central teórica y experimental para cilindros de queso Mozzarella.

En este caso, la concentración de NaCl promedio teórica alcanzada a los 70 min de inmersión fue de 0.88%. Para aumentar el ingreso de soluto se puede reducir el espesor de la placa y aumentar la concentración de la solución de inmersión. Por lo tanto, se realizaron simulaciones considerando un espesor de placa de 2 cm y $\rho_{2\infty} = 270 \text{ g L}^{-1}$ como se observa en la Figura C.4. Para el caso de salado de las muestras en la forma tradicional, se consideraron las condiciones experimentales: $\rho_{2\infty} = 270 \text{ g L}^{-1}$, $T_{\infty} = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Además se consideró un $D/\tau = 4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, lo cual tiene en cuenta el aumento del coeficiente de difusión efectivo por efecto de la temperatura (Zorrilla y Rubiolo, 1994).

En la Figura C.4. se marcó la concentración promedio objetivo de aproximadamente 2%. Para alcanzar esta concentración durante la congelación por inmersión, se observa que el tiempo de inmersión requerido es de aproximadamente 180 – 190 min. Similarmente, en el caso del salado por inmersión se obtiene un tiempo de inmersión de aproximadamente 80 – 90 min.

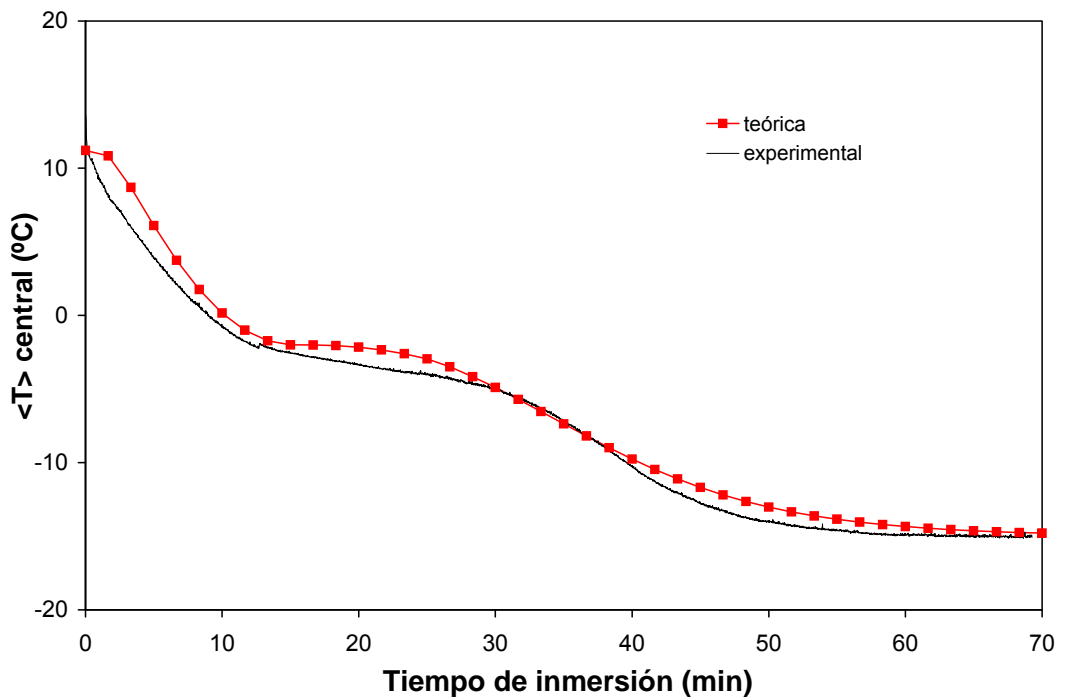


Figura C.3. Valores de temperatura central teórica y experimental para placas de queso Mozzarella.

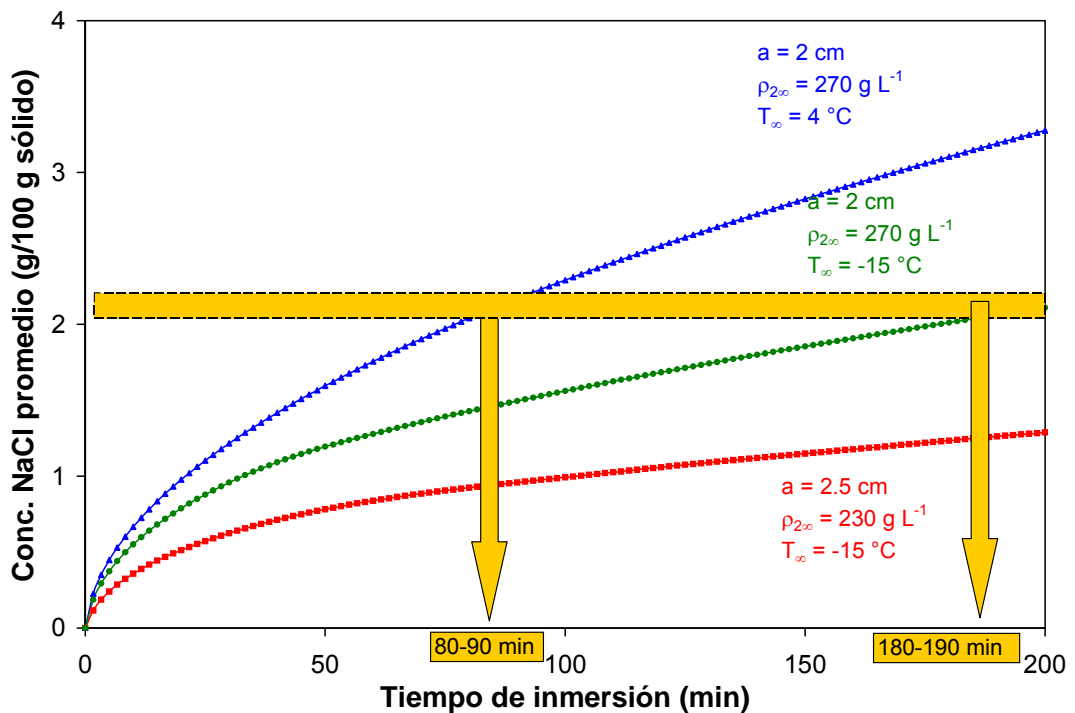


Figura C.4. Valores de concentraciones de NaCl promedios teóricos usados para la selección de los tiempos de inmersión del diseño experimental principal.

C.3. Conclusión

Se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo, para el proceso de congelación por inmersión: $\rho_{2\infty} = 270 \text{ g L}^{-1}$, $T_{\infty} = -15 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 180 \text{ min}$ y para el salado por inmersión: $\rho_{2\infty} = 270 \text{ g L}^{-1}$, $T_{\infty} = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 90 \text{ min}$.

Nomenclatura

a	dimensión característica (m)
A	variable definida en la Ec. (C.21)
b	coeficiente de las Ecs. (C.37) y (C.39)
c	coeficiente de las Ecs. (C.37) y (C.39)
C_{Peff}	calor específico efectivo ($\text{J kg}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$)
C_{Pf}	calor específico del alimento completamente congelado ($\text{J kg}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$)
C_{Pu}	calor específico del alimento descongelado ($\text{J kg}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$)
d	coeficiente de las Ecs. (C.37) y (C.39)
D	coeficiente de difusión ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)
D_{eff}	coeficiente de difusión efectivo para el soluto ($\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$)
e_1	fracción másica inicial total del agua congelable
F	variable definida en las Ecs. (C.23), (C.48), (C.49), y (C.67) a (C.69)
h	entalpía por unidad de masa (J kg^{-1})
h_c	coeficiente de transferencia de calor ($\text{W m}^{-2} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$)
ΔH_0	calor latente de fusión del hielo (kJ kg^{-1})
k_{eff}	conductividad térmica efectiva ($\text{W m}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$)
k_f	conductividad térmica del alimento completamente congelado ($\text{W m}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$)
k_u	conductividad térmica del alimento descongelado ($\text{W m}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$)
$\left\langle \frac{\dot{m}}{m} \right\rangle$	velocidad másica de solidificación del agua ($\text{kg m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)
N	número de segmentos en la grilla 1, 2 y 3 para sistema de coordenadas rectangulares, cilíndricas y esféricas, respectivamente.
p	
Q	variable definida en las Ecs. (C.19), (C.45), (C.46), y (C.63) a (C.65)
S	variable definida en la Ec. (C.17)

t	tiempo (s)
T	temperatura (°C)
T_0	punto inicial de congelación del agua pura (°C)
T_f	punto inicial de congelación (°C)
T_{ref}	temperatura de referencia (°C)
x	distancia a lo largo del eje x (m)

Símbolos griegos

ε	fracción de volumen
η	variable definida en la Ec. (C.14)
ρ	densidad (kg m ⁻³)
τ	tortuosidad
$\langle \Psi \rangle$	promedio espacial de la función Ψ
$\langle \psi_\delta \rangle$	promedio en la fase de la función ψ_δ
$\langle \psi_\delta \rangle^\delta$	promedio intrínseco en la fase de la función ψ_δ

Subíndices/superíndices

0	a tiempo inicial
1	agua
2	soluto
i	en el nodo i -ésimo
N	en el nivel de tiempo n -ésimo
x	en la dirección x
α	fase hielo
β	fase líquida
∞	en el seno de la solución de inmersión

Anexo D

**VALORES DE LAS
DETERMINACIONES INDIVIDUALES
CORRESPONDIENTES A LOS
ANÁLISIS REALIZADOS EN EL
DISEÑO EXPERIMENTAL PRINCIPAL**

Tabla D.1. Contenido de humedad (g/ 100 g de queso).

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
C	1	47.73	46.72	45.57
		47.73	46.69	45.59
	7	47.78	47.42	47.33
		47.79	47.42	47.34
	14	48.61	47.45	48.86
		48.64	47.45	48.83
	20	47.70	47.66	47.62
		47.66	47.65	47.60
	27	48.08	47.84	47.90
		48.07	47.83	47.90
	34	48.55	47.59	47.92
		48.55	47.57	47.92
	41	47.55	47.76	47.93
		47.56	47.74	47.91
F	1	49.19	49.28	48.79
		49.14	49.28	48.80
	7	49.83	48.79	48.94
		49.80	48.78	48.93
	14	49.85	49.77	49.99
		49.85	49.77	50.00
	20	49.45	49.11	49.23
		49.45	49.10	49.24
	27	49.42	48.99	49.06
		49.40	48.98	49.06
	34	48.97	49.17	48.80
		48.98	49.16	48.82
	41	49.69	49.45	49.12
		49.76	49.47	49.12
A	1	49.18	48.86	48.01
		49.16	48.85	47.99
	7	49.41	49.10	49.42
		49.39	49.06	49.13
	14	49.86	50.13	49.50
		49.87	50.12	49.51
	20	49.64	49.65	49.37
		49.66	49.64	49.38
	27	48.98	49.07	49.16
		48.98	49.06	49.17
	34	49.47	50.11	49.46
		49.47	50.11	49.46
	41	49.34	49.57	48.90
		49.35	49.58	48.92

Tabla D.2. Contenido de cloruro en la humedad (g/ 100 g de humedad).

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
C	1	2.353	2.384	2.452
		2.349	2.386	2.489
		2.376	2.385	2.462
		2.367	2.383	2.458
		2.355	2.384	2.474
	7	2.478	2.349	2.345
		2.482	2.342	2.338
		2.478	2.331	2.353
		2.487	2.349	2.344
		2.479	2.341	2.363
	14	2.456	2.396	2.416
		2.463	2.408	2.414
		2.469	2.393	2.416
		2.472	2.395	2.416
		2.513	2.382	2.408
	20	2.414	-	2.399
		2.420	2.434	2.423
		2.410	2.455	2.397
		2.399	2.448	2.458
		2.412	2.432	2.400
27	2.505	2.444	2.391	
	2.511	2.450	2.385	
	2.504	2.453	2.392	
	2.519	2.441	2.402	
	2.505	2.440	2.400	
34	2.430	2.480	2.515	
	2.416	2.486	2.526	
	2.432	2.484	2.522	
	2.427	2.486	2.525	
	2.453	2.475	2.514	
41	2.465	2.506	2.445	
	2.470	2.457	2.438	
	2.466	2.472	2.452	
	2.465	2.468	2.438	
	2.466	2.479	2.439	

Tabla D.2. continuación. Contenido de cloruro en la humedad (g/ 100 g de humedad).

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
F	1	2.517	2.734	2.594
		2.542	2.714	2.605
		2.532	2.722	2.624
		2.543	2.693	2.612
		2.539	2.703	2.611
	7	2.741	2.670	2.537
		2.741	2.672	2.537
		2.733	2.663	2.537
		2.745	2.676	2.542
		2.740	2.677	2.563
	14	2.698	-	2.719
		2.715	2.889	2.721
		2.713	2.900	2.711
		2.709	2.905	2.715
		2.729	2.900	2.718
	20	2.599	2.532	2.688
		2.589	2.527	2.686
		2.604	2.534	2.679
		2.599	2.523	2.679
		2.593	2.520	2.680
27	2.632	2.698	2.483	
	2.635	2.702	2.485	
	2.614	2.733	2.498	
	2.638	2.700	2.506	
	2.631	2.728	2.501	
34	2.759	2.724	2.624	
	2.764	2.723	2.624	
	2.759	2.709	2.629	
	2.754	2.710	2.629	
	2.766	2.717	2.625	
41	2.641	2.681	2.745	
	2.620	2.688	2.739	
	2.620	2.689	2.743	
	2.625	2.690	2.740	
	2.625	2.694	2.750	

Tabla D.2. continuación. Contenido de cloruro en la humedad (g/ 100 g de humedad).

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
A	1	2.655	2.761	2.683
		2.662	2.749	2.677
		2.693	2.779	2.693
		2.684	2.776	-
		2.647	2.777	2.737
	7	2.749	2.888	2.891
		2.750	2.891	2.882
		2.750	2.903	2.884
		2.755	2.911	2.886
		2.742	2.907	2.879
	14	2.818	2.817	2.839
		2.819	2.824	2.856
		2.798	2.810	2.856
		2.839	2.811	2.846
		2.817	2.814	2.845
	20	2.629	2.721	2.769
		2.628	2.715	2.777
		2.617	2.729	2.765
		2.623	2.720	2.752
		2.617	2.721	2.761
27	2.659	2.867	2.887	
	2.653	2.870	2.892	
	2.660	2.871	2.889	
	2.658	2.886	2.889	
	2.664	2.875	2.888	
34	2.904	2.574	2.709	
	2.901	2.580	2.705	
	2.903	2.574	2.708	
	2.898	2.580	2.708	
	2.922	2.579	2.631	
41	2.681	2.799	2.713	
	2.673	2.816	2.710	
	2.678	2.806	2.717	
	2.687	2.810	2.716	
	2.691	2.820	2.719	

Tabla D.3. Valor de pH.

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
C	1	5.25	5.24	5.18
		5.29	5.27	5.20
	7	5.25	5.18	5.27
		5.30	5.23	5.30
	14	5.28	5.38	5.29
		5.29	5.35	5.26
	20	5.36	5.34	5.28
		5.39	5.34	5.29
	27	5.29	5.29	5.27
		5.29	5.29	5.27
	34	5.28	5.27	5.27
		5.27	5.27	5.27
	41	5.26	5.25	5.30
		5.27	5.26	5.29
F	1	5.32	5.30	5.31
		5.35	5.35	5.34
	7	5.22	5.30	5.22
		5.24	5.38	5.25
	14	5.25	5.26	5.25
		5.26	5.25	5.25
	20	5.28	5.31	5.27
		5.29	5.31	5.28
	27	5.31	5.31	5.29
		5.35	5.30	5.31
	34	5.27	5.28	5.27
		5.27	5.27	5.26
	41	5.27	5.28	5.28
		5.28	5.26	5.28
A	1	5.23	5.20	5.18
		5.21	5.21	5.20
	7	5.22	5.22	5.20
		5.24	5.23	5.23
	14	5.25	5.25	5.27
		5.26	5.26	5.25
	20	5.30	5.32	5.29
		5.31	5.31	5.30
	27	5.35	5.33	5.33
		5.33	5.33	5.31
	34	5.39	5.38	5.35
		5.39	5.37	5.34
	41	5.40	5.36	5.38
		5.38	5.38	5.36

Tabla D.4. Contenido de proteína total (g/ 100 g de queso).

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
C	1	23.442	23.800	23.387
		24.236	23.946	24.825
	7	23.533	23.784	24.147
		21.636	23.168	23.451
	14	23.010	23.061	22.262
		22.710	23.841	22.422
	20	21.745	23.377	22.555
		22.899	23.154	23.264
	27	21.980	23.408	23.080
		22.434	23.562	20.608
	34	21.896	23.532	22.445
		22.822	23.785	22.684
	41	23.503	23.327	23.165
		23.544	23.257	23.314
F	1	-	22.390	22.569
		25.178	22.490	23.126
	7	21.664	21.931	23.352
		21.040	22.630	22.685
	14	21.899	21.965	21.644
		21.580	22.325	22.050
	20	21.174	22.899	22.434
		22.423	22.218	22.464
	27	22.282	20.716	21.777
		20.537	20.761	22.338
	34	22.330	20.994	22.560
		21.490	22.471	22.537
	41	21.615	22.765	22.262
		21.837	21.899	21.162
A	1	21.948	22.214	23.420
		22.051	22.420	22.639
	7	22.314	22.936	21.129
		22.656	22.545	22.790
	14	21.410	22.000	20.402
		22.502	20.180	21.066
	20	22.601	22.290	21.702
		22.250	22.573	22.751
	27	22.220	21.398	22.020
		22.537	21.991	22.024
	34	21.444	22.262	22.191
		21.802	22.471	22.051
	41	21.813	22.439	21.243
		21.905	22.016	22.893

Tabla D.5. Contenido de proteína soluble (g/ 100 g de queso).

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
C	1	0.688	0.616	0.535
		0.654	0.643	0.582
	7	0.810	0.908	0.837
		0.810	0.944	0.741
	14	1.079	1.086	1.000
		1.112	1.114	1.006
	20	1.181	1.244	-
		1.156	1.264	1.047
	27	1.357	1.319	1.433
		1.306	1.406	1.285
	34	1.567	1.362	1.409
		1.573	1.500	1.444
	41	1.677	1.747	1.631
		1.745	1.706	1.626
F	1	0.663	0.618	-
		0.657	0.660	-
	7	0.866	0.823	0.913
		0.903	0.771	0.903
	14	1.055	1.045	1.057
		1.112	1.031	1.104
	20	-	1.229	1.098
		1.239	1.196	1.029
	27	1.310	-	1.444
		1.324	1.400	1.334
	34	1.533	-	1.456
		1.488	1.409	1.437
	41	1.610	1.429	1.472
		1.522	1.514	1.514
A	1	0.737	0.698	0.628
		0.714	0.667	0.646
	7	0.925	0.938	0.910
		0.855	0.971	0.927
	14	1.077	0.994	1.075
		1.141	1.076	0.941
	20	1.375	1.215	1.444
		1.331	-	1.380
	27	1.359	1.446	1.511
		1.361	1.457	1.454
	34	1.473	1.653	1.600
		1.511	1.639	1.617
	41	1.668	1.688	1.803
		1.569	1.656	1.756

Tabla D.6. Valores de γ -caseína (IOD/ g queso).

Tiempo (días)	Muestras control Repetición			Muestras congeladas Repetición			Muestras almacenadas congeladas Repetición		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	4.5	0.0	2.4	2.8	2.6	2.7	3.1	0.0	0.0
	3.8	1.7	2.4	1.6	1.7	1.3	3.2	2.6	0.0
	3.4	1.9	1.4	0.0	1.7	1.1	1.5	1.2	0.0
7	2.1	1.6	1.1	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	1.1	1.4	2.2	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2.7	1.5	1.1	2.2	0.0	0.0	2.1	0.0	0.0
14	2.3	0.0	0.9	1.2	1.8	0.0	0.0	0.8	2.6
	3.1	0.0	0.0	1.6	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	1.6	1.9	0.0	1.4	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	1.4	0.0	1.0	2.6	0.0	1.4	2.1	0.0
	0.0	1.4	0.0	2.1	0.0	0.0	1.8	1.0	0.0
	0.0	1.0	0.0	1.8	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0
27	1.7	2.4	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	2.9	0.0
	0.0	1.3	0.0	2.4	1.9	0.0	0.0	2.1	0.0
	2.3	1.1	0.0	1.0	1.1	0.0	1.6	2.2	0.0
34	1.6	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	3.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	3.2	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
41	3.8	0.0	3.9	1.6	1.6	2.9	0.0	3.7	0.0
	3.4	0.0	4.0	1.0	1.9	2.4	3.4	3.3	0.0
	2.5	0.8	3.2	1.3	1.7	2.0	3.2	2.7	0.0

Tabla D.7. Valores de β -caseína (IOD/ g queso).

Tiempo (días)	Muestras control Repetición			Muestras congeladas Repetición			Muestras almacenadas congeladas Repetición		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	84.0	71.9	84.9	78.4	71.7	85.5	96.6	85.6	107.9
	62.7	79.6	78.9	92.2	80.9	92.0	96.5	89.0	92.0
	49.0	72.4	95.5	76.2	67.1	80.0	108.8	84.4	107.4
7	82.9	95.8	87.4	86.8	79.3	73.6	106.7	93.4	75.4
	85.6	89.5	82.2	91.4	69.9	67.8	97.5	96.4	74.6
	82.3	81.5	85.8	76.3	78.0	65.4	93.6	90.9	68.2
14	82.6	87.9	73.9	78.6	87.0	92.2	86.4	77.6	96.2
	63.1	82.7	86.6	70.3	73.4	99.0	93.0	77.5	85.7
	56.5	84.0	73.2	74.5	86.5	88.4	89.7	79.6	82.1
20	83.1	91.3	67.6	81.8	81.6	84.2	103.2	95.2	73.9
	77.7	85.0	72.9	84.7	88.4	88.7	92.2	52.9	74.3
	75.2	88.3	69.5	76.5	82.9	88.5	75.5	76.6	79.1
27	79.9	83.1	64.4	85.8	77.3	78.6	93.2	73.5	82.8
	80.6	69.6	81.9	88.2	82.6	79.1	92.4	76.8	79.9
	76.4	73.0	69.5	76.4	79.8	72.5	99.5	76.5	71.2
34	73.5	99.0	75.1	82.8	88.5	70.8	91.4	78.9	75.5
	76.4	89.8	78.3	92.1	86.1	79.7	87.4	85.8	84.2
	62.7	103.3	79.1	83.9	83.6	87.1	90.4	92.2	88.0
41	76.1	75.3	68.6	70.4	88.9	64.7	72.9	68.9	91.0
	79.6	80.9	68.0	73.4	70.3	60.8	74.9	70.2	86.7
	79.6	79.6	75.5	67.0	75.1	65.3	74.3	70.0	83.9

Tabla D.8. Valores de α_{S1} -caseína (IOD/ g queso).

Tiempo (días)	Muestras control Repetición			Muestras congeladas Repetición			Muestras almacenadas congeladas Repetición		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	84.8	98.1	72.7	81.8	79.9	76.1	79.1	75.5	112.2
	81.8	89.3	93.6	84.2	86.2	73.6	89.0	77.1	99.2
	85.5	96.4	92.4	80.8	79.4	74.9	88.3	74.6	106.5
7	88.3	82.9	81.7	79.4	80.8	83.7	99.2	82.6	77.6
	85.6	81.3	83.2	82.3	83.0	85.8	87.5	84.7	85.2
	83.2	71.3	80.7	70.6	80.0	83.8	93.9	86.6	82.9
14	60.8	84.3	65.6	62.8	67.3	70.5	62.0	56.1	73.4
	57.8	70.8	63.6	61.9	68.2	68.6	66.8	56.3	73.0
	64.2	77.0	68.1	54.5	65.7	72.3	67.6	55.2	78.1
20	70.4	73.3	65.2	57.4	64.0	67.5	70.0	56.1	51.3
	67.1	73.1	65.6	60.6	66.1	72.6	62.7	52.4	55.9
	69.8	65.6	62.7	58.5	63.6	67.7	67.1	50.0	49.9
27	66.5	55.0	68.4	48.7	54.6	65.8	57.6	49.9	59.8
	66.3	52.0	73.4	55.9	56.2	69.4	52.5	45.7	58.5
	69.7	50.2	63.1	50.6	55.2	64.2	58.7	47.9	52.2
34	53.9	55.7	54.4	49.5	61.0	56.0	62.0	52.7	50.3
	46.5	62.9	58.1	52.0	62.8	55.3	51.6	51.6	57.0
	55.8	59.5	55.6	50.2	57.6	55.1	58.7	49.4	55.3
41	36.0	45.4	37.5	33.7	46.0	47.1	36.4	29.7	48.4
	31.1	47.6	39.1	35.4	46.9	46.3	37.7	32.3	38.3
	34.9	44.9	35.9	33.3	43.8	40.0	35.3	34.7	37.9

Tabla D.9. Valores de α_{S1} -I-caseína (IOD/ g queso).

Tiempo (días)	Muestras control Repetición			Muestras congeladas Repetición			Muestras almacenadas congeladas Repetición		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	11.1	8.4	7.2	5.8	7.8	6.2	2.9	5.0	4.5
	8.7	6.8	10.8	5.1	7.8	6.6	5.4	4.3	3.8
	9.1	8.0	9.6	7.8	6.2	7.7	4.8	5.0	5.0
7	23.0	19.7	17.1	14.2	11.7	12.1	19.6	16.5	12.9
	19.0	19.9	17.4	16.5	11.0	16.4	16.1	18.1	14.7
	16.3	16.8	16.6	13.0	11.7	12.9	19.6	16.5	15.8
14	25.9	29.4	12.6	21.2	22.5	21.4	27.3	21.6	30.0
	25.1	15.7	18.7	21.0	21.5	23.7	27.4	22.0	27.0
	27.8	27.0	18.7	17.3	23.6	16.9	27.3	20.9	31.8
20	21.2	27.9	25.6	28.1	29.8	23.9	39.8	35.3	23.5
	28.9	34.9	27.8	29.6	29.0	26.2	35.3	29.9	30.5
	27.2	21.0	24.4	27.4	28.2	18.1	38.6	33.9	21.3
27	33.6	33.6	36.4	28.4	34.6	37.1	40.8	32.1	36.6
	31.9	30.9	39.5	33.9	32.0	32.9	34.7	33.5	36.0
	38.1	26.6	29.9	33.4	33.7	33.4	40.1	33.7	32.4
34	43.0	30.1	34.6	31.4	35.8	29.7	41.4	38.3	36.0
	39.3	44.0	35.5	32.3	38.8	33.7	38.3	42.7	41.6
	44.2	36.0	34.2	34.4	33.5	34.2	46.4	37.8	41.4
41	43.9	46.4	38.6	31.7	42.1	35.1	42.6	33.7	41.4
	42.7	41.6	41.6	34.7	40.7	36.5	46.5	36.4	40.3
	38.8	43.2	40.8	32.1	39.1	35.6	46.9	38.8	44.5

Tabla D.10. Valores de la fracción F1 (IOD/ g queso).

Tiempo (días)	Muestras control Repetición			Muestras congeladas Repetición			Muestras almacenadas congeladas Repetición		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	6.6	4.2	4.8	3.1	4.6	3.9	1.4	0.0	4.5
	4.9	3.2	4.2	2.3	3.8	4.7	1.5	0.0	3.4
	3.9	2.2	4.2	5.5	3.9	1.4	5.3	0.0	3.8
7	2.7	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
27	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
34	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
41	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Tabla D.11. Valores de área cromatográfica (10^6 /g queso) de los picos obtenidos por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (días)	Pico 1			Pico 2			Pico 3		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	0.0	0.0	0.0	7.7	6.8	8.0	0.0	0.0	0.0
	7	0.0	0.0	0.0	10.0	8.7	9.7	0.0	0.0	0.0
	14	0.0	0.0	0.0	9.9	8.7	9.5	0.0	0.0	0.0
	20	0.0	0.0	0.0	10.5	9.1	9.4	0.0	0.0	0.0
	27	0.0	0.0	0.0	10.1	9.2	10.3	0.0	5.8	9.0
	34	17.2	0.0	0.0	10.7	8.6	10.3	6.9	15.8	0.0
	41	16.4	0.0	0.0	10.1	7.6	10.7	8.7	12.1	10.5
F	1	0.0	0.0	0.0	8.7	7.4	8.8	0.0	0.0	0.0
	7	0.0	0.0	0.0	8.9	8.8	0.0	0.0	0.0	0.0
	14	0.0	0.0	0.0	8.6	9.5	8.2	0.0	0.0	0.0
	20	0.0	0.0	0.0	8.8	9.0	8.7	0.0	0.0	0.0
	27	0.0	0.0	0.0	8.6	10.3	48.9	0.0	0.0	0.0
	34	14.1	0.0	0.0	9.1	9.3	51.5	11.3	0.0	0.0
	41	0.0	0.0	0.0	8.9	78.4	48.0	0.0	0.0	0.0
A	1	0.0	0.0	0.0	7.9	9.0	7.8	0.0	0.0	0.0
	7	0.0	0.0	0.0	8.1	9.8	8.3	2.5	0.0	0.0
	14	0.0	0.0	0.0	7.8	10.1	7.7	28.6	0.0	0.0
	20	0.0	0.0	0.0	8.8	10.0	8.6	24.9	6.5	10.5
	27	0.0	16.1	0.0	9.1	9.7	8.8	8.2	7.5	7.4
	34	12.8	32.5	0.0	9.0	35.6	8.1	12.8	10.9	8.2
	41	27.7	27.7	0.0	8.3	9.9	38.6	11.2	13.7	11.0

Tabla D.11. continuación. Valores de área cromatográfica (10^6 /g queso) de los picos obtenidos por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (días)	Pico 4			Pico 5			Pico 6		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	9.7	8.8	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	14.7	13.4	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	14	14.8	13.7	13.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	16.4	15.1	14.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	27	16.6	24.4	22.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	34	18.0	16.1	15.0	0.0	0.0	0.0	6.6	0.0	0.0
	41	18.9	16.5	15.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
F	1	13.8	11.2	11.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	13.9	12.6	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	14	13.9	12.7	13.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	13.8	13.1	13.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	27	15.5	16.0	15.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	34	15.7	13.5	16.7	0.0	0.0	0.0	5.2	0.0	0.0
	41	15.0	14.2	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
A	1	11.3	12.7	12.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	18.0	14.1	13.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	14	12.7	14.0	13.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	20	13.2	17.2	28.6	0.0	0.0	0.0	3.6	10.3	7.3
	27	15.1	17.9	28.4	0.0	4.2	4.1	0.0	4.0	8.1
	34	26.5	16.3	27.2	0.0	5.0	0.0	5.1	4.2	0.0
	41	20.1	17.7	18.7	0.0	4.3	4.9	5.0	8.5	14.4

Tabla D.11. continuación. Valores de área cromatográfica (10^6 /g queso) de los picos obtenidos por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (días)	Pico 7			Pico 8			Pico 9		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	0.0	2.9	2.5	0.0	0.0	0.0	20.5	18.8	29.2
	7	7.1	6.7	5.5	3.2	0.0	0.0	29.5	36.6	27.8
	14	8.7	8.2	6.8	5.4	3.5	2.5	27.4	28.1	34.0
	20	11.9	11.3	9.0	8.6	4.5	4.6	29.3	27.5	43.6
	27	13.2	13.0	11.2	14.7	6.7	8.3	71.1	33.7	15.8
	34	12.5	16.9	14.1	21.0	14.9	70.6	66.2	63.8	80.5
	41	22.8	18.8	17.2	31.4	21.9	146.5	57.5	67.7	72.6
F	1	3.2	2.6	2.3	0.0	0.0	0.0	22.3	20.7	30.9
	7	5.6	5.2	3.5	0.0	0.0	0.0	25.1	21.8	12.4
	14	7.5	7.9	7.2	3.6	2.7	0.0	28.5	28.9	24.0
	20	10.9	11.2	8.3	6.9	4.3	3.9	26.5	26.5	40.5
	27	12.2	14.0	12.6	18.4	6.9	7.6	83.6	27.5	27.1
	34	11.7	12.7	13.1	18.2	6.3	10.5	69.8	27.5	38.6
	41	17.5	15.7	12.2	39.7	18.5	11.5	80.9	39.6	39.1
A	1	3.1	2.4	2.5	0.0	0.0	0.0	38.4	19.5	18.7
	7	6.1	5.8	5.7	0.0	0.0	0.0	35.0	19.0	19.5
	14	8.4	8.0	8.6	6.6	4.3	5.2	33.2	18.7	5.8
	20	13.5	9.8	8.7	16.0	10.0	13.6	54.4	85.3	32.9
	27	12.3	14.8	12.2	28.9	15.4	114.5	75.4	94.4	72.5
	34	12.0	15.2	12.3	28.9	134.0	100.4	79.9	66.1	58.8
	41	21.1	12.1	9.8	22.5	41.0	57.5	77.1	21.2	25.9

Tabla D.11. continuación. Valores de área cromatográfica (10^6 /g queso) de los picos obtenidos por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (días)	Pico 10			Pico 11			Pico 12		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	4.6	0.0
	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.7	10.8	8.3
	20	0.0	3.6	0.0	0.0	0.0	0.0	17.9	17.3	3.0
	27	0.0	12.9	38.5	20.3	18.7	0.0	35.1	35.4	23.0
	34	29.0	29.7	18.0	27.8	36.1	0.0	56.0	58.4	39.6
	41	39.0	40.2	31.2	37.6	45.8	31.4	90.2	117.3	96.6
F	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.4	8.0	8.7	0.0
	20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.6	14.9	12.2
	27	0.0	0.0	36.7	22.7	0.0	3.8	36.3	23.8	22.9
	34	25.3	0.0	36.9	25.8	0.0	3.9	50.8	24.5	27.9
	41	34.0	96.7	34.5	38.0	27.2	3.6	101.2	66.2	32.8
A	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	0.0	5.0
	14	0.0	0.0	31.6	0.0	0.0	0.0	13.7	13.6	14.7
	20	45.0	114.8	79.0	15.5	0.0	65.0	29.1	31.2	37.6
	27	62.1	32.4	67.0	0.0	26.4	0.0	80.0	68.5	57.6
	34	32.5	29.4	21.8	36.7	33.6	23.6	95.9	96.5	57.6
	41	47.8	30.5	52.5	43.3	0.8	0.0	140.1	59.7	55.4

Tabla D.11. continuación. Valores de área cromatográfica (10^6 /g queso) de los picos obtenidos por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (días)	Pico 13			Pico 14			Pico 15		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	0.0	0.0	0.0	95.2	5.4	12.9	3.1	0.0	10.2
	7	5.5	0.0	0.0	126.4	43.9	20.9	5.3	0.0	3.1
	14	7.1	8.4	9.0	114.5	78.1	56.7	14.5	25.2	3.6
	20	11.5	10.7	14.2	153.0	110.2	97.3	18.3	7.9	9.9
	27	11.7	13.7	38.3	185.0	146.4	115.9	20.3	25.2	41.6
	34	16.3	17.4	15.1	232.6	207.2	164.6	107.8	36.9	38.1
	41	24.7	23.1	40.4	338.9	304.1	273.3	92.0	50.2	180.7
F	1	0.0	0.0	0.0	12.9	8.3	12.6	0.0	0.0	0.0
	7	0.0	0.0	0.0	56.5	20.8	15.7	0.0	0.0	0.0
	14	5.8	0.0	6.4	78.3	58.0	58.8	13.9	15.4	2.7
	20	9.2	10.4	10.6	120.8	100.7	81.0	15.7	7.5	5.4
	27	11.6	12.8	11.4	157.1	149.4	146.2	31.9	21.6	18.3
	34	13.4	15.4	13.1	185.5	164.5	161.6	82.4	27.9	29.0
	41	17.6	16.1	13.2	237.8	238.5	178.9	32.1	26.1	39.0
A	1	0.0	0.0	0.0	17.3	23.8	8.7	0.0	0.0	17.1
	7	0.0	0.0	6.0	54.9	45.2	40.3	9.5	11.8	9.8
	14	13.5	9.4	11.8	115.1	105.7	103.3	8.0	13.9	14.2
	20	10.7	11.4	21.8	146.7	163.4	158.6	25.1	22.6	41.9
	27	15.1	18.1	17.2	198.6	238.7	194.8	54.5	81.6	191.3
	34	12.2	30.5	11.8	204.6	232.0	197.5	52.8	27.5	25.4
	41	44.3	21.9	25.5	252.3	296.7	291.9	63.5	286.6	424.3

Tabla D.11. continuación. Valores de área cromatográfica (10^6 /g queso) de los picos obtenidos por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (días)	Pico 16			Pico 17			Pico 18		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	0.0	0.0	0.0	5.0	4.7	7.9	368.9	341.4	393.7
	7	5.1	0.0	0.0	11.4	10.9	8.7	951.6	991.8	866.4
	14	6.4	6.3	15.3	15.1	24.3	16.3	1353.2	1530.8	1397.6
	20	14.4	10.7	32.6	29.4	29.8	18.2	1837.2	1631.0	1816.2
	27	19.1	18.6	53.7	27.0	34.0	21.9	2157.7	2023.5	2037.6
	34	30.0	46.9	58.4	99.0	78.8	26.9	2719.6	2621.9	2422.7
	41	132.8	96.9	94.0	125.7	104.6	88.3	2886.9	2973.1	3098.3
F	1	0.0	0.0	0.0	5.6	5.7	5.9	372.0	345.5	339.1
	7	0.0	0.0	0.0	9.2	8.1	8.4	909.7	690.6	682.7
	14	4.9	0.0	12.3	15.5	15.6	13.4	1335.8	1390.5	1391.9
	20	10.6	19.7	0.0	28.8	36.3	20.9	1845.7	1783.8	1539.6
	27	18.5	27.4	34.2	64.2	44.5	47.7	2326.0	2392.7	2348.6
	34	26.1	23.6	38.6	75.0	39.2	34.8	2509.1	2107.8	2466.7
	41	32.9	78.5	40.3	111.3	57.6	31.5	3099.6	2810.9	2446.0
A	1	0.0	0.0	0.0	6.9	8.3	8.5	402.0	391.1	393.0
	7	0.0	7.9	10.4	26.7	12.4	14.8	1050.5	1066.0	1052.6
	14	24.3	14.7	31.6	37.4	39.9	29.7	1815.3	1840.0	1829.4
	20	86.0	78.9	24.0	116.4	42.7	15.9	2303.8	2057.8	2008.4
	27	36.3	91.9	73.8	140.2	75.9	51.6	3112.0	2859.8	2794.3
	34	50.2	51.9	40.6	78.1	65.1	47.5	2749.8	2735.8	2590.2
	41	105.5	143.0	140.8	136.2	70.1	58.1	3097.8	2859.7	2779.6

Tabla D.11. continuación. Valores de área cromatográfica (10^6 /g queso) de los picos obtenidos por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (días)	Pico 19			Pico 20			Pico 21		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	90.8	83.1	87.9	18.0	16.0	15.5	11.6	6.9	15.1
	7	138.8	134.5	138.9	19.8	20.1	21.0	16.5	15.8	21.3
	14	171.3	163.8	178.9	26.3	29.2	22.8	22.2	36.6	29.9
	20	188.5	195.6	211.1	27.0	24.0	21.6	24.1	23.1	27.4
	27	201.3	221.5	270.4	20.3	25.8	21.7	8.8	21.0	20.1
	34	248.8	232.1	233.8	41.5	29.5	20.7	25.6	24.2	18.6
	41	259.4	234.1	276.4	29.3	23.9	55.2	19.1	17.7	34.6
F	1	94.0	91.2	87.1	21.0	18.1	17.3	16.3	16.4	16.3
	7	119.6	130.9	96.8	24.5	21.0	16.8	27.0	19.2	24.7
	14	147.0	145.1	168.3	22.5	23.3	25.1	16.5	14.6	27.4
	20	175.4	181.3	192.3	27.2	19.1	23.7	19.5	12.9	21.8
	27	195.5	230.6	230.5	22.9	27.6	26.7	12.8	28.4	25.1
	34	233.4	232.4	256.0	29.5	23.3	26.8	0.0	31.9	24.0
	41	256.1	231.7	243.9	34.6	21.2	25.8	22.6	22.4	22.8
A	1	109.1	99.5	104.0	23.5	17.8	16.5	26.0	13.4	16.8
	7	135.5	143.4	148.2	31.5	20.2	20.0	39.6	24.3	20.0
	14	155.3	162.6	164.6	30.4	25.2	21.7	30.4	33.3	23.1
	20	187.4	190.2	192.1	35.2	27.1	23.3	33.3	26.9	20.9
	27	190.7	200.3	189.4	27.5	25.4	29.0	18.5	19.5	22.8
	34	191.0	227.9	215.4	43.5	47.1	25.7	35.5	43.5	24.3
	41	197.0	231.1	192.1	36.3	21.9	23.5	0.0	22.2	16.7

Tabla D.11. continuación. Valores de área cromatográfica (10^6 /g queso) de los picos obtenidos por HPLC.

Tratamiento	Tiempo (días)	Pico 22			Pico 23			Pico 24		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	1	207.2	183.6	200.8	180.0	151.3	158.4	185.9	157.0	163.5
	7	235.4	228.2	237.1	208.7	187.0	199.4	205.9	194.2	204.7
	14	238.8	238.1	243.4	220.3	190.5	202.6	218.7	199.2	207.2
	20	243.3	249.6	246.3	210.8	215.4	205.3	218.9	221.3	210.1
	27	229.9	235.9	241.8	209.5	206.3	213.6	216.9	214.4	219.2
	34	272.2	249.7	238.5	229.9	214.4	206.5	239.0	219.7	209.9
	41	242.1	227.3	251.4	215.2	200.8	203.2	222.4	205.5	207.4
F	1	242.0	230.2	215.1	204.7	190.4	200.6	205.0	198.7	196.6
	7	244.7	237.3	175.3	213.1	199.2	123.5	212.4	206.4	126.5
	14	242.9	238.5	258.4	209.9	207.5	226.0	208.1	215.3	223.5
	20	227.0	226.9	245.6	189.0	221.0	229.4	194.3	217.0	226.7
	27	240.0	279.1	253.6	207.5	250.3	209.8	204.5	249.2	213.4
	34	227.0	252.9	247.6	221.1	199.8	212.9	219.7	204.7	217.0
	41	253.1	245.0	236.7	202.7	202.5	205.5	210.3	209.1	208.3
A	1	240.7	220.0	213.0	172.2	186.7	176.7	180.3	192.7	180.2
	7	244.7	240.5	232.7	179.8	200.3	200.8	186.1	205.9	202.2
	14	240.3	252.8	223.5	189.4	217.6	198.2	195.4	213.5	200.8
	20	259.5	258.6	227.0	197.3	211.8	199.7	205.3	215.2	201.1
	27	230.6	244.1	249.8	184.1	209.7	206.3	191.4	213.5	208.7
	34	264.4	270.1	237.3	200.0	230.2	196.9	207.9	229.5	198.9
	41	254.1	247.2	228.6	194.0	224.3	190.2	202.3	217.8	191.3

Tabla D.12. Valores de G' y G'' (Pa) obtenidos del barrido de deformación a distintas temperaturas para una amplitud de deformación $\gamma_0=0.005$.

Tratamiento	Parámetro	Tiempo (días)	20°C			40°C			60°C		
			Repetición			Repetición			Repetición		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
C	G'	1	128035.1	132159.0	122673.6	32041.3	33767.2	30933.1	4634.2	5826.7	6095.2
		7	66199.1	72393.9	86626.3	12275.5	12341.6	14510.0	2092.4	1873.1	3342.5
		14	69430.6	75521.0	73935.7	8154.9	8550.5	8360.4	1492.4	1256.5	1688.2
		20	79819.0	86400.9	84486.8	7100.0	7368.9	6604.9	779.4	347.9	995.0
		27	83574.7	77924.4	89447.4	6616.7	6079.0	6245.7	989.8	1084.1	545.3
		34	65312.3	77320.1	80205.1	4380.0	5282.1	5856.8	1563.9	1191.9	384.5
		41	79070.3	83334.9	77093.5	5890.2	6681.9	4837.5	1028.7	645.0	664.8
	G''	1	36566.5	37658.6	35510.2	13354.9	13779.4	12511.1	5280.7	6208.6	6233.9
		7	19400.6	21376.5	25188.4	5939.9	6042.6	6976.3	2960.7	2626.2	4009.3
		14	20788.0	22704.1	21956.3	4295.8	4544.5	4414.8	2330.7	1916.4	2367.0
		20	23553.6	25353.4	24971.4	3966.0	4119.7	3768.1	1271.4	710.7	1815.0
		27	25211.0	22910.6	26287.0	3737.6	3558.3	3702.1	1733.9	1708.8	1096.3
		34	19641.5	22723.1	23903.3	2791.7	3217.3	3537.8	2472.4	2118.5	817.3
		41	23113.3	24055.9	22634.8	3525.0	3960.4	3047.3	1911.2	1292.5	1425.3

Tabla D.12. continuación. Valores de G' y G'' (Pa) obtenidos del barrido de deformación a distintas temperaturas para una amplitud de deformación $\gamma_0=0.005$.

Tratamiento	Parámetro	Tiempo (días)	20°C			40°C			60°C		
			Repetición			Repetición			Repetición		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
F	G'	1	129198.3	100879.7	115842.4	31379.2	56287.7	28048.5	4148.8	14101.0	5891.5
		7	70460.2	77313.5	72399.4	15916.5	19438.7	14978.2	2970.6	2686.1	3271.2
		14	71860.7	65418.3	56332.5	7533.9	8005.3	7897.9	1841.9	2030.8	1698.0
		20	68382.8	67075.1	61750.2	6395.0	7424.6	8478.3	323.4	614.4	711.2
		27	74115.1	80290.3	76762.6	6803.4	5764.4	5883.7	1281.0	1621.7	1336.4
		34	63373.0	61533.5	60165.8	4971.2	4951.2	5107.8	1134.2	1731.2	1094.7
		41	54958.9	63943.3	63093.4	3912.8	4041.8	5732.2	768.6	1164.5	767.8
	G''	1	37528.8	28616.9	33911.9	12900.0	20976.9	11361.5	4350.5	10600.0	6307.5
		7	20395.5	22800.0	21335.6	7335.5	8715.5	6985.6	2938.3	2597.9	3510.0
		14	21316.9	18900.0	16361.0	3866.1	4023.4	4073.9	2393.8	2516.2	2530.6
		20	19977.7	19855.0	18400.0	3433.6	4064.6	4454.4	519.9	1050.0	1110.0
		27	21700.0	23173.7	22239.0	3813.9	3208.3	3427.9	2061.0	2459.0	2213.8
		34	18961.0	18400.0	18177.6	2951.7	2891.7	3016.1	1847.9	2648.4	1804.7
		41	16555.0	19216.4	18861.3	2519.5	2546.1	3414.5	1420.0	2093.9	1437.6

Tabla D.12. continuación. Valores de G' y G'' (Pa) obtenidos del barrido de deformación a distintas temperaturas para una amplitud de deformación $\gamma_0=0.005$.

Tratamiento	Parámetro	Tiempo (días)	20°C			40°C			60°C		
			Repetición			Repetición			Repetición		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	G'	1	146076.3	128023.7	100924.4	48431.5	47227.7	36539.0	11717.8	8537.5	6349.3
		7	73443.2	79802.5	83174.9	17694.7	16900.0	16400.0	3368.4	3822.5	3378.7
		14	75476.1	68023.4	78553.5	10280.5	9529.2	11643.1	2592.4	2348.7	2233.0
		20	61834.8	66472.6	56311.6	5750.8	6209.5	5999.4	1641.2	1229.5	1712.6
		27	60453.9	56973.8	56094.7	6127.1	5813.5	6362.2	1787.3	1528.7	1924.4
		34	54389.5	47155.9	55943.9	5958.7	3830.0	4814.8	1630.8	1140.1	1424.1
		41	49561.0	48659.2	55834.5	4775.3	4163.3	5289.2	1629.8	1624.6	1544.6
	G''	1	43011.9	38039.0	29233.9	18215.4	17938.5	14400.0	9153.4	7237.7	6215.0
		7	20817.3	23156.9	23895.0	8134.0	7471.6	7353.9	3603.9	3999.4	3593.7
		14	21994.9	19833.9	22457.3	5066.6	4552.1	5556.8	3272.4	2966.2	2837.8
		20	18400.0	19738.9	16800.0	3020.8	3251.8	3133.9	2308.4	1893.0	2454.8
		27	17894.1	16800.0	16761.1	3423.9	3113.9	3428.3	2747.3	2236.2	2841.5
		34	15838.9	14100.0	16616.5	3381.6	2392.2	2863.5	2510.8	1913.9	2371.5
		41	14816.6	14555.1	16660.9	2877.8	2567.8	3151.8	2559.8	2511.9	2491.7

Tabla D.13. Temperatura de cruce (°C) obtenida de los barridos de temperatura.

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
C	1	60.98	59.02	59.72
	7	54.74	54.30	54.96
	14	53.42	52.88	53.98
	20	52.51	52.20	52.02
	27	52.72	51.18	51.91
	34	51.13	51.89	51.54
	41	50.90	51.06	49.92
F	1	57.42	57.43	57.49
	7	58.15	58.23	56.53
	14	55.20	57.13	54.30
	20	53.62	53.20	54.09
	27	52.53	53.03	51.53
	34	51.92	52.33	52.83
A	1	60.71	59.99	60.24
	7	58.79	58.57	58.77
	14	55.58	55.87	56.13
	20	54.23	54.21	54.25
	27	52.59	53.48	53.64
	34	52.94	51.19	51.54
	41	50.61	50.72	51.14

Tabla D.14. Energía de activación (cal/mol) obtenida de los barridos de temperatura.

Tratamiento	Tiempo (días)	Repetición		
		1	2	3
C	1	11954.6	12048.4	11991.6
	7	12543.6	13135.2	13019.3
	14	13223.4	13992.1	12795.4
	20	14385.1	15004.0	14963.4
	27	14880.0	13945.2	14275.1
	34	15442.7	14865.1	14708.1
	41	16368.8	15632.5	15839.2
F	1	12187.9	12368.1	12092.7
	7	11747.7	11979.6	12442.3
	14	14014.5	11689.3	12328.4
	20	13634.2	13481.2	12807.5
	27	13980.5	14078.7	13022.5
	34	13506.2	12857.8	14098.2
	41	13697.2	13941.4	14721.2
A	1	13000.1	12407.5	12549.8
	7	12181.9	12951.4	12367.3
	14	13667.2	12601.6	13121.9
	20	13662.4	13627.2	13525.1
	27	14026.5	13020.3	13070.6
	34	13271.1	13764.1	13639.1
	41	13559.3	13337.5	14415.0

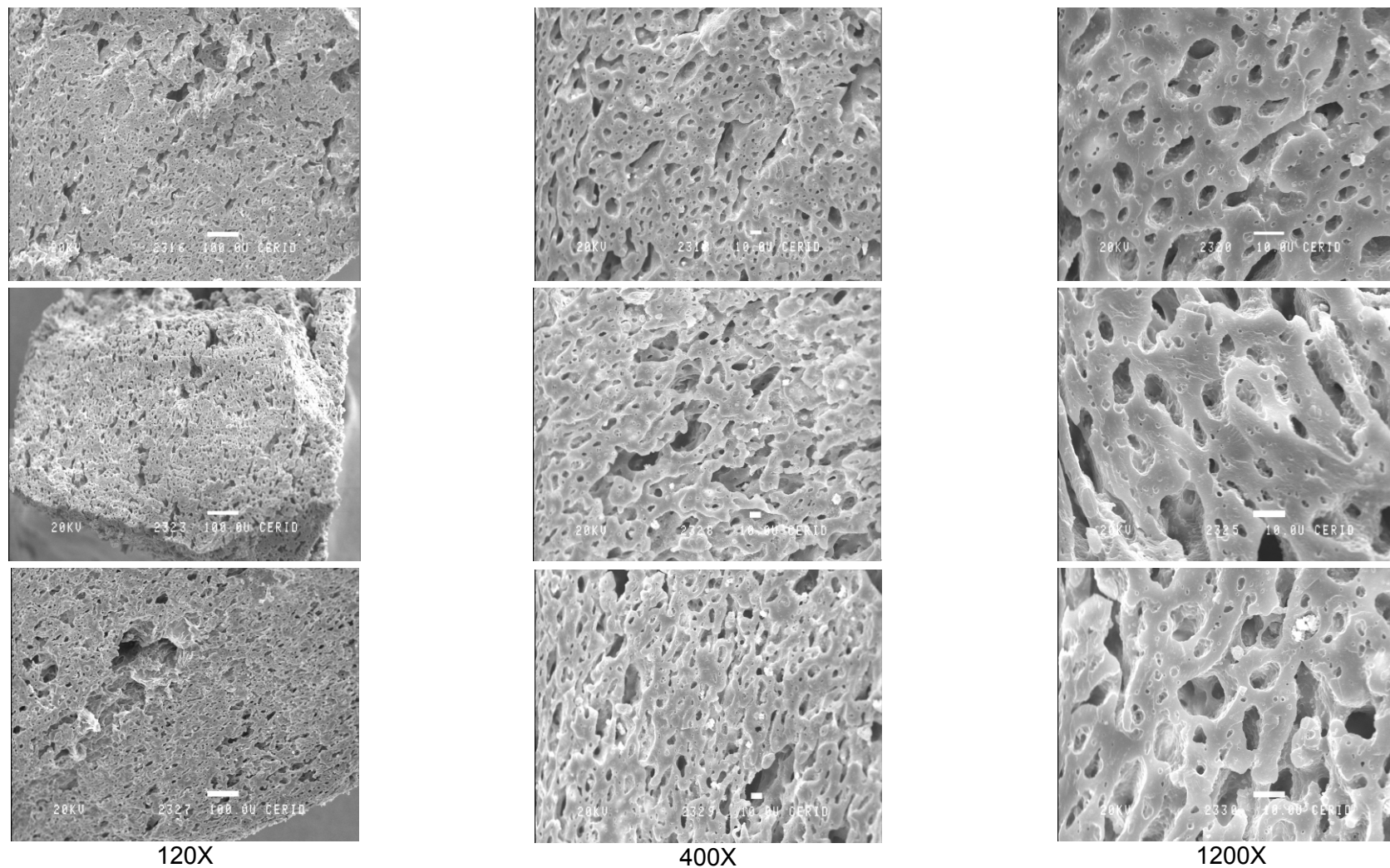


Figura D.1. Micrográficas SEM de muestras control a 1 día de maduración.

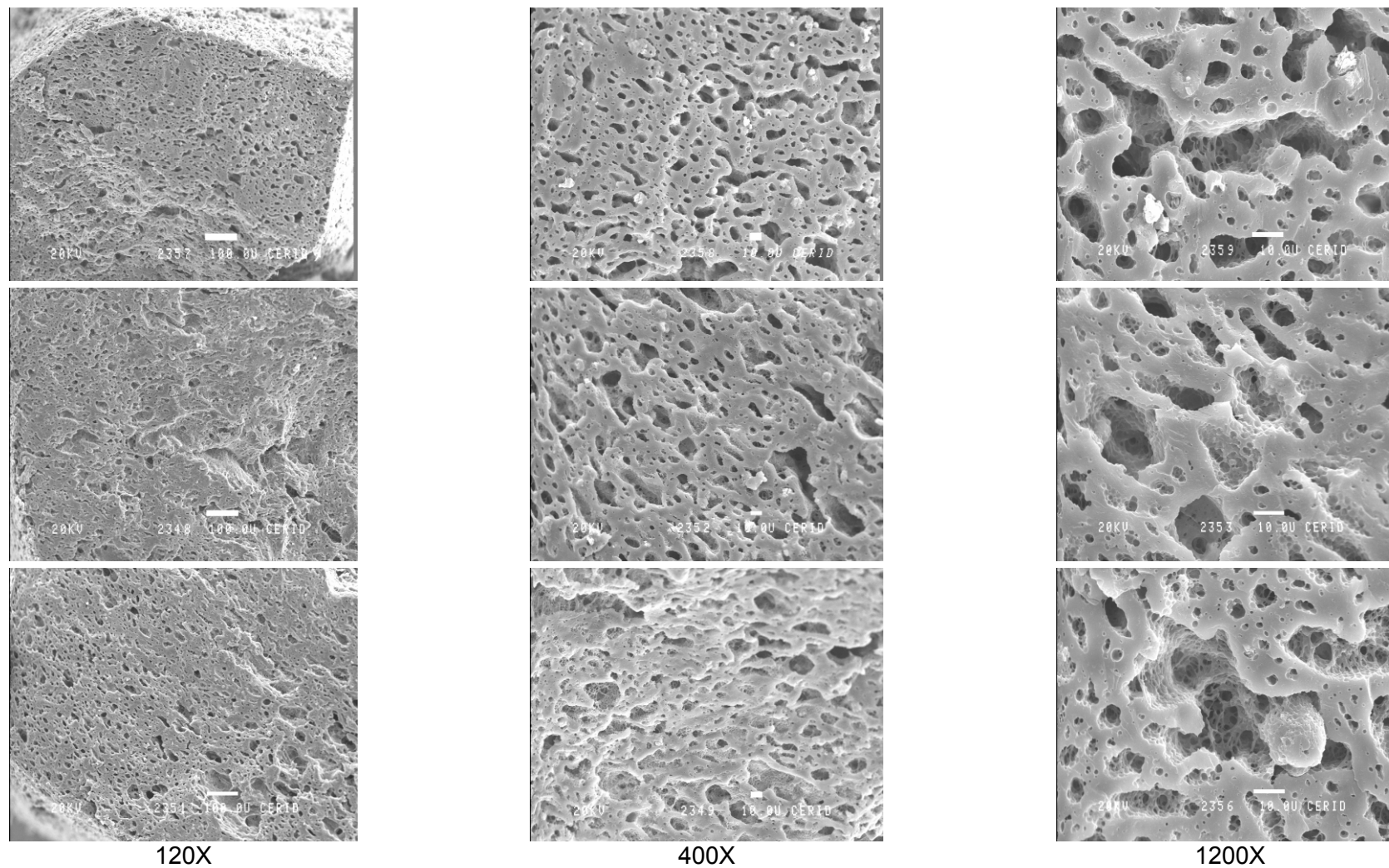


Figura D.2. Micrografías SEM de muestras control a 14 días de maduración.

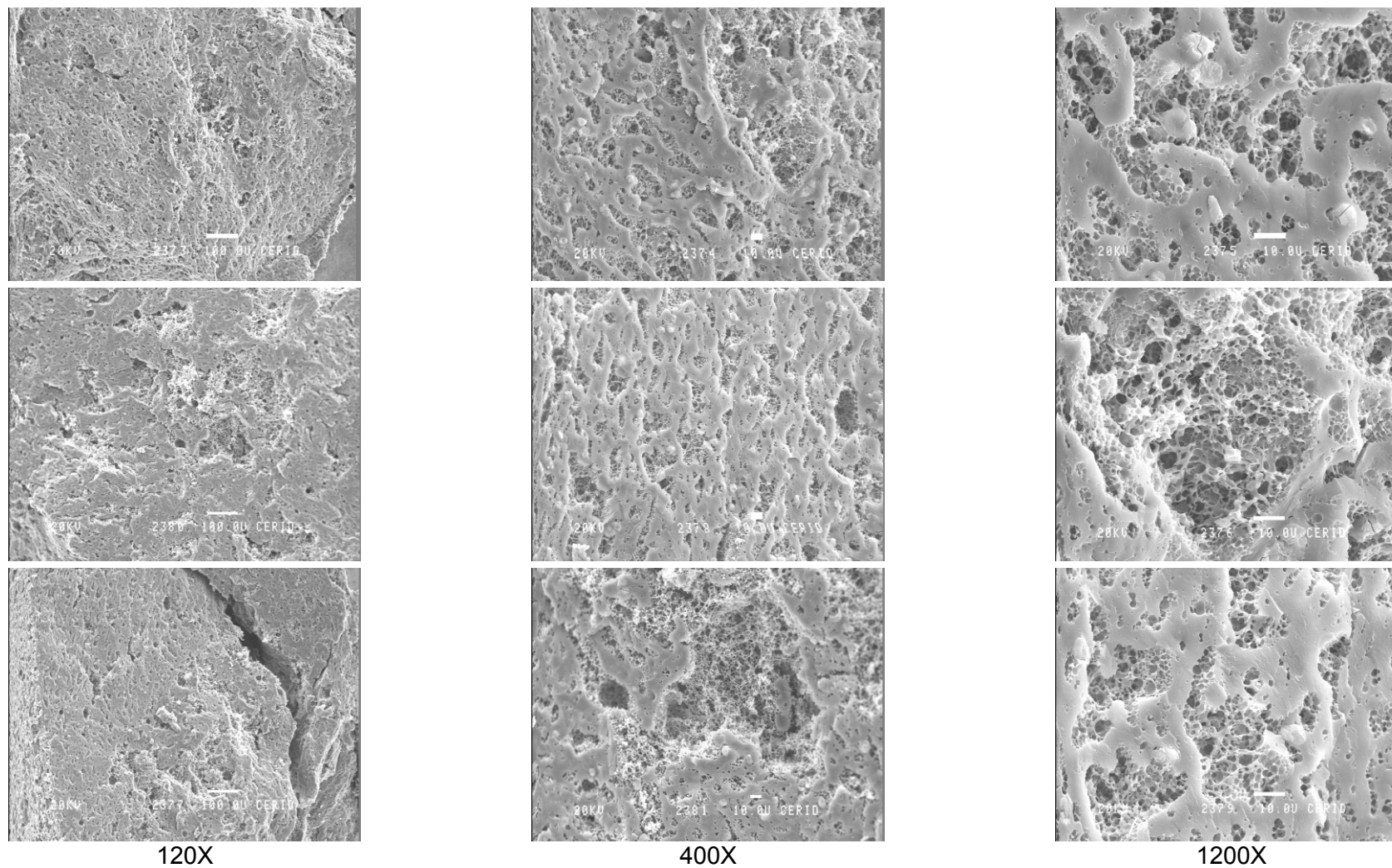


Figura D.3. Micrográficas SEM de muestras control a 41 días de maduración.

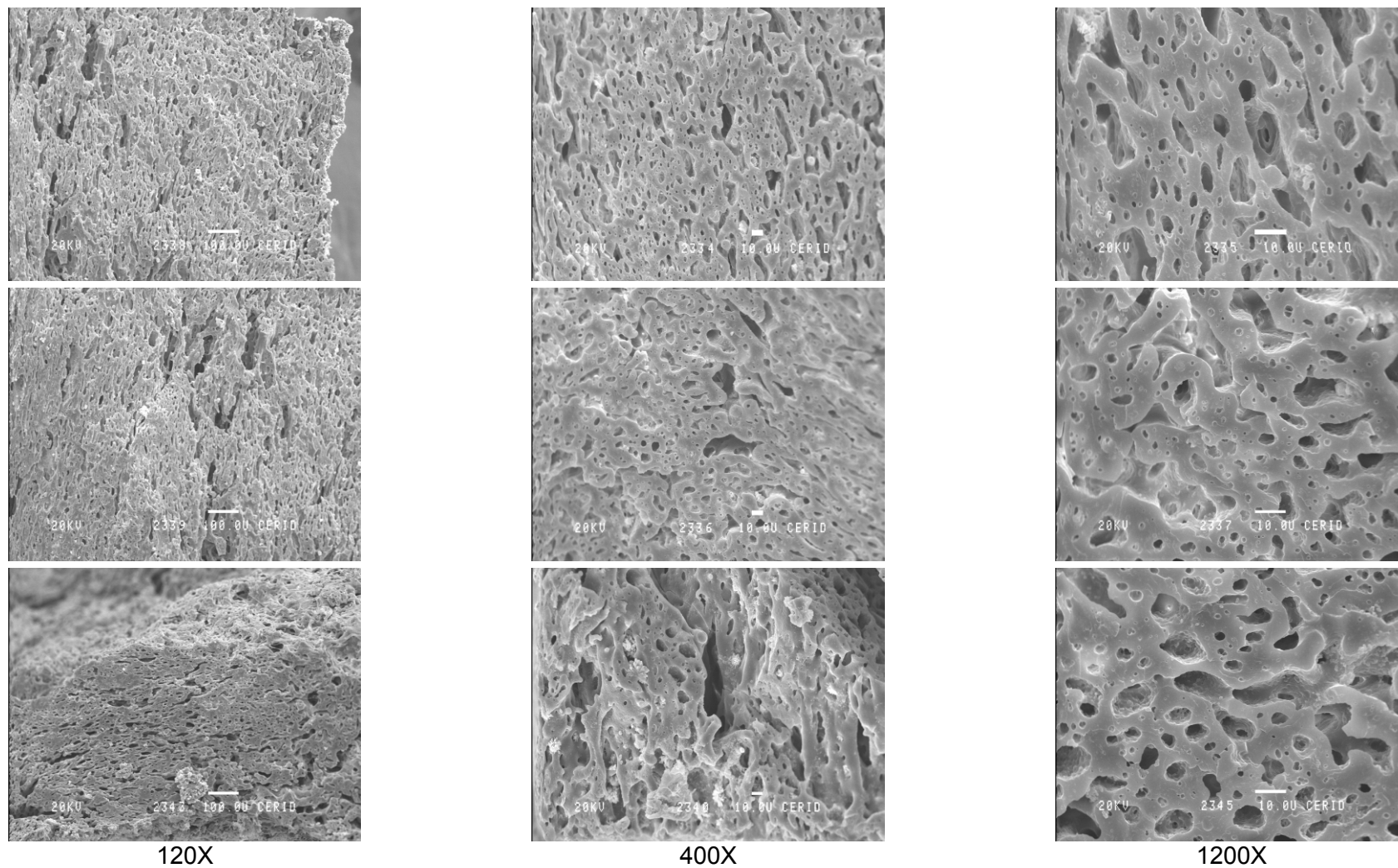


Figura D.4. Micrográficas SEM de muestras congeladas a 1 día de maduración.

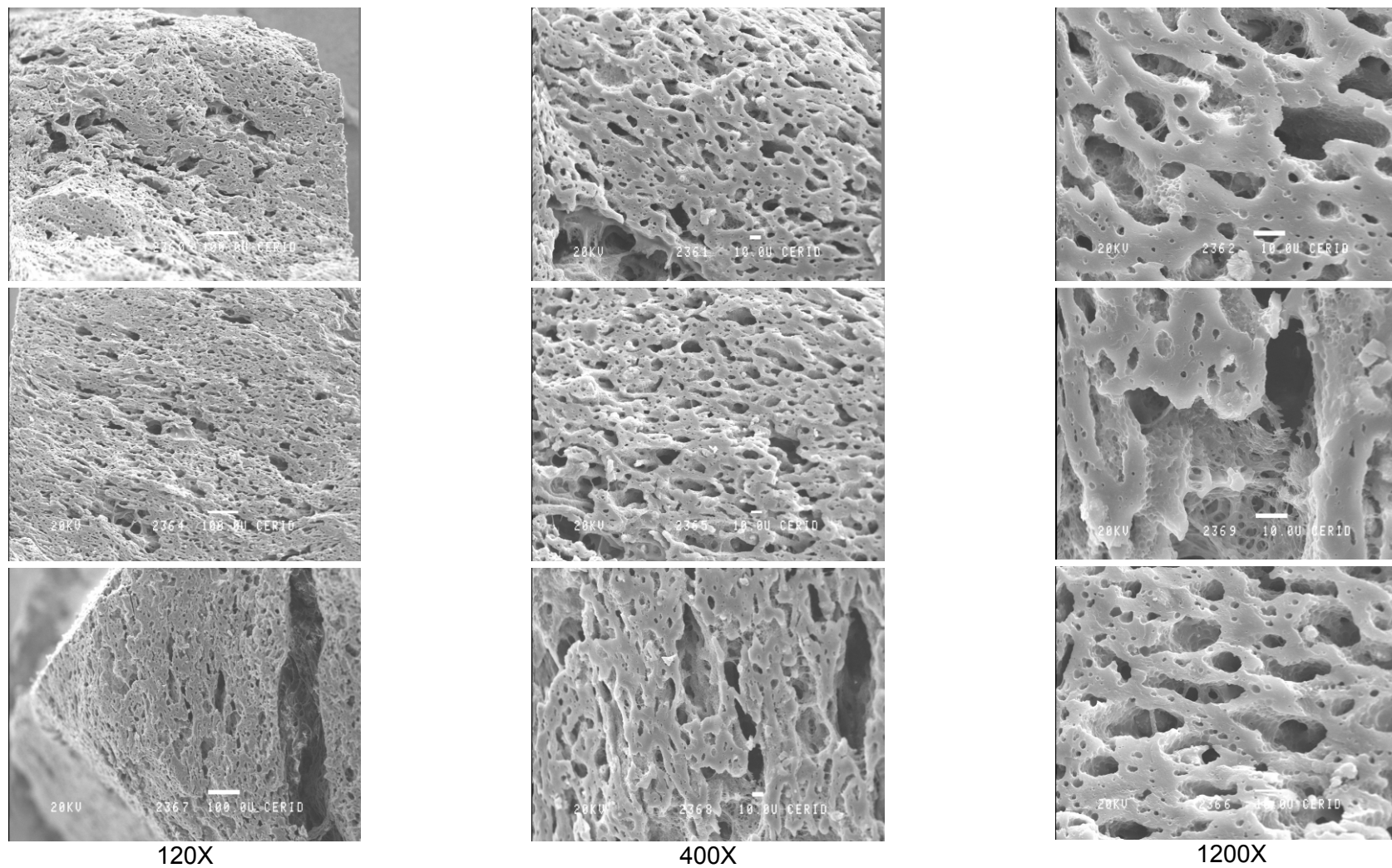


Figura D.5. Micrografías SEM de muestras congeladas a 14 días de maduración.

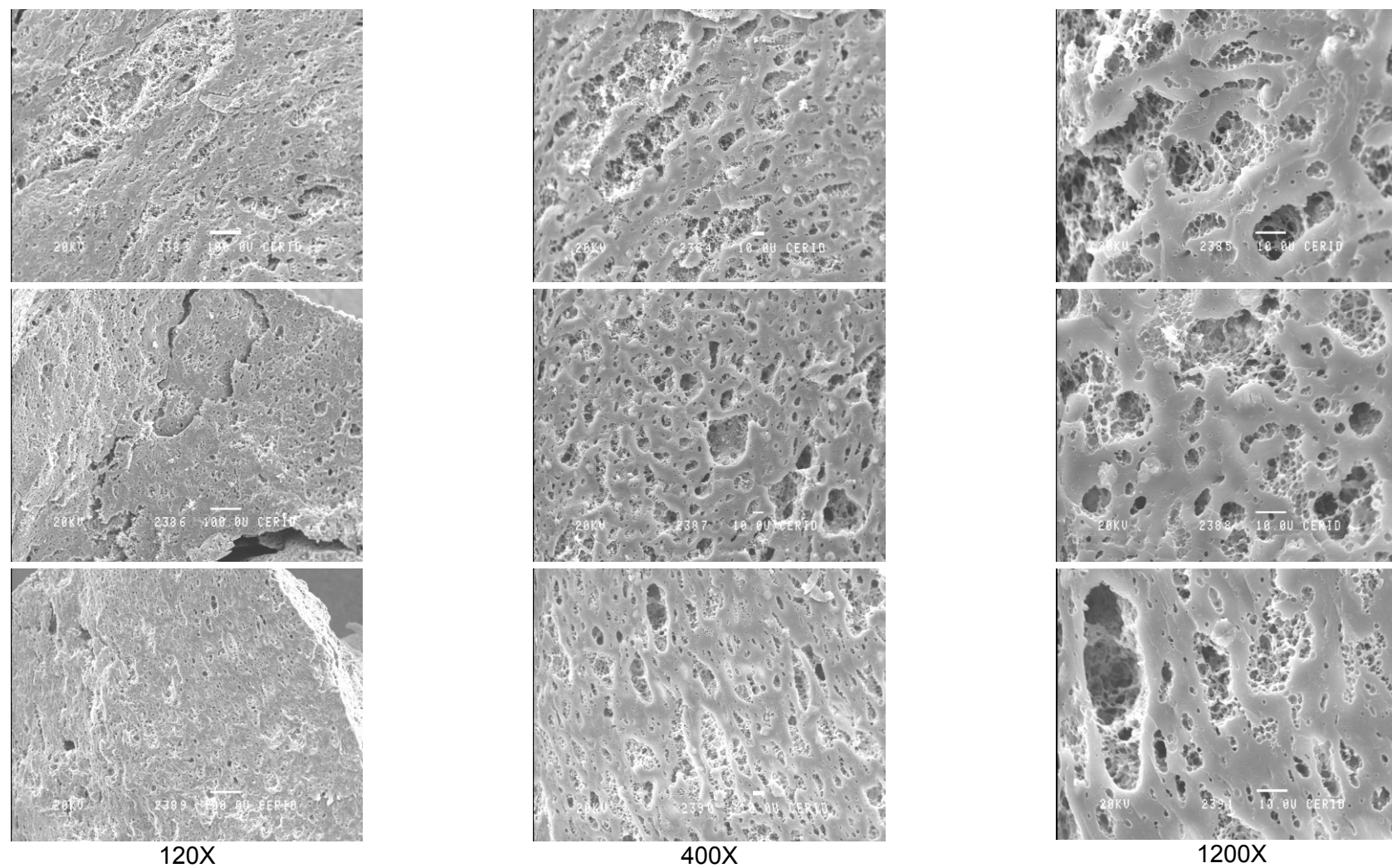


Figura D.6. Micrografías SEM de muestras congeladas a 41 días de maduración.

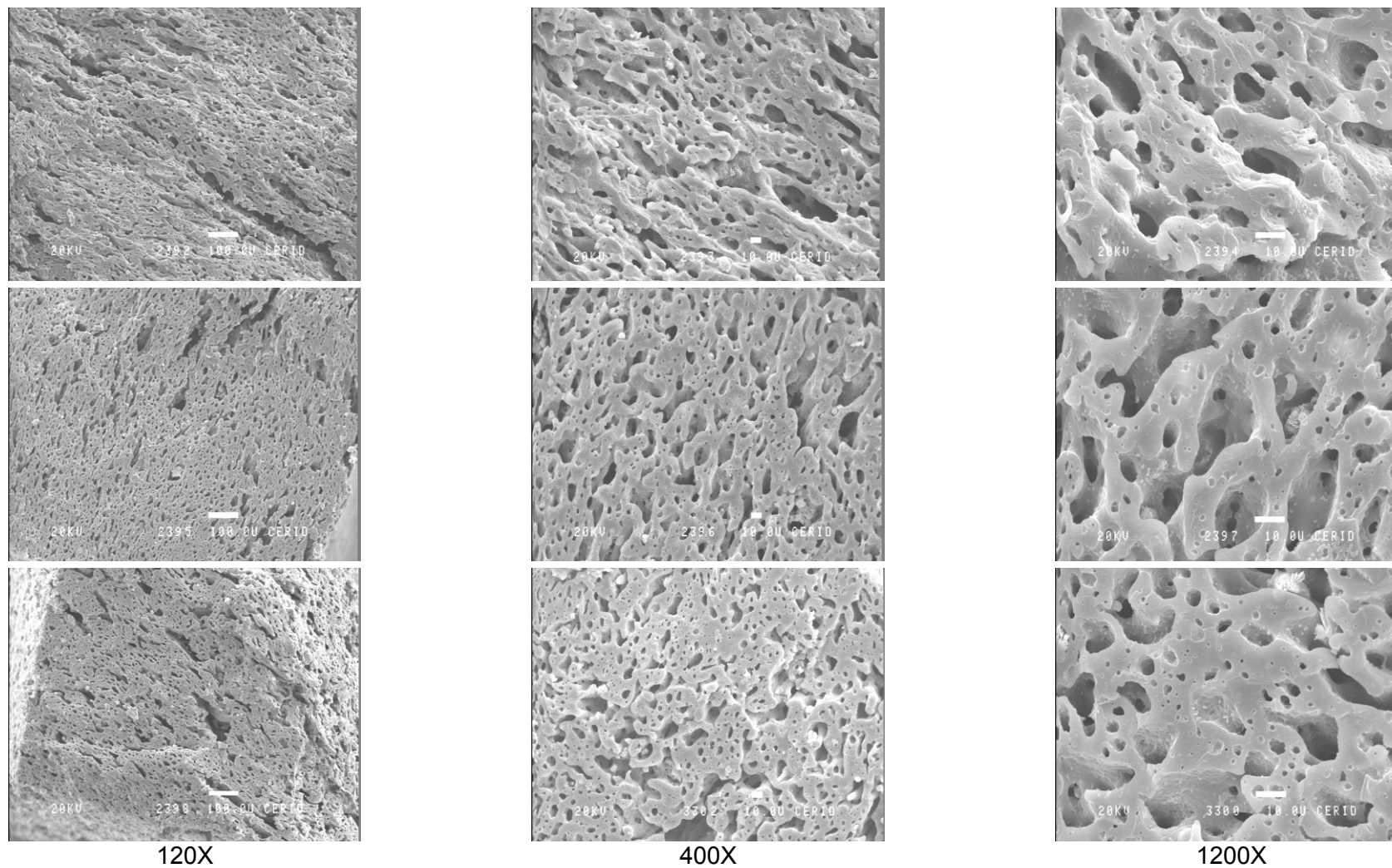


Figura D.7. Micrografías SEM de muestras almacenadas congeladas a 1 día de maduración.

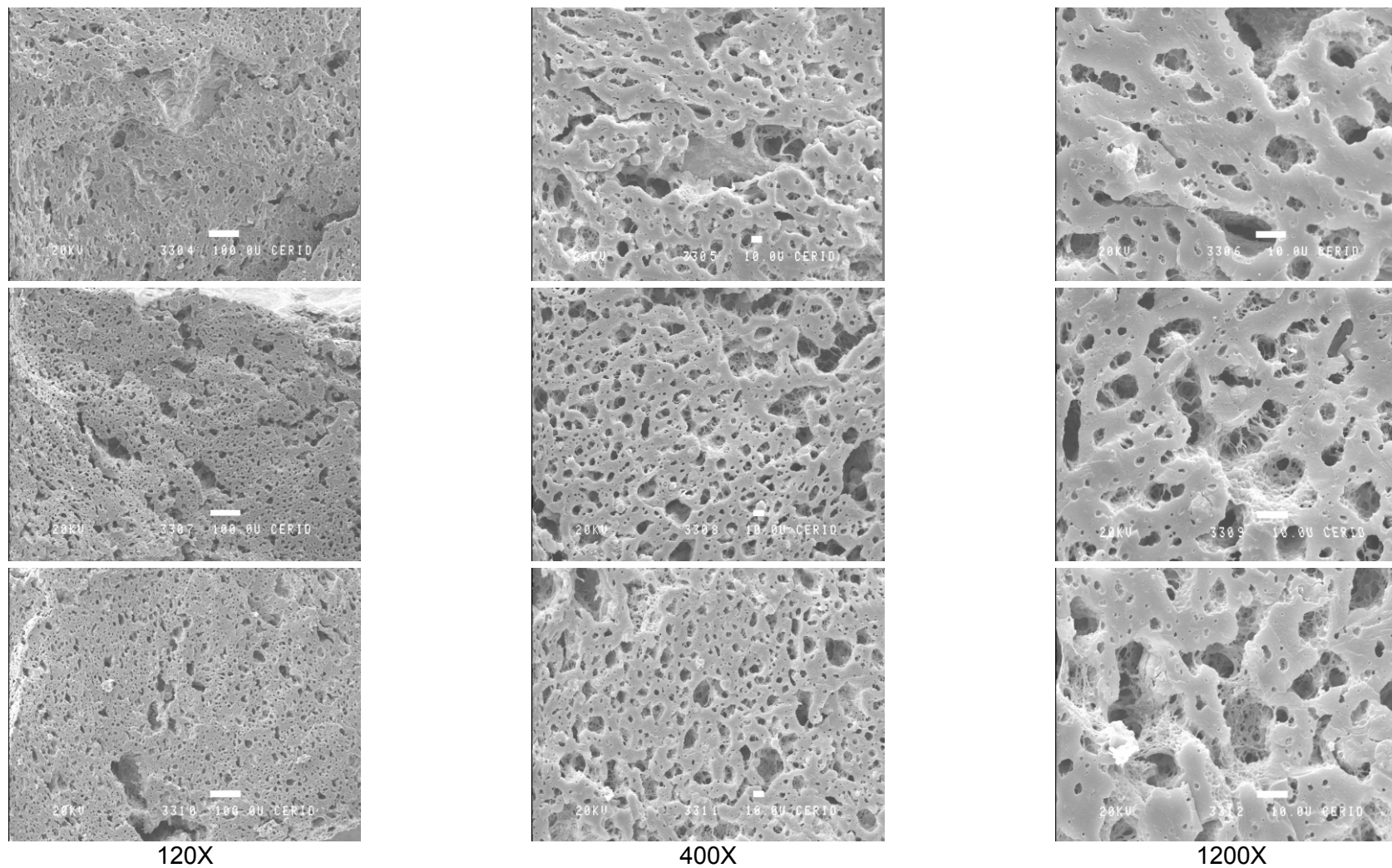


Figura D.8. Micrografías SEM de muestras almacenadas congeladas a 14 días de maduración.

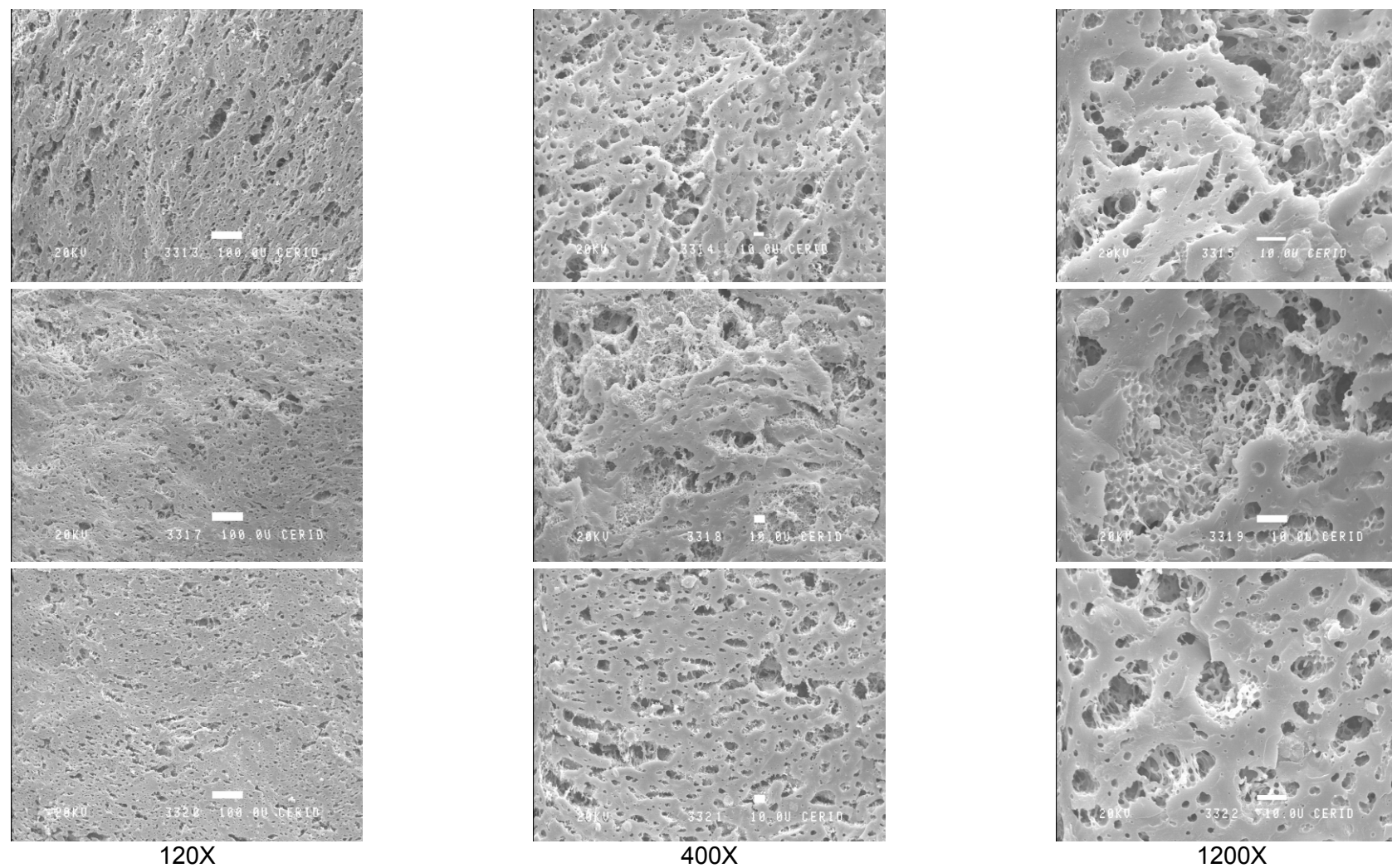


Figura D.9. Micrográficas SEM de muestras almacenadas congeladas a 41 días de maduración.

***Referencias
bibliográficas***

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ak MM, Gunasekaran S. 1996. Dynamic rheological properties of Mozzarella cheese during refrigerated storage. *Journal of Food Science* 61(3): 566-569.
- Ak MM, Gunasekaran S. 1997. Anisotropy in tensile properties of Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* 62(5): 1031-1033.
- Barbano DM, Chu KY, Yuri JJ, Kindstedt PS. 1993. Contributions of coagulant, starter, and milk enzymes to proteolysis and browning in Mozzarella cheese. *Marschall Italian & Specialty Cheese Seminars* 8.
- Barbano DM, Yun JJ, Kindstedt PS. 1994. Mozzarella cheese making by a stirred curd, no brine procedure. *Journal of Dairy Science* 77(9): 2687-2694.
- Benfeldt C, Sørensen J. 2001. Heat treatment of cheese milk: effect on proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal* 11: 567-574.
- Bertola NC, Califano AN, Bevilacqua AE, Zaritzky NE. 1996 a. Effect of freezing conditions on functional properties of low moisture Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 79(2): 185-190.
- Bertola NC, Califano AN, Bevilacqua AE, Zaritzky NE. 1996 b. Textural changes and proteolysis of low-moisture Mozzarella cheese frozen under various conditions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29: 470-474.
- Bevilacqua AE. 1997. Propiedades físico-químicas y comportamiento reológico en la maduración de quesos. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Büchi Labortechnik AG. 1998. Nitrogen determination according to Kjeldahl, order No. 97765 (Büchi, Flawil, Suiza).
- Califano AN, Bevilacqua AE. 1999. Freezing low moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content. *Food Chemistry* 64: 193-198.
- Cervantes MA, Lund DB, Olson NF. 1983. Effects of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese texture. *Journal of Dairy Science* 66(2): 204-213.
- Chaves ACSD, Viotto WH, Grosso CRF. 1999. Proteolysis and functional properties of Mozzarella cheese as affected by refrigerated storage. *Journal of Food Science* 64(2): 202-205.
- Chen P, Chen XD, Free KW. 1996. Measurement and data interpretation of the freezing point depression of milks. *Journal of Food Engineering* 30: 239-253.
- Chourot JM, Lauwers J, Massoji N, Lucas T. 2001. Behaviour of green beans during the immersion chilling and freezing. *International Journal of Food Science and Technology* 36: 179-187.

- Chourot JM, Macchi H, Fournaison L, Guilpart J. 2003. Technical and economical model for the freezing cost comparison of immersion, cryomechanical and air blast freezing processes. *Energy Conversion and Management* 44: 559-571.
- Cleland DJ, Valentas KJ. 1997. Prediction of freezing time and design of food freezers. En: Valentas KJ, Rotstein E, Singh RP. *Handbook of food engineering practice*. Boca Raton: CRC Press. p71-123.
- Código Alimentario Argentino (CAA). 2006. Disponible en internet en <http://www.anmat.gov.ar>
- Creamer LK, Olson NF. 1982. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science* 47: 631-636, 646.
- Creamer LK. 1976. Casein proteolysis in Mozzarella-type cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 11: 130-131.
- Dave RI, McMahon DJ, Oberg CJ, Broadbent JR. 2003 c. Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of Mozzarella cheese made using direct acidification. *Journal of Dairy Science* 86(1): 114-126.
- Dave RI, Sharma P, McMahon DJ. 2003 a. Melt and rheological properties of Mozzarella cheese as affected by starter culture and coagulating enzymes. *Lait* 83: 61-77.
- Dave RI, Sharma P, Muthukumarappan K. 2003 b. Effects of starter culture and coagulating enzymes on viscoelastic behavior and melt of Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* 68(4): 1404-1410.
- Diefes HA, Rizvi SSH, Bartsch JA. 1993. Rheological behavior of frozen and thawed low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* 58(4): 764-769.
- Esteban MA, Marcos A, Fernández-Salguero J. 1987. Cryoscopic approach to water activity measurement of non-liquid foods: Application to cheese. *Food Chemistry* 25: 31-39.
- Everitt BS, Dunn G. 2001. *Applied multivariate data analysis*. New York: Oxford University Press Inc.
- Farkye NY, Kiely LJ, Allshouse RD, Kindstedt PS. 1991. Proteolysis in Mozzarella cheese during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science* 74(5): 1433-1438.
- Federación Panamericana de Lechería (FEPALE). 2005. Disponible en internet en <http://www.infoleche.com/fepale/fepale/foro/muza/documentos.htm>

- Feeney EP, Fox PF, Guinee TP. 2001. Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese: 1. Composition and proteolysis. *Lait* 81: 463-474.
- Feeney EP, Guinee TP, Fox PF. 2002. Effect of pH and calcium concentration on proteolysis in Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 85(7): 1646-1654.
- Fennema O. 1972. Freezing of cheese - pros and cons. *Marschall Italian & Specialty Cheese Seminars* 17.
- Fennema OR, Powrie WD, Marth EH. 1973. Low - temperature preservation of foods and living matter. New York: Marcel Dekker Inc.
- Fikiin K. 2003. Novelties of food freezing research in Europe and beyond. Informe interno, Universidad Técnica de Sofía, Bulgaria.
- Fox PF, Cogan TM. 2004. Factors that affect the quality of cheese. En: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. 3ra Edición. Volumen 1. General aspects. Londres: Elsevier Applied Science.
- Fox PF, Guinee TP. 1987. Italian cheese. En: Fox PF. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Volumen 2. Major cheese groups. Londres: Elsevier Applied Science. p221-255.
- Fox PF, McSweeney PLH. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International* 12(4): 457-509.
- Fox PF, McSweeney PLH. 1998. *Dairy chemistry and biochemistry*. Londres: Thomson Science.
- Fox PF. 1963. Potentiometric determination of salt in cheese. *Journal of Dairy Science* 46: 744-745.
- Fox PF. 1987. Cheese: an overview. En: Fox PF. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Volume 1. General aspects. Londres: Elsevier Applied Science.
- Gardiner WP. 1997. *Statistical analysis methods for chemists. A software-based approach*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Geurts ThJ, Walstra P, Mulder H. 1972. Brine composition and prevention of the defect 'sof rind' in cheese. *Netherlands Milk Dairy Journal* 26: 168-179.
- Graiver NG, Zaritzky NE, Califano AN. 2004. Viscoelastic behavior of refrigerated and frozen low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* 69(3): 123-128.
- Guinee TP, Feeney EP, Fox PF. 2001. Effect of ripening temperature on low moisture Mozzarella cheese: 2. Texture and functionality. *Lait* 81: 475-485.

- Guinee TP. 2002. Cheese as a food ingredient. En: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF. Encyclopedia of dairy sciences. Londres: Academic Press. p418-455.
- Guinee TP, Mulholland EO, Mullins C, Corcoran MO. 2000. Effect of salting method on the composition, yield and functionality of low Mozzarella cheese. *Milchwissenschaft* 55(3): 135-138.
- Gunasekaran S, Ak MM. 2000. Dynamic oscillatory shear testing of foods-selected applications. *Trends in Food Science and Technology* 11: 115-127.
- Gunasekaran S, Ak MM. 2003. Cheese rheology and texture. Florida: CRC Press LCC.
- Guo MR, Gilmore JA, Kindstedt PS. 1997. Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 80(12): 3092-3098.
- Guo MR, Kindstedt PS. 1995. Age-related changes in the water phase of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 78(10): 2099-2107.
- Hair JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. 1999. Análisis multivariante. 5ta Edición. España: Prentice Hall Iberia.
- Hennelly PJ, Dunne PG, O'Sullivan M, O'Riordan ED. 2006. Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. *Journal of Food Engineering* 75: 388-395.
- IDF. 1969. Determination of the fat content of cheese and of processed cheese products. IDF Standard 5A. International Dairy Federation, Brusela, Bélgica.
- James C, Lejay I, Tortosa N, Aizpurua X, James SJ. 2005. The effect of salt concentration on the freezing point of meat simulants. *International Journal of Refrigeration* 28(6): 933-939.
- Joshi NS, Muthukumarappan K, Dave RI. 2003. Understanding the role of calcium in functionality of part skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 86(6): 1918-1926.
- Kindstedt PS, Larose KL, Gilmore JA, Davis L. 1996. Distribution of salt and moisture in Mozzarella cheese with soft surface defect. *Journal of Dairy Science* 79(12): 2278-2283.
- Kindstedt PS, Yun JJ, Barbano DM, Larose KL. 1995. Mozzarella cheese: Impact of coagulant concentration on chemical composition, proteolysis, and functional properties. *Journal of Dairy Science* 78(12): 2591-2597.
- Kindstedt PS. 2002. Pasta filata cheeses. En: Roginski H, Fuquay JW, Fox PF. Encyclopedia of dairy sciences. Londres: Academic Press. p389-391.

- Kuchroo CN, Fox PF. 1982. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37(6): 331-335.
- Kuo MI, Gunasekaran S. 2003. Effect of frozen storage on physical properties of pasta filata and nonpasta filata Mozzarella cheeses. *Journal of Dairy Science* 86(4): 1108-1117.
- Law BA. 1987. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. En: Fox PF. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Volumen 1. General aspects. Londres: Elsevier Applied Science. p365-392.
- Lema P, Ferrúa MJ, Galmés C, Betancurt P. 2001. Immersion freezing of fruits in aqueous refrigerating media: Influence operating conditions on quality parameters and heat transfer. *Proceedings of Enpromer 3*: 1693-1698.
- Lesage L, Voilley A, Lorient D, Bézard J. 1993. Sodium chloride and magnesium chloride affected by ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Science* 58(6): 1303-1306.
- Lucas T, Chourot JM, Bohuon P, Flick D. 2001. Freezing of a porous medium in contact with a concentrated aqueous freezant: numerical modeling of coupled heat and mass transport. *International Journal of Heat and Mass Transfer* 44: 2093-2106.
- Lucas T, Favier C, Chourot J, Guilpart J, Raoult-Wack AL, Aim RB. 2000 a. Immersion chilling and freezing of a porous medium. *International Journal of Food Science and Technology* 35: 583-598.
- Lucas T, Flick D, Chourot JM, Raoult-Wack AL. 2000 b. Modeling and control of thawing phenomena in solute-impregnated frozen foods. *Journal of Food Engineering* 45: 209-218.
- Lucas T, Flick D, Raoult-Wack AL. 1999 b. Mass and thermal behaviour of the food surface during immersion freezing. *Journal of Food Engineering* 41: 23-32.
- Lucas T, Francois J, Bohuon P, Raoult-Wack AL. 1999 a. Factors influencing mass transfer during immersion cold storage of apples in NaCl/sucrose solutions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 32(6): 327-332.
- Lucas T, Francois J, Raoult-Wack AL. 1998. Transport phenomena in immersion-cooled apples. *International Journal of Food Science and Technology* 33: 489-499.
- Lucas T, Raoult-Wack AL. 1996. Immersion chilling and freezing: Phase change and mass transfer in model food. *Journal of Food Science* 61(1): 127-132.

- Lucas T, Raoult-Wack AL. 1998. Immersion chilling and freezing in aqueous refrigerating media: review and future trends. *International Journal of Refrigeration* 21(6): 419-429.
- Lucey JA, Johnson ME, Horne DS. 2003. Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science* 86(9): 2725-2743.
- Lück H. 1977. Preservation of cheese and perishable dairy products by freezing. *South African Journal of Dairy Technology* 9(4): 127-132.
- Mannapperuma JD, Singh RP. 1988. Prediction of freezing and thawing times of foods using a numerical method based on enthalpy formulation. *Journal of Food Science* 53(2): 626-630.
- Mannapperuma JD, Singh RP. 1989. A computer-aided method for the prediction of properties and freezing/thawing times of foods. *Journal of Food Engineering* 9: 275-304.
- McKenzie HA. 1971. Milk proteins: Chemistry and molecular biology. Volumen 2. New York: Academic Press.
- McMahon DJ, Fife RL, Oberg CJ. 1999. Water partitioning in Mozzarella cheese and its relationship to cheese meltability. *Journal of Dairy Science* 82(7): 1361-1369.
- McMahon DJ, Paulson B, Oberg CJ. 2005. Influence of calcium, pH, and moisture on protein matrix structure and functionality in direct-acidified nonfat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 88(11): 3754-3763.
- McSweeney PLH, Fox PF. 1997. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait* 77: 41-76.
- Merrill RK, Oberg CJ, McManus WR, Kalab M, McMahon DJ. 1996. Microstructure and physical properties of a reduced fat Mozzarella cheese made using *Lactobacillus casei* spp. *casei* adjunct culture. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 29(8): 721-728.
- Metzger LE, Barbano DM, Kindstedt PS. 2001. Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese: III. Post-melt chewiness and whiteness. *Journal of Dairy Science* 84(6): 1357-1366.
- Miles CA, Mayer Z, Morley MJ, Houška M. 1997. Estimating the initial freezing point of foods from composition data. *International Journal of Food Science and Technology* 32: 389-400.
- Miles CA. 1991. The thermophysical properties of frozen foods. En: Bald WB. *Food freezing: Today and tomorrow*. Londres: Springer Verlag.

- Mounsey JS, O’Riordan ED. 1999. Empirical and dynamic rheological data correlation to characterize melt characteristics of imitation cheese. *Journal of Food Science* 64(4): 701-703.
- Mounsey JS, O’Riordan ED. 2001. Characteristics of imitation cheese containing native starches. *Journal of Food Science* 66(4): 586-591.
- Muthukumarappan K, Wang YC, Gunasekaran S. 1999. Estimating softening point of cheeses. *Journal of Dairy Science* 82(11): 2280-2286.
- Noomen A. 1978. Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). 2. Activity of calf rennet. *Netherlands Milk Dairy Journal* 32: 49-68.
- Oberg CJ, Broadbent JR, Strickland M, McMahon DJ. 2002. Diversity in specificity of the extracellular proteinases in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology* 34: 455-460.
- Oberg CJ, Merrill RK, Brown RJ, Richardson GH. 1992 a. Effects of milk-clotting enzymes on physical properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 75(3): 669-675.
- Oberg CJ, Merrill RK, Brown RJ, Richardson GH. 1992 b. Effects of freezing, thawing, and shredding on low moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 75(5): 1161-1166.
- Oberg CJ, Wang A, Moyes LV, Brown RJ, Richardson GH. 1991. Effects of proteolytic activity of thermolactic cultures on physical properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 74(2): 389-397.
- Olson NF. 1982. The effect of salt levels on the characteristics of Mozzarella cheese before and after frozen storage. *Marschall Italian & Specialty Cheese Seminars* 1.
- Oommen BS, McMahon DJ, Oberg CJ, Broadbent JR, Strickland M. 2002. Proteolytic specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* influences functional properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 85(11): 2750-2758.
- Ozisik MN. 1994. *Finite difference methods in heat transfer*. Florida: CRC Press.
- Paulson BM, McMahon DJ, Oberg CJ. 1998. Influence of sodium chloride on appearance, functionality, and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 81(8): 2053-2064.
- Pham QT. 1996. Prediction of calorimetric properties and freezing time of foods from composition data. *Journal of Food Engineering* 30: 95-107.

- Polley SL, Snyder OP, Kotnour P. 1980. A compilation of thermal properties of foods. *Food Technology* 34(11): 76-94.
- Pripp AH, Stepaniak L, Sørhaug T. 2000. Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *International Dairy Journal* 10: 249-253.
- Rahman MS, Guizani N, Al-Khaseibi M, Al-Hinai SA, Al-Maskri SS, Al-Hamhami K. 2002. Analysis of cooling curve to determine the end point of freezing. *Food Hydrocolloids* 16: 653-659.
- Rahman S. 1995. *Food properties handbook*. Florida: CRC Press LLC.
- Rao MA. 1999. *Rheology of fluid and semisolid foods. Principles and applications*. New York: Aspen Publication.
- Rowney MK, Roupas P, Hickey MW, Everett DW. 1999. Factors affecting the functionality of Mozzarella cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology* 54: 94-102.
- Rowney MK, Roupas P, Hickey MW, Everett DW. 2004. Salt-induced structural changes in 1-day old Mozzarella cheese and the impact upon free oil formation. *International Dairy Journal* 14: 809-816.
- Schwartzberg HG, Chao RY. 1982. Solute diffusivities in leaching processes. *Food Technology* 36(2): 73-86.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). 2006. Disponible en internet en <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>
- Sheehan JJ, O'Sullivan K, Guinee TP. 2004. Effect of coagulant type and storage temperature on the functionality of reduced-fat Mozzarella cheese. *Lait* 84: 551-566.
- Shoemaker CF, Nantz J, Bonnans S, Noble AC. 1992. Rheological characterization of dairy products. *Food Technology* 46(1): 98-104.
- Sihufe GA. 2003. Efecto de la mezcla de sales (NaCl-KCl) y de la temperatura durante la etapa final de la maduración de quesos Fynbo. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Subramanian R, Gunasekaran S. 1997 a. Small amplitude oscillatory shear studies on Mozzarella cheese. Part I: Region of linear viscoelasticity. *Journal of Texture Studies* 28: 633-642.
- Subramanian R, Gunasekaran S. 1997 b. Small amplitude oscillatory shear studies on Mozzarella cheese. Part II: Relaxation spectrum. *Journal of Texture Studies* 28: 643-656.

- Tunick MH, Mackey KL, Shieh JJ, Smith PW, Cooke P, Malin EL. 1993 b. Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. *International Dairy Journal* 3: 649-662.
- Tunick MH, Mackey KL, Smith PW, Holsinger VH. 1991. Effects of composition and storage on the texture of Mozzarella cheese. *Netherlands Milk Dairy Journal* 45: 117-125.
- Tunick MH, Malin EL, Smith PW, Holsinger VH. 1995. Effects of skim milk homogenization on proteolysis and rheology of Mozzarella cheese. *International Dairy Journal* 5: 483-491.
- Tunick MH, Malin EL, Smith PW, Shieh JJ, Sullivan BC, Mackey KL, Holsinger VH. 1993 a. Proteolysis and rheology of low fat and full fat Mozzarella cheeses prepared from homogenized milk. *Journal of Dairy Science* 76(12): 3621–3628.
- Tunick MH, Van Hekken DL. 2002. Torsion gelometry of cheese. *Journal of Dairy Science* 85(11): 2743-2749.
- Tunick MH. 2000. Symposium: Dairy products rheology - Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal of Dairy Science* 83(8): 1892-1898.
- Van der Sman RGM, Boer E. 2005. Predicting the initial freezing point and water activity of meat products from composition data. *Journal of Food Engineering* 66: 469-475.
- Van Hekken DL, Tunick MH, Malin EL, Holsinger VH. 2007. Rheology and melt characterization of low-fat and full fat Mozzarella cheese made from microfluidized milk. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 40: 89-98.
- Van Hekken DL, Tunick MH, Park YW. 2004. Rheological and proteolytic properties of Monterey Jack goat's milk cheese during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(17): 5372-5377.
- Van Hekken DL, Tunick MH, Park YW. 2005. Effect of frozen storage on the proteolytic and rheological properties of soft caprine milk cheese. *Journal of Dairy Science* 88(6): 1966-1972.
- Whitaker S. 1977. Simultaneous heat, mass, and momentum transfer in porous media: A theory of drying. *Advances in Heat Transfer* 13: 119-203.
- Yu C, Gunasekaran S. 2005. A systems analysis of pasta filata process during Mozzarella cheese making. *Journal of Food Engineering* 69: 399-408.
- Yun JJ, Barbano DM, Kiely LJ, Kindstedt PS. 1995. Mozzarella cheese: Impact of rod:coccus ratio on composition, proteolysis, and functional properties. *Journal of Dairy Science* 78(4): 751-760.

- Yun JJ, Barbano DM, Kindstedt PS. 1993 b. Mozzarella cheese: Impact of milling pH on chemical composition and proteolysis. *Journal of Dairy Science* 76(12): 3629-3638.
- Yun JJ, Barbano DM, Kindstedt PS. 1993 c. Mozzarella cheese: Impact of coagulant type on chemical composition and proteolysis. *Journal of Dairy Science* 76(12): 3648-3656.
- Yun JJ, Kiely LJ, Barbano DM, Kindstedt PS. 1993 a. Mozzarella cheese: Impact of cooking temperature on chemical composition, proteolysis and functional properties. *Journal of Dairy Science* 76(12): 3664-3673.
- Yun JJ, Kiely LJ, Kindstedt PS, Barbano DM. 1993 d. Mozzarella cheese: Impact of milling pH on functional properties. *Journal of Dairy Science* 76(12): 3639-3647.
- Yun JJ, Kiely LJ, Kindstedt PS, Barbano DM. 1993 e. Mozzarella cheese: Impact of coagulant type on functional properties. *Journal of Dairy Science* 76(12): 3657-3663.
- Zalazar CA. 2008. Profesor Titular de la Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. Comunicación personal.
- Zorrilla SE, Rubiolo AC. 1994. A model for using the diffusion cell in the determination of multicomponent diffusion coefficients in gels or foods. *Chemical Engineering Science* 49(13): 2123-2128.
- Zorrilla SE, Rubiolo AC. 1997. Kinetics of casein degradation during ripening of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine. *Journal of Food Science* 62(2): 386-389.
- Zorrilla SE, Rubiolo AC. 2005 a. Mathematical modeling for immersion chilling and freezing of foods. Part I: Model development. *Journal of Food Engineering* 66(3): 329-338.
- Zorrilla SE, Rubiolo AC. 2005 b. Mathematical modeling for immersion chilling and freezing of foods. Part II: Model solution. *Journal of Food Engineering* 66(3): 339-351.
- Zorrilla SE. 1993. Difusión de NaCl y KCl en quesos. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.