

Universidad Nacional del Litoral

**Facultad de Bioquímica y Ciencias
Biológicas**



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

**“Estrategias tecnológicas para el
incremento de la proteólisis y
peptidólisis de quesos duros”**

Autora: Bioq (MSc.) Luciana María Costabel

Directora: Dra. Erica Hynes

Co-Director: Dr. Sergio Vaudagna

Lugar de Trabajo:

INTA EEA Rafaela, INTA Castelar,

INLAIN (UNL/CONICET)

-2015-

A Fernando, Maitena y Gianluca

A mis padres y hermanos

Miembros del Jurado de la Tesis

Titulares:

Dra. Analía Graciela Abraham

Dra. Ana M. R. Pilosof

Dr. Claudio Adrián Bernal

Suplente:

Dr. Guillermo Adrián Sihufe

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que posibilitaron la ejecución de la presente tesis:

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado

Al INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) por otorgarme la beca que me permitió realizar esta Tesis doctoral y por el financiamiento de las experiencias de la tesis

A la UNL, por el financiamiento de parte de las experiencias realizadas en la presente tesis, a través del proyecto CAI+D 2009 "Incremento de la proteólisis y la lipólisis de quesos duros de pasta cocida mediante intervenciones innovadoras en la tecnología de elaboración", código 12/Q280

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

A mi directora Erica Hynes y a mi co-director Sergio Vaudagna, por haberme guiado en el desarrollo y escritura de esta tesis. Por la confianza que han depositado en mí, por el compromiso asumido y por el apoyo en todo momento.

A mis amigos y colegas del grupo Calidad de Leche y Agroindustria INTA Rafaela: Miguel, Roxana, Coqui, Luisi, Gabi, Sonia, Belén, Diane, Ale, Vero, Kari y Jorgito. Por su aliento permanente, por su amistad, compañerismo y consejos en los momentos difíciles.

A Gabi, por su colaboración incondicional en las elaboraciones y análisis de los quesos, y por acompañarme en los viajes a Castelar.

A Alejandra Cuatrín, por su asesoramiento en el análisis estadístico de los datos, por su ayuda y buena predisposición en todo momento.

A Roxana, Dianela y Leo por brindarme asilo para la escritura de la tesis.

A Verónica Neder y Ariel Massera, del laboratorio de Sanidad Animal, por su colaboración en los recuentos microbiológicos. También a Mónica, Rosana, Bety, Nati,

Graciela y Eve del laboratorio de Producción Animal, por los buenos momentos compartidos.

A todos los integrantes del INLAIN, por hacerme sentir tan cómoda en todo momento. Especialmente a Carina, Guillermo, Facundo, Ayelén, Susana, Cristina, Silvina y Leila, que fueron los que estuvieron dándome una mano tan valiosa en el laboratorio, ya sea orientándome en la realización de las técnicas, ayudándome a encontrar el material, o compartiendo unos ricos mates.

Un agradecimiento muy especial a Carina Bergamini, por sus valiosos aportes, por su ayuda desinteresada, por su paciencia, por los momentos compartidos.

A Carlos Meinardi y Mario Candiotti, por su colaboración en la elaboración de quesos en el INLAIN, por su buena onda y sus consejos.

A los integrantes del Instituto Tecnología de Alimentos del CIA-INTA Castelar del Área de Procesamiento de Alimentos, por haberme recibido con tanta cordialidad. Especialmente a Claudio y Roberto, por colaborar incondicionalmente en las experiencias de esta tesis realizadas en el mencionado instituto. También a Adriana Pazos (del Área de Investigación Bioquímica y Nutrición), Leandro Langman y Fernando Carduza (del Área de Análisis Físicos y Sensoriales) por su colaboración.

A mis amigas, por estar siempre, por su aliento para la finalización de esta tesis.

A mis hermanos, por su apoyo y aliento en todo momento. Por su alegría y buena onda.

A mis padres, por su ejemplo constante. Por enseñarme que con esfuerzo, dedicación y perseverancia todo es posible. Por sus consejos, su apoyo, su fortaleza, y por acompañarme siempre...

Finalmente, quiero hacer un agradecimiento muy especial a Fernando, quien ha sido un pilar fundamental para el desarrollo de este doctorado. Por su amor, su paciencia, su apoyo y aliento permanente. Por contenerme en los momentos difíciles. Y a mis queridos Maitena y Gianluca, que sin darse cuenta, con sus ocurrencias, alegría, espontaneidad, besos y abrazos fueron mi cable a tierra en los momentos difíciles...

Publicaciones

Parte de los resultados de esta tesis, han sido publicados en:

Revistas internacionales:

Costabel, L.M.; Bergamini, C.V.; Pozza, L.; Cuffia, F.; Candioti, M. C. y Hynes, E. (2015) Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses. *Journal of Dairy Research*.

Costabel, L. M., Bergamini, C., Vaudagna, S. R., Cuatrin, A. L., Audero, G., y Erica Hynes, E. (2016) Effect of high-pressure treatment on hard cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*

Congresos Internacionales

Meinardi, C.; Costabel, L.M.; Páez, R.B.; Audero, G.; Zalazar, C. y Taverna M.A. (2008). Desarrollo de un protocolo para elaboración de queso Reggianito utilizando ácido láctico y cultivos directos. IV Congreso Internacional de Marketing y Tecnología de Quesos. Bs As, 25 al 27 de junio de 2008

Costabel, L.M.; Hynes, E.; Vaudagna, S.; Bergamini, C.; Cuatrin A. y Audero, G. (2012) Utilización de altas presiones hidrostáticas para acelerar la maduración de queso Reggianito: efecto sobre la proteólisis. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, 14 al 16 de noviembre de 2012. Copia electrónica: ISBN-13: 978-987-28845-0-5

Costabel, L.; Vaudagna, S.; Sanow, C.; Hynes, E.; Cuatrin, A.; Barrio, Y. y Audero, G. (2012) Reduction of ripening time of Reggianito cheese by applying high hydrostatic pressure (HHP): effect on texture parameters. 16th World Congress of Food Science and Technology, Foz de Iguazú, Paraná, Brasil. 5 al 9 de agosto

Costabel, L.; Hynes, E.; Vaudagna, S.; Bergamini, C.; Cuatrin, A. y Audero, G. Efecto del tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) sobre la actividad de enzimas proteolíticas en queso Reggiano. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICYTAC 2014), Córdoba noviembre de 2014. Copia electrónica: ISBN en trámite

Congresos Nacionales

Costabel, L.; Cuffia, F.; Bergamini, C.; Candiotti, M.; Velez, A. y Hynes, E. (2010) Estrategias para incrementar la proteólisis de quesos duros de pasta cocida por activación de la enzima coagulante residual. XXVII Congreso Argentino de Química. Publicación de resúmenes presentación de pósters. Copia electrónica ISBN 978 - 987 - 99428 -1-9

Costabel, L.M.; Vaudagna, S. R.; Hynes, E.; Cuatrin A. L. y Audero, G. (2011) Efecto del tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) sobre composición y proteólisis de queso Reggiano. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, 19 al 21 de octubre de 2011. Copia electrónica ISBN 978-987-22165-4-2

Costabel, L.; Vaudagna, S.; Hynes, E.; Sanow, C.; Cuatrin, A. y Audero, Gabriela. (2012). Utilización de altas presiones hidrostáticas para acelerar la maduración de queso Reggiano: efecto sobre composición, índice de maduración y textura. II Simposio Argentino de Lactología, FIQ, UNL. 16 y 17 de agosto de 2012

Costabel, L.; Bergamini, C.; Pozza, L.; Candiotti, M. y Hynes, E. Perfiles peptídicos en queso Reggiano Argentino con diferentes procesos de cocción. II Simposio Argentino de Lactología, FIQ, UNL. 16 y 17 de agosto de 2012

Resumen

La maduración de los quesos es la etapa más larga dentro del proceso productivo general. Mientras que los trabajos de transformación de la leche en cuajada se miden en minutos, la maduración se mide en días, meses o años. Por esta razón tiene una gran incidencia sobre el aspecto económico, ya que grandes volúmenes de producto están inmovilizados durante largos periodos. El incremento de la proteólisis y peptidólisis a través de diversas estrategias tecnológicas, ya sea mediante operaciones simples o por la aplicación de tecnologías innovadoras, aparece como muy favorable desde el punto de vista de la aceleración de la maduración, y por consiguiente, de la disminución de los costos de producción de un alimento de elevado valor agregado. Lo que se busca es reducir un tiempo de espera significativo en el costo del producto, sin alterar la bioquímica de la maduración. Para aumentar la intensidad de las reacciones de hidrólisis de las caseínas intactas y de los péptidos provenientes de ellas, se han ensayado diversas metodologías, entre las que pueden mencionarse la utilización de fermentos adjuntos, la elevación de la temperatura de almacenamiento de los quesos, y la adición de enzimas exógenas.

El objetivo de este trabajo de tesis fue acelerar la maduración de queso Reggianito, mediante modificaciones de la tecnología tradicional, destinadas a incrementar la proteólisis y peptidólisis. Las estrategias evaluadas fueron las siguientes: i) incremento de la actividad de enzimas proteolíticas no microbianas, la enzima coagulante residual y la plasmina, a través de una modificación de la temperatura de cocción en presencia de dos coagulantes diferentes; y ii) aplicación de la tecnología de Altas Presiones Hidrostáticas (APH).

En primer lugar, se evaluó la reproducibilidad de dos modelos experimentales de queso duro de pasta cocida, utilizados posteriormente en las experiencias de la tesis. Para ello, se trabajó con un conjunto de tinas individuales en el INLAIN, y en una miniplanta automatizada en el INTA. Mediante la puesta a punto de los modelos descritos, fue posible obtener matrices alimentarias reproducibles y comparables a los sistemas reales. Los parámetros tecnológicos de la elaboración se estandarizaron para

poner de relevancia el efecto de los factores en estudio en las dos estrategias planteadas en esta tesis.

En la primera experiencia, se estudió la influencia del tipo de coagulante y de la temperatura de cocción sobre la proteólisis y la actividad de la enzima coagulante residual y de la plasmina. Se utilizaron dos temperaturas de cocción diferentes: 50 y 56°C, y dos tipos de coagulantes: quimosina bovina y quimosina de camello, ambas obtenidas por fermentación de microorganismos modificados genéticamente. Se elaboraron quesos Reggianito miniatura y las muestras se almacenaron por 90 días a 12°C. La temperatura de cocción influyó sobre la actividad coagulante residual, verificándose que los quesos en los cuales la misma fue de 50°C retuvieron una actividad significativamente mayor que los tratados a 56°C. Por el contrario, la temperatura de cocción no modificó la actividad de la plasmina. La proteólisis primaria también resultó afectada por la temperatura de cocción. Se observó que la hidrólisis de la caseína α_{s1} , la cual es mediada principalmente por la quimosina, fue menor en los quesos cuya temperatura de cocción fue de 56°C. Además, el contenido de nitrógeno en las fracciones solubles resultó menor en los quesos tratados a 56°C que en los tratados a 50°C. Se observó una influencia significativa del tipo de coagulante utilizado, especialmente en las fracciones nitrogenadas y en los perfiles peptídicos; ambos indicadores mostraron que la quimosina de camello fue levemente menos proteolítica que la quimosina bovina. Sin embargo, esas diferencias resultaron menores que las debidas a la temperatura de cocción.

En la segunda experiencia, se estudió el efecto del tratamiento con APH, aplicando diferentes combinaciones presión-tiempo de mantenimiento, sobre la composición química, el pH, los recuentos microbiológicos, la proteólisis, la peptidólisis, la actividad de enzimas proteolíticas no microbianas, la textura, los parámetros cromáticos y los atributos sensoriales del queso Reggianito. Para ello, se elaboraron quesos Reggianito miniatura, a los cuales se les aplicó presiones de 100 y 400 MPa durante 5 y 10 min a 20°C el día posterior a la elaboración. Algunos quesos no fueron tratados con APH, los que se consideraron como controles. Todos los quesos se maduraron durante 90 días a 12°C.

El tratamiento con APH no modificó la composición química de los quesos ni el pH, pero se observaron diferencias significativas en los recuentos microbiológicos. En

efecto, se verificó que los quesos tratados a 400 MPa presentaron recuentos de los microorganismos del fermento inferiores a los de los quesos controles y tratados a 100 MPa. Los quesos tratados a 400 MPa durante 10 min exhibieron una actividad de plasmina significativamente mayor que el resto, mientras que no se observaron diferencias debidas al tratamiento con APH en la actividad coagulante residual. El seguimiento de la proteólisis mostró que los quesos tratados a 400 MPa presentaron una mayor hidrólisis de las caseínas α_{s1} y β y niveles significativamente mayores de nitrógeno en las fracciones solubles. Los resultados del análisis de los perfiles peptídicos también mostraron una aceleración de la maduración atribuible a la aplicación de los tratamientos a 400 MPa. Se observó que las muestras tratadas a 400 MPa durante 10 min alcanzaron a los 60 días de maduración los mismos niveles de nitrógeno en las fracciones solubles y aminoácidos libres totales que las muestras control al final de la maduración (90 días). Los tratamientos a 100 MPa, independientemente del tiempo de mantenimiento de la presión, no provocaron cambios relevantes en ninguno de los parámetros evaluados con respecto al control, a excepción de un incremento en el nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (NS-TCA).

El esfuerzo y la deformación a la fractura de los quesos tratados a 400 MPa fueron mayores que en el resto de las muestras al inicio de la maduración, mientras que esos quesos presentaron valores inferiores de elasticidad y la cohesividad durante todo el periodo de almacenamiento. El mantenimiento de los valores de estas propiedades durante el almacenamiento puede atribuirse a la mayor proteólisis evidenciada en los quesos tratados a 400 MPa. Los parámetros cromáticos no resultaron afectados por el tratamiento con APH. El panel entrenado, en las sesiones de análisis sensorial, señaló que a los 45 días de maduración, los quesos tratados a 400 MPa presentaron valores más intensos que las demás muestras en los atributos gusto salado y flavour típico. El efecto del tiempo de mantenimiento de la presión no fue significativo en los parámetros de textura y en los atributos sensoriales evaluados, a excepción de la elasticidad, en la cual las muestras tratadas a 400 MPa durante 10 min tuvieron un valor menor que las tratadas durante 5 min.

Los resultados de la primera experiencia permitieron concluir que una modificación sencilla en la tecnología de elaboración de queso Reggiano, como la disminución de la temperatura de cocción, fue eficaz para incrementar la actividad residual de la enzima coagulante, con la consiguiente aceleración de la proteólisis y

peptidólisis en los quesos. El reemplazo de la quimosina bovina por quimosina de camello, no presentó ventajas en este sentido.

En cuanto a la utilización de la tecnología APH, la segunda experiencia de la presente tesis proporcionó evidencia de que un tratamiento de 400 MPa durante 10 min fue efectivo para acelerar la maduración del queso Reggianito a través del incremento de la proteólisis y la peptidólisis. Los quesos tratados a la mayor presión mostraron una aceleración en el desarrollo de los atributos sensoriales de un queso maduro.

Abstract

Ripening is the longest step of cheese-making understood as a whole process. While the work of transforming milk into curd is measured in minutes, ripening is measured in days, months or years. For this reason, it has a great impact on cheese costs, as large volumes of product are stored for long time. Increased rate of proteolysis and peptidolysis by different technological approaches has been proposed to shorten ripening time. Either simple operations or innovative technologies may be applied to reduce ripening time and storage costs without altering the biochemistry of ripening. Strategies for acceleration of cheese ripening include adjunct cultures, increased temperatures in ripening room and the addition of exogenous enzymes.

The objective of this thesis was to accelerate the ripening of Reggianito cheese by means of modifications in traditional technology aimed at increasing proteolysis and peptidolysis. Two approaches were undertaken: i) increasing the activity of the no microbial proteolytic enzymes usually occurring in the cheese - residual coagulant enzyme and plasmin - through a modification of the curd scalding temperature in the presence of two different coagulants; and ii) application of high hydrostatic pressure (HHP).

First, two experimental models of hard cooked cheese were assessed for reproducibility and validated, and then applied on the experiences of this thesis. An ensemble of four parallel cheese vats was used at INLAIN while an automated mini-cheese making plant was available at INTA. The cheeses obtained were reproducible and comparable to real Reggianito cheeses. Technological parameters were standardized to highlight effect of the factors under study by the two approaches proposed.

In the first experience, we studied the influence of the type of coagulant enzyme and the temperature of curd scalding on the proteolysis and the proteolytic activities of coagulant and plasmin, in the interest of reducing ripening time of Reggianito cheese. We tested two scalding temperature: 50 and 56°C, and two type of coagulant enzyme, bovine chymosin or camel chymosin, both produced by fermentation of genetically

modified organisms. All miniature Reggianito cheeses obtained were ripened for 90 d at 12 °C.

Curd scalding temperature showed a significant influence on residual coagulant activity; the cheeses cooked at 50°C had significantly higher activity than those treated at 56°C. In contrast, scalding temperature did not modify plasmin activity. Proteolysis was mainly affected by curd cooking temperature because chymosin-mediated hydrolysis of α_{s1} casein was slower in cheeses treated at 56°C. Additionally, the content of nitrogen in cheeses soluble fractions was consistently lower in the cheeses scalded at 56°C than in those cooked at 50°C. A significant influence from the type of coagulant enzyme was observed, especially in the nitrogen fractions and peptide profiles, which showed that camel chymosin was slightly less proteolytic than bovine chymosin. However, differences attributable to the type of coagulant enzyme were lower than the caused by the scalding temperature.

In the second experience, we studied the effect of the HHP treatment at different combinations of pressure- pressurization time on gross composition, pH, microbial counts, proteolysis, peptidolysis, proteolytic activities, texture and chromatic parameters of Reggianito cheese, as well as its sensory profile. For that purpose, 1-day-old miniature cheeses were pressurized at 100 or 400 MPa and 20°C for 5 or 10 min, while control cheeses in the trial were not pressurized. All cheeses were ripened at 12°C during 90 days. The HHP did not affect gross composition and pH of the cheeses, but microbial load changed, especially because the starter culture was significantly lower at the beginning of the ripening of the cheeses treated at 400 MPa than in controls and cheeses pressurized at 100 MPa. Cheeses treated at 400 MPa 10 min had significantly higher plasmin activity than the others, but the chymosin activity did not change. Proteolysis assessment showed that the cheese treatment at 400 MPa also resulted in cheeses with increased breakdown of α_{s1} and β casein. In addition, nitrogen content in soluble fractions was significantly higher in cheeses treated at 400 MPa. Peptide profiles showed an acceleration of cheese ripening, in cheeses treated at 400 MPa. Nitrogen soluble fraction and total content of free amino acids in 60-d-old treated cheese were as high as in full ripened control cheeses (90 d). Treatment at 100 MPa, independently of pressurization time, did not produce significant changes in neither of the evaluated parameters, with exception of fraction soluble nitrogen in trichloroacetic acid.

At 1 day storage, cheeses treated at 400 MPa had stress and strain at fracture values significantly higher than the others. In addition, springiness and cohesiveness of cheeses treated at 400 MPa were significantly lower than those of control cheeses and cheeses pressurized at 100 MPa throughout the ripening. The maintenance of the values of these properties during ripening was probably due to the increment of proteolysis in cheeses HHP treated at 400 MPa. The chromatic parameters were not affected by HHP treatment. In the sensory assessment, the trained panel indicated that cheeses HHP treated at 400 MPa at 45 d of ripening had more intense values than the other samples on the attributes salty taste and typical flavor. The pressurization time effect was not significant in texture parameters and sensory attributes tested, except for elasticity, in which the samples treated at 400 MPa for 10 min had a lower value than the treated for 5 min.

The results obtained in the first experience allowed us to conclude that a simple change in cheese making of Reggiano as decreasing the curd scalding temperature was effective to increase residual coagulant activity, with consequent acceleration of proteolysis and peptidolysis in cheeses. No advantage was obtained from replacement of bovine chymosin by camel chymosin

The second experience of this thesis provided evidence that HHP treatment at 400 MPa was effective to accelerate the ripening of Reggiano cheeses through increased proteolysis and peptidolysis. Cheeses treated at the higher pressure also showed an acceleration in the development of the sensory attributes of a ripened cheese.

Índice de contenidos

INTRODUCCIÓN

1. La Argentina como país quesero	2
Un poco de historia	2
La industria quesera actual	2
2. El queso como alimento: generalidades y origen	4
3. El queso Reggianito Argentino	7
4. La maduración del queso	10
4.1 Transformaciones bioquímicas de la maduración	10
4.2 Proteólisis	12
4.2.1 Principales agentes proteolíticos que intervienen en la maduración de los quesos	12
Coagulante residual.....	13
Enzimas provenientes de la leche: Pasmína	15
Microorganismos (fermento primario y secundario y bacterias no fermento)	17
4.3 Cambios en las características sensoriales de los quesos durante la maduración	19
5. Estrategias tecnológicas para acelerar la maduración: un panorama general	23
5.1 Elevación de la temperatura de maduración	24
5.2 Adición de enzimas exógenas	24
5.3 Utilización de fermentos adjuntos	26
6. La aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH)	26
6.1 Aplicación de APH en alimentos.....	26
6.2 Principios básicos	29
6.3 Efecto de las APH sobre los componentes de los alimentos y sobre los microorganismos	30
6.4 Equipos y descripción del proceso APH	32
6.5 Efecto de la tecnología APH sobre la calidad de leche y quesos	37
6.5.1 Aplicación de APH a la leche	37

6.5.1.1 Efecto sobre los componentes	37
Proteínas	37
Grasa	39
Lactosa	39
Componentes minoritarios	39
6.5.1.2 Efecto sobre las enzimas	39
6.5.1.3 Efecto sobre los microorganismos	40
6.5.2 Producción de quesos con leche tratada con APH	41
6.5.3 Efecto del tratamiento con APH sobre el queso ya elaborado	43
6.5.3.1 Efecto sobre los microorganismos	43
6.5.3.2 Efecto sobre la composición y el pH	46
6.5.3.3 Efecto sobre la microestructura	48
6.5.3.4 Efecto sobre la proteólisis	49
6.5.3.5 Efecto sobre propiedades texturales, parámetros cromáticos y características sensoriales	53

OBJETIVOS

Objetivo general	60
Objetivos específicos	60

Capítulo 1: VALIDACIÓN DE MODELOS DE QUESO DURO DE PASTA COCIDA

1. Introducción	62
2. Materiales y Métodos	64
2.1 Quesos miniatura- tinas paralelas	64
2.2 Quesos miniatura- miniplanta automatizada	67
2.3 Análisis de los quesos	71
2.3.1 pH	72
2.3.2 Humedad	72
2.3.3 Materia Grasa	72
2.3.4 Proteínas	73
2.3.5 Cloruro de Sodio	73

2.4 Análisis estadístico	74
3. Resultados	74
3.1 Quesos miniatura- finas paralelas	74
3.2 Quesos elaborados en miniplanta automatizada	75
4. Discusión	76
5. Conclusión	78

Capítulo 2: INFLUENCIA DEL TIPO DE COAGULANTE Y DE LA TEMPERATURA DE COCCIÓN SOBRE LA PROTEÓLISIS DE QUESO REGGIANITO

1. Introducción	80
2. Materiales y Métodos	81
2.1 Diseño experimental	81
2.2 Determinación de la dosis de coagulante	82
2.3 Elaboración de los quesos	83
2.4 Análisis de los quesos	85
2.4.1 Composición química, pH y análisis microbiológicos	86
2.4.2 Actividad coagulante residual	86
2.4.3 Actividad de plasmina	88
2.4.4 Seguimiento de la proteólisis	89
Contenido de Nitrógeno Soluble	89
Electroforesis en gel de poliacrilamida	90
Perfiles peptídicos por HPLC.....	91
2.5 Análisis estadístico	92
3. Resultados	93
3.1 Determinación de la dosis de coagulante	93
3.2 Composición química, pH y recuentos microbiológicos	93
3.3 Actividad de enzima coagulante residual y de plasmina	94
3.4 Seguimiento de la proteólisis	96
Nitrógeno soluble (NS)	96
Electroforesis	98
Péptidos solubles en agua por HPLC	99
4. Discusión	101

5. Conclusiones	106
-----------------------	-----

Capítulo 3: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ALTAS PRESIONES HÍDROSTÁTICAS (APH) SOBRE LA COMPOSICIÓN, LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y LA PROTEÓLISIS DE QUESO REGGIANITO

1. Introducción	108
2. Materiales y Métodos	109
2.1 Diseño experimental	109
2.2 Elaboración de los quesos	110
2.3 Tratamiento con Altas Presiones Hidrostáticas y maduración de los quesos.	111
2.4 Análisis de los quesos	112
2.4.1 Composición química y pH	114
2.4.2 Recuentos microbiológicos	114
2.4.3 Actividad coagulante residual y de plasmina	114
2.4.4 Seguimiento de la proteólisis	114
Fracciones nitrogenadas (NS-pH4,6 y NS-TCA)	114
Electroforesis	115
Péptidos solubles en agua por HPLC.....	115
Perfiles de aminoácidos libres y aminoácidos libres totales	115
2.5 Análisis estadístico.....	116
3. Resultados	118
3.1 Composición química y pH de los quesos	118
3.2 Recuentos microbiológicos	120
3.3 Actividad de plasmina	124
3.4 Actividad coagulante residual	126
3.5 Seguimiento de la proteólisis	126
Nitrógeno soluble	126
Electroforesis	128
Péptidos solubles en agua por HPLC	129
Perfil de aminoácidos libres y amonoácidos libres totales	133
6. Discusión	136
7. Conclusiones	143

**Capítulo 4: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ALTAS PRESIONES
HIDROSTÁTICAS (APH) SOBRE PROPIEDADES TEXTURALES,
PARÁMETROS CROMÁTICOS Y CARACTERÍSTICAS
SENSORIALES DE QUESO REGGIANITO**

1. Introducción	145
2. Materiales y Métodos	146
2.1 Diseño experimental, elaboración de los quesos, tratamiento con APH y maduración de los quesos	146
2.2 Análisis de los quesos	147
2.2.1 Textura	147
2.2.1.1 Preparación de las muestras	147
2.2.1.2 Ensayos de Compresión Uniaxial	148
2.2.1.3 Análisis del Perfil de Textura (TPA)	152
2.2.2 Evaluación de los parámetros cromáticos	153
2.2.3 Análisis sensorial	154
2.3 Análisis estadístico	155
3. Resultados	155
3.1 Ensayos de Textura	155
3.1.1 Compresión Uniaxial	155
Deformación a la fractura (ϵ_f)	155
Esfuerzo a la fractura (σ_f)	157
3.1.2 Análisis de Perfil de Textura (TPA)	158
3.2 Parámetros cromáticos	160
3.3 Análisis sensorial	162
4. Discusión	163
5. Conclusiones	170
 CONCLUSIONES DEL TRABAJO DE TESIS	171
 BIBLIOGRAFÍA	176

Índice de Tablas

Introducción

Tabla 1. Consumo per cápita de quesos a nivel mundial en el año 2014.....	3
--	----------

Capítulo 1

Tabla 1.1. Composición química y pH de los quesos de las diferentes tinas de elaboración a los 3 y 90 días posteriores a la elaboración. Para cada variable, se presenta el valor medio \pm desviación estándar de las 4 réplicas de elaboración.....	75
--	-----------

Tabla 1.2. Composición química y pH de los quesos de las 4 elaboraciones realizadas a los 3, 90 y 180 días posteriores a la elaboración.....	76
---	-----------

Capítulo 2

Tabla 2.1. Tratamientos evaluados. Enzima coagulante y temperatura de cocción aplicados en cada tratamiento.....	82
---	-----------

Tabla 2.2. Composición química y pH de los quesos de los diferentes tratamientos (media \pm desviación estándar).....	94
--	-----------

Tabla 2.3. Significancia de los efectos tiempo de maduración (F1), tipo de coagulante (F2) y temperatura de cocción (F3) de los quesos y sus interacciones sobre los resultados de actividad coagulante residual.....	94
--	-----------

Tabla 2.4. Actividad coagulante residual de todos los quesos (valor promedio \pm desviación estándar de las cuatro réplicas de elaboración; $\text{nmol producto h}^{-1} \text{g}^{-1}$) durante el tiempo de maduración. Los valores resaltados muestran que la actividad coagulante residual al final de la maduración fue mayor que en los quesos jóvenes.....	95
---	-----------

Tabla 2.5. Significancia de los efectos tiempo de maduración (F1), tipo de coagulante (F2) y temperatura de cocción (F3) de los quesos y sus interacciones sobre los resultados de las fracciones NS.....	96
--	-----------

Tabla 2.6. Fracciones NS de todos los quesos (valor promedio \pm desviación estándar de las cuatro réplicas de elaboración) durante el tiempo de maduración.....	96
---	-----------

Capítulo 3

Tabla 3.1. Tratamientos evaluados. Presión y tiempos de presurización aplicados en cada tratamiento. C: control; T1 a T4: tratamientos 1 a 4 respectivamente.....	110
Tabla 3.2. Composición química y pH de los quesos (media \pm desviación estándar) y significancia de los factores principales y de sus interacciones.....	119
Tabla 3.3. Actividad de plasmina, plasminógeno y coagulante residual de los quesos (media \pm desviación estándar) y significancia de los factores principales y de sus interacciones.....	125
Tabla 3.4. Nitrógeno soluble (NS-pH 4,6 y NS-TCA) de los quesos (media \pm desviación estándar) y significancia de los factores principales y de sus interacciones	127
Tabla 3.5. Concentraciones individuales de aminoácidos (AA) libres y aminoácidos libres totales (expresados como suma) en los quesos Reggianito (valor medio \pm desviación estándar) y significancia de los factores principales y de sus interacciones.....	134

Capítulo 4

Tabla 4.1. Significancia de los efectos tratamiento y tiempo de maduración de los quesos y sus interacciones sobre los resultados de Compresión Uniaxial.....	156
Tabla 4.2. Significancia de los efectos tratamiento y tiempo de maduración de los quesos y sus interacciones sobre los parámetros del análisis del perfil de textura y valores (promedio \pm desviación estándar de los análisis de las cuatro réplicas de elaboración) en función del tratamiento y del tiempo de maduración.....	159
Tabla 4.3. Significancia de los efectos tratamiento y tiempo de maduración de los quesos y sus interacciones sobre los resultados de los parámetros cromáticos, y valores (promedio \pm desviación estándar de los análisis de las cuatro réplicas de elaboración) en función del tratamiento y del tiempo de maduración.....	161
Tabla 4.4. Suma de los ordenamientos de intensidades para cada atributo evaluado en el análisis sensorial de los quesos controles y tratados con APH, madurados 45 o 90 días.....	162

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1. Agentes proteolíticos que intervienen en la maduración de los quesos.....	13
Figura 2. Sistema de la plasmina en leche.....	15
Figura 3. Esquema general de elaboración y maduración de quesos coagulados enzimáticamente.....	23
Figura 4. Sistema batch de Altas Presiones Hidrostáticas.....	33
Figura 5. Imagen correspondiente al módulo de control del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922.....	34
Figura 6. Imagen correspondiente al módulo de refrigeración marca Euro Chiller, acoplado al equipo APH.....	34
Figura 7. Módulo de presna del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922. a- Cilindro de alta presión encamisado; b- Canasta de aluminio para carga del alimento envasado en el cilindro del equipo APH.....	35
Figura 8. Imagen correspondiente al módulo de servicio del equipo de APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922.....	36

Capítulo 1

Figura 1.1. Tinas paralelas de 5 l de capacidad utilizadas para la elaboración de los quesos en el INLAIN.....	66
Figura 1.2. Esquema del proceso de elaboración de quesos miniatura en el INLAIN..	67
Figura 1.3. Elaboración de quesos en el Área de Procesos del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria. INTA EEA Rafaela.....	68
Figura 1.4. Esquema del proceso de elaboración de quesos en la miniplanta automatizada del INTA	71

Capítulo 2

Figura 2.1. Determinación in vitro del tiempo de coagulación.....	83
Figura 2.2. Esquema de experimental de elaboración en las minitinas (T). CH: quimosina bovina, CA: quimosina de camello.....	84
Figura 2.3. Tiempo de coagulación en función de la concentración de coagulante evaluada. Los valores corresponden al promedio \pm la desviación estándar de las 3 repeticiones efectuadas.....	93
Figura 2.4. Evolución de NS-TCA en función del tiempo de maduración, expresado como porcentaje del N total. Para cada tiempo de maduración, los datos representan el valor promedio para la misma temperatura de cocción, independientemente del tipo de coagulante.....	97
Figura 2.5. Perfiles electroforéticos de los quesos a 1, 50 y 90 días correspondientes a la primera elaboración.....	98
Figura 2.6. Perfiles peptídicos de los quesos a 6, 50 y 90 días de maduración. A) Quesos CA 50 y 56°C.....	99
B) Quesos CH a 50 y 56°C, C) Quesos CA y CH a 50°C.....	100
D) Quesos CA y CH a 56°C.....	101

Capítulo 3

Figura 3.1. a- Introducción de los quesos envasados al vacío en el canasto del sistema APH. b- Carga del canasto en el cilindro de alta presión. c- Quesos luego del tratamiento con APH.....	112
Figura 3.2. Distribución de los quesos por tiempo de maduración y análisis realizado.....	113
Figura 3.3. Evolución de los lactobacilos enumerados en MRS a 45°C expresados en Log ₁₀ UFC/g en función del tiempo de maduración. La primera determinación se realizó a día 1 post tratamiento con APH.....	120
Figura 3.4. Evolución de los lactobacilos enumerados en MRS a 30°C, expresados en Log ₁₀ UFC/g en función del tiempo de maduración. La primera determinación se realizó a día 1 post tratamiento con APH.....	122
Figura 3.5. Diferencia entre el recuento en MRS a 30°C – el recuento en MRS a 45°C expresados en Log ₁₀ UFC/g en función del tiempo de maduración. La primera determinación se realizó a día 1 post tratamiento con APH.....	123

Figura 3.6. Evolución de la flora láctica total (APC leche a 37°C) expresados en Log ₁₀ UFC/g en función del tiempo de maduración. La primera determinación se realizó a día 1 post tratamiento con APH.....	123
Figura 3.7. Evolución de la actividad coagulante residual en función del tiempo de maduración.....	126
Figura 3.8. Evolución del NS-pH 4,6 (a) y del NS-TCA (b) expresados en relación al NT en función del tiempo de maduración. Las flechas señalan el tiempo al cual las muestras tratadas con APH alcanzaron los mismos valores de ambas fracciones solubles que los quesos controles.....	128
Figura 3.9. Perfiles electroforéticos de los quesos a 1, 45 y 90 días de maduración de las elaboraciones 1 (E1) y 2 (E2).....	129
Figura 3.10. Perfiles peptídicos de los quesos a 1, 45 y 90 días de maduración de la elaboración 1 (E1).....	130
Figura 3.11. Análisis de componentes principales de los perfiles peptídicos. Gráfico de scores de las muestras para CP1 vs. CP2. Los óvalos naranja y rojo engloban las muestras de quesos tratados a 400 MPa (T3 y T4), de 45 y 90 días respectivamente. Los óvalos celeste y azul engloban las muestras de quesos controles y tratados a 100 MPa (C, T1 y T2), de 45 y 90 días respectivamente.....	132
Figura 3.12. Análisis de componentes principales de los perfiles peptídicos. Gráfico de loading de las variables para CP1 vs. CP2. Las clases de tiempo de retención (c) fueron numeradas en orden correlativo y tuvieron los siguientes tiempos de retención: c1: 4,30 min, c2: 8,45 min, c3: 12,60 min, c4: 16,75 min, c5: 20,90 min, c6: 25,05 min, c7: 29,20 min, c8: 33,35 min, c9: 37,50 min, c10: 41,65 min, c11: 45,80 min, c12: 49,95 min, c13: 54,10 min, c14: 58,25 min, c15: 62,4 min, c16: 66,55 min, c17: 70,70 min, c18: 74,85 min, c19: 79,00 min.....	133
Figura 3.13. Evolución del perfil de aminoácidos libres individuales con el tiempo de maduración. Se excluye de la Figura al ácido aspártico (Asp), debido a que presentó diferencias entre tratamientos. Los valores se expresan en mg/100 g de queso.....	135
Figura 3.14. Evolución de los aminoácidos libres totales en función del tiempo de maduración. Las flechas señalan el tiempo al cual las muestras tratadas con APH alcanzaron los mismos valores de aminoácidos libres totales que los quesos controles.....	135

Capítulo 4

Figura 4.1. Toma de muestras para los ensayos de compresión uniaxial y análisis de perfil de textura (TPA).....	148
Figura 4.2. Analizador de textura Stable Micro Systems modelo TA.XTplus utilizado para los ensayos de compresión uniaxial.....	149
Figura 4.3. Esquema de una curva de compresión uniaxial a velocidad de deformación constante. Identificación de los parámetros evaluados.....	151
Figura 4.4. Curva TPA obtenida a partir del analizador de textura marca Stable Micro System modelo TA.XTplus.....	152
Figura 4.5. Evolución de la Deformación a la fractura (ε_f) durante el tiempo de maduración de los quesos control y tratados. Cada punto representa un valor promedio de las 4 réplicas de elaboración. La primera determinación de todas las muestras, correspondió al día 1 post tratamiento con APH.....	157
Figura 4.6. Evolución del esfuerzo a la fractura (σ_f) durante el tiempo de maduración de los quesos control y tratados con APH. Cada punto representa un valor promedio de las 4 réplicas de elaboración. La primera determinación de todas las muestras, corresponde al día 1 post tratamiento con APH.....	158

Abreviaturas

Generales

a.C.: antes de Cristo

AA: aminoácidos

AGL: ácidos grasos libres

AMC: 7-amino-4-metil cumarina.

ANOVA: Análisis de la varianza.

APC: Agar para recuento en placa (por sus siglas en inglés: agar plate count)

APH: Altas Presiones Hidrostáticas

BS: base seca

CCA: Código Alimentario Argentino

CEP: proteinasas de pared extracelulares (por sus siglas en inglés cell-envelope proteinase.)

CP: Componente principal.

d.C.: después de Cristo

E: Escherichia

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

FIL: Federación Internacional de Lechería

hs: horas

IDF: International DairyFederation.

IMCU: Internacional Milk-Clotting Unit

INLAIN: Instituto de Lactología Industrial

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IRAM: Instituto Argentino de Metrología

ISO: Organización Internacional de Normalización (por sus siglas en inglés International Organization for Standardization)

Lb: Lactobacillus

Log: logaritmo

MAGyP: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca

MG: materia grasa

min: minutos

MPa: mega pascal

MRS: De Man, Rogosa y Sharpe (medio de cultivo para recuento de lactobacilos)

NaCl: cloruro de sodio

NSLAB: bacterias lácticas no pertenecientes al fermento primario (por sus siglas en inglés non starter lactic acid bacterias)

NS-pH 4,6: nitrógeno soluble a pH 4,6

NS-PTA: nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico

NS-TCA: nitrógeno soluble en ácido tricloroacético

NT: nitrógeno total

°D: grados Dornig

P.: Penicillium

PC/s: componente/s principal/es (por sus siglas en inglés principal component)

PCA : análisis de componentes principales (por sus siglas en Inglés principal component analysis)

Pymes: Pequeñas y medianas empresas

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

S.: Staphylococcus

Seg: segundos

TPA: análisis de perfil de textura (por sus siglas en inglés Texture Profile Analysis)

UFC: unidades formadoras de colonias

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

UV: Ultravioleta

Específicas del Capítulo 2:

CA-50°C: quesos elaborados con quimosina de camello y temperatura de cocción de 50°C

CA-56°C: quesos elaborados con quimosina de camello y temperatura de cocción de 56°C

CH-50°C: quesos elaborados con quimosina bovina y temperatura de cocción de 50°C

CH-56°C: quesos elaborados con quimosina bovina y temperatura de cocción de 56°C

Específicas de los capítulos 3 y 4

C: quesos controles (no tratados con APH)

T1: quesos tratados con APH a 100 MPa durante 5 min

T2: quesos tratados con APH a 100 MPa durante 10 min

T3: quesos tratados con APH a 400 MPa durante 5 min

T4: quesos tratados con APH a 400 MPa durante 10 min

Específicas del capítulo 4:

ϵ_f : Deformación a la fractura

σ_f : Esfuerzo a la fractura

Nomenclatura de Aminoácidos:

Ala: alanina

Arg: arginina

Asp: ácido aspártico

Cys: cisteína

Glu: ácido glutámico

Gly: glicina

His: histidina

Ile: isoleucina

Leu: leucina

Lys: lisina

Met: metionina

Phe: fenilalanina

Pro: prolina

Ser: serina

Thr: treonina

Trp: triptófano

Tyr: tirosina

Val: valina

INTRODUCCIÓN

1. La Argentina como país quesero

Un poco de historia

En Argentina, antes de 1850 se registran pocos datos sobre la producción quesera nacional. Existen registros del año 1617, en el que se destaca una rudimentaria actividad quesera, de la mano de los jesuitas, quienes introdujeron en las comunidades indígenas la cultura de consumo de leche y quesos. En 1788 aparece la actividad lechera como alternativa a la poca rentabilidad de los chacareros cercanos a la villa de Buenos Aires por venta de carne y cuero (actividad principal de la economía rioplatense). Recién a partir de mediados del siglo XIX se produjo un gran desarrollo de la quesería argentina, impulsada por inmigrantes europeos que aportaron sus tecnologías principalmente italianas, españolas, suizas, etc. Fue en esa época cuando apareció el queso Carcarañá (el más antiguo de los quesos argentinos), el queso Tafí de Tucumán, el queso Chubut, el queso Goya, el queso Peregrina, el queso Chinchilla, el queso Las Peñas, el queso Oriental, el queso Mar del Plata, el queso Manantial Tandilera, el queso Neuquén fresco, el queso Pategrás, el queso Río Cuarto, el queso Lobos, el queso Lehmann y muchos otros con nombres autóctonos nacionales. Asimismo comenzaron a elaborarse quesos con nombres alusivos a regiones europeas de donde provenían los inmigrantes (Castañeda y col., 2010; <http://www.quesosargentinos.gov.ar>).

La industria quesera actual

En la Argentina los quesos constituyen el principal producto derivado de la industrialización de la leche, superando ampliamente a los demás productos lácteos. En el año 2012, según las estadísticas del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGyP 2012), el mayor volumen de la leche producida en Argentina se destinó a la producción de quesos, lo que representó alrededor del 32 % de producción total; un 17% se destinó a la elaboración de leche en polvo, y el resto a otros productos lácteos (leche fluida, crema, manteca, dulce de leche, postres, yogures, etc.). Del porcentaje de quesos producido, un 4% se destinó a queso duro, un 11% a queso semiduro, un 16% a queso blando y un 1% a queso fundido. En total, se produjeron 563943 toneladas de queso, la mayor parte de los cuáles se destinó al consumo local. Aproximadamente un 10% del total producido fue exportado en ese año (60642 toneladas).

Es importante situar estas cifras en el contexto mundial: Argentina ha ocupado por los últimos 10 años, un lugar entre los principales 15 países productores de queso, y en cuanto a consumo interno, se encuentra por debajo de países de arraigada tradición quesera como Francia, Italia, Grecia y España, y de Estados Unidos, pero muy por encima de economías de dimensión comparable, y supera notablemente a los demás países de Latinoamérica donde la incorporación de queso en la dieta es más reciente (Tabla 1).

Tabla1. Consumo per cápita de quesos a nivel mundial en el año 2014

País	Consumo per cápita (kg/año) 2014
Unión Europea	17,26
Estados Unidos	15,18
Argentina	11,92
Canada	11,34
Australia	10,03
Nueva Zelanda	8,57
Rusia	4,69
Brasil	3,74
Mexico	2,98
Japón	2,20
Ukraine	1,96
Taiwan	1,15
Filipinas	0,15

Fuente: http://www.clal.it/en/?section=tabs_consumi_procapite

Nota: en la tabla, el consumo per cápita de cada país fue obtenido dividiendo el total de consumo (fuente FAS-USDA) por el número de habitantes (fuente FAO). Si en lugar de considerar a la Unión Europea íntegra se consideran los países por separado, como Grecia, Francia, Malta, Alemania, Austria, Chipre, el consumo per cápita en ellos es de 37,4, 23,6, 22,5, 20,6, 18,0 y 16,6 kg/ año respectivamente. (fuente: www.apymel.com.ar/novedadesDetalle.php)

Entre las empresas lácteas, las empresas queseras son las que presentan el mayor número de Pymes, ya que la tecnología quesera es más fácilmente apropiable por empresas de tamaño pequeño o mediano que otras líneas lácteas. En la provincia de Santa Fe, se procesan diariamente aproximadamente 9 millones de litros de leche, en

151 empresas lácteas. De ese total, aproximadamente 100 son Pymes queseras, que procesan el 20% de la leche total. Junto a las empresas grandes del sector, constituyen un aporte significativo a la economía y el empleo en la región central de la Argentina (Terán, 2009).

El Código Alimentario Argentino (CAA) define al queso como “el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes. A su vez hace una diferencia entre el Queso Fresco, que está listo para el consumo poco después de su fabricación, y el Queso Madurado, que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso (CAA, ANMAT, 2014).

2. El queso como alimento: generalidades y origen

Mientras que la legislación Argentina define al producto queso por la negativa, al explicarlo como el resultado de la eliminación del suero, muchos ejemplos en la literatura técnica y científica establecen que la denominación de queso hace referencia a un conjunto de productos lácteos fermentados que se obtienen en todo el mundo en una amplia variedad de formas, flavour y texturas (Fox, 2000). Se cree que en la actualidad, existen más de 1000 variedades de quesos en todo el mundo (Beresford y col., 2001; Fox y McSweeney, 2004). Los primeros quesos se elaboraron en Asia, en la zona de la Mesopotamia, entre los ríos Tigris y Éufrates, en lo que actualmente es Irak, hace unos 9000 años, durante la llamada Revolución Agrícola Neolítica. En ese período se desarrolló la agricultura y se domesticaron los primeros animales. Las primeras hembras lecheras domesticadas fueron las cabras y las ovejas, y los primeros quesos se elaboraron con leche de este origen. Las vacas, que fueron domesticadas poco después, rápidamente las reemplazaron como productoras de leche en aquellos lugares donde era posible su cría, por los mayores rendimientos (Nantet, 1994; Fox y col., 2000). El

primer producto lácteo fermentado probablemente fue consecuencia de la acidificación debida al desarrollo de bacterias lácticas, que produjeron ácido en cantidad suficiente para reducir el pH de la leche hasta el punto isoeléctrico de las caseínas, causando que las mismas coagulen (Fox y col., 2000; Fox y McSweeney, 2004). Por otra parte, en forma contemporánea, la leche se almacenaba en recipientes hechos de pieles, vejigas o estómagos de animales. Se cree que la coagulación enzimática fue consecuencia del almacenamiento de leche en odres hechos con estómagos de terneros o cabritos. Aunque el cuajo de animales fue utilizado desde épocas remotas, es probable que también en la antigüedad se utilizaran cuajos de plantas, como por ejemplo el proveniente del cardo (Fox y col., 2000; Fox y McSweeney, 2004). Existen vestigios arqueológicos de cerámicas diseñadas para elaborar queso, para eliminar suero, y frescos que muestran las elaboraciones de quesos, realizadas entre los años 5000 y 2000 a.C. Merecen ser citadas las vasijas con alimentos similares a quesos en las tumbas de algunos faraones, y el friso egipcio existente en el museo de Louvre, en París, en el cual se ve a un hombre ordeñando desde el costado de un animal (Castañeda y col., 2010). En el antiguo testamento, existen varias referencias al queso, tales como en Job (1520 a.C.) y Samuel (1017-1170- a.C.). La mitología de la Antigua Grecia, atribuía a Aristeo el descubrimiento del queso. En la Odisea de Homero (800 a 701 a.C.) se describe a un Cíclope haciendo y almacenando quesos de oveja y cabra, queso que podría haber sido el antecesor del queso Feta (Scott, 1998; Fox y col., 2000; Fox y McSweeney, 2004).

La posibilidad de convertir los principales componentes de la leche en queso, tuvo varias ventajas, entre las que se destaca la estabilidad de los componentes, el fácil transporte y la contribución a la diversificación de la dieta humana, expandiéndose rápidamente al Medio Oriente, Egipto, Grecia y Roma. En los tiempos de la Antigua Roma era un alimento que se consumía a diario, y su proceso de fabricación no distaba demasiado a como se hace actualmente fuera del ámbito industrial. En el *Re Rustica* de Columela (cerca del 65 d. C.) se detalla la fabricación de quesos con procesos que comprenden la coagulación con fermentos, presurización del cuajo, salado y curado (Scott, 1998; Fox y col., 2000)

El comercio de quesos entre países, especialmente el de las rutas marinas, llegó a ser tan grande que el emperador romano Diocleciano (284-305 d.C.) fijó precios máximos para los quesos. Entre dichos quesos estaba el Lunar, una variedad especial de queso con su propia marca comercial, los “cuernos de la Luna” que más tarde se hizo

popular bajo el nombre de queso Parmesano (Scott, 1998). Las grandes migraciones de los pueblos a lo largo de Europa después de la caída del Imperio Romano, promovieron la difusión de la fabricación del queso. Un ejemplo es la migración de la tribu Helvética, que se estableció en las regiones de los Alpes suizos, y de cuya artesanía surgió toda una familia de quesos, entre ellos el queso Emmental (Scott, 1998). Es en Europa, particularmente en Italia, Francia, España, Suiza, Alemania e Inglaterra donde los quesos se desarrollan fuertemente. La emigración geográfica de la quesería, fue causa del resurgimiento de nuevas variedades de queso debidas a las diferencias climáticas y del terreno, que influían en el tipo de animal que se criaba (principalmente cabra y oveja en las regiones montañosas, y vacas en las llanuras). Durante la edad media, los monasterios fueron los principales contribuyentes al avance de la agricultura en Europa, posibilitando al desarrollo y la mejora de alimentos como el vino, la cerveza y el queso. Los monjes Benedictinos fueron los que iniciaron el camino de la creatividad en los quesos, agregándole el añejamiento y convirtiendo su elaboración en un refinado arte (Scott, 1998; Fox y col., 2000). El movimiento de los monjes entre los monasterios también contribuyó a la difusión de diferentes variedades de queso. También las grandes propiedades feudales de la edad media contribuyeron al desarrollo de los quesos. Dentro de las mismas, los individuos adquirieron habilidades especiales que fueron transmitidas a las generaciones futuras. Inicialmente, las principales variedades de quesos se elaboraban en regiones limitadas, principalmente en zonas montañosas (Fox y McSweeney, 2004). La producción localizada de ciertas variedades de quesos, fue protegida por los reyes a través de las denominaciones de origen. La regionalización de ciertas variedades de quesos, fue particularmente marcada en España, Francia e Italia, donde una gran variedad de quesos se producían en regiones muy limitadas (Fox y col., 2000). Por último, aproximadamente a partir del año 1400, los quesos fueron introducidos en América, en Oceanía y en África por medio de colonizadores Europeos, que llevaron con ellos su artesanía quesera.

La elaboración de los quesos se mantuvo como una actividad artesanal hasta el siglo XIX, cuando el microbiólogo Luis Pasteur descubrió la pasteurización, lo cual cambió el proceso de elaboración de quesos. Con la adquisición gradual de conocimientos sobre química y microbiología de la leche y el queso, se hizo posible ganar más control sobre el proceso de fabricación del queso, y se mejoró la calidad de los mismos. A partir del siglo XX, los avances en la tecnología permitieron un

desarrollo muy importante en la industria quesera a gran escala (Fox y col., 2000; Fox y McSweeney, 2004; Castañeda y col., 2010).

3. El queso Reggianito Argentino

El queso Reggianito es el queso duro más importante de nuestro país. Sus antecedentes son los quesos duros italianos Parmigiano Reggiano y Grana Padano. La tecnología de elaboración de este queso es una adaptación de aquella incorporada a través de los inmigrantes italianos, que arribaron a nuestro país a finales del siglo XIX e inicios del siglo XX (Zalazar y col., 1999). La tecnología fue modificada y adaptada a los materiales y a las condiciones medioambientales locales, para dar un producto que hoy se considera distinto, con características diferentes de las variedades originales (Zannoni y col., 1994). Es más húmedo, más graso y de tiempo de maduración más corto que los quesos de pasta dura italianos; suele ser también más salado. Además, su formato de comercialización es sustancialmente menor que el de aquellos (Zalazar y col., 1999). Durante el año 2013, se exportaron 5517 toneladas de queso de pasta dura lo que representó un ingreso total de aproximadamente 38 millones de dólares. En ese año, los principales destinos de los quesos de pasta dura fueron Brasil, Rusia, EE.UU., Chile y Venezuela (MAGyP, 2014).

Según el Código Alimentario Argentino (art. 635), el queso Reggianito es un queso madurado que se obtiene por coagulación de la leche por medio del cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas, complementada por la acción de bacterias lácticas específicas. Debe contener materia grasa láctea en un mínimo de 32% p/p (en base seca) y humedad hasta 36% p/p. Además, el queso debe responder a las siguientes características: la consistencia dura, la textura compacta, quebradiza y granulosa; color blanco amarillento, ligeramente amarillento; el sabor salado y levemente picante; el olor característico y la corteza lisa, consistente, bien formada, cubierta con revestimientos apropiados, adheridos o no; sin ojos, aunque eventualmente podrá poseer algunos ojos pequeños o aberturas mecánicas; el peso se encuentra en un rango entre 5 a 10 kg; deberá ser madurado para lograr sus características específicas, por lo menos 6 meses para quesos de 5 a 10 kg (CAA, ANMAT, 2014).

Tradicionalmente, para la elaboración de queso Reggianito, se utiliza fermento natural de suero, también denominado suero fermento. Para la preparación de este

cultivo iniciador, un volumen definido de suero se recupera directamente de la tina quesera a 52°C luego de la etapa de cocción, y se incuba a temperatura que favorece el desarrollo de bacterias termófilas, durante un tiempo variable, entre 18 y 24 hs (Gallino, 1994). En ocasiones el suero se saca a 52- 54°C y se deja a temperaturas decrecientes hasta alcanzar la temperatura ambiente, en otros casos se conserva en fermentadores a temperatura constante. El tiempo de incubación generalmente es el que media entre dos elaboraciones. La composición microbiológica de los fermentos naturales es muy compleja, y puede ser fácilmente afectada por las condiciones ambientales o la tecnología de elaboración (Hynes y col., 2003). Una de las características distintivas del queso Reggiano Argentino, es la microflora presente en el suero fermento. Los cultivos de nuestra región (Santa Fe, Argentina), están compuestos por un 66% de cepas de *Lactobacillus helveticus* y un 33% de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (Reinheimer y col., 1996; Meinardi y col., 2002), mientras que los cultivos italianos muestran algunas diferencias en cuanto a la composición microbiana: las cepas más comunes son *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* algunas veces acompañadas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus fermentum* y *Streptococcus thermophilus* (Reinheimer y col., 1995). El uso de fermento natural de suero tiene las ventajas de contribuir al flavour y aroma típico de este tipo de queso, son fáciles de preparar y son resistentes al ataque de fagos debido a que son muticepas (Botazzi y col., 1992; Giraffa y col., 1997). Sin embargo, poseen algunas desventajas, ya que las variaciones en su composición microbiológica pueden llevar a inconstancia en el perfil sensorial de los quesos (Reinheimer y col., 1995; Reinheimer y col., 1996). Es por ello que, actualmente, es común el uso de fermentos seleccionados de *Lb. helveticus* especialmente en las plantas queseras grandes y medianas (Candiotti y col., 2002; Perotti y col., 2004). Debido a que la tecnología de elaboración de Reggiano requiere de una acidificación inicial de la leche de elaboración, lo que en los quesos elaborados de manera tradicional aporta directamente el suero fermento, cuando éste es reemplazado por cultivos concentrados – liofilizados o congelados – debe acompañarse de una acidificación previa de la leche. Por lo general, se combina la utilización de fermentos seleccionados de adición directa con el uso de ciertos ácidos orgánicos, como láctico o cítrico, de acidógenos como la glucono daltalactona (GDL), o el burbujeo directo de

CO₂, con el objetivo de acercar el pH de la leche al pH óptimo de coagulación de este tipo de queso.

El queso Reggianito se elaboró inicialmente con cuajo de ternero, producido localmente. Durante el siglo XX, comienza a utilizarse principalmente coagulante de bovino adulto como sustituto para compensar la escasez y el alto precio del coagulante de ternero mamón. A partir de la década de los '90 del siglo pasado, la quimosina bovina producida por fermentación de organismos modificados genéticamente se convierte en el principal coagulante utilizado por la mayoría de las queserías, especialmente para variedades de queso de alto valor agregado. Los “cuajos microbianos”, enzimas proteasas naturalmente producidas por hongos, y el cuajo de bovino adulto, son aun comúnmente usados en la Argentina para quesos de menor precio, como el Cremoso. Más recientemente, Kappeler y col. (2006) lograron expresar el gen de la quimosina de camello (*Camelus dromedarius*) en *Aspergillus niger*, y producir esta enzima por fermentación. Este coagulante ha sido incorporado extensamente en el mercado en diferentes países productores de quesos, incluso la Argentina. La estrategia de mercadeo de esta nueva enzima apunta a su alta actividad coagulante y baja actividad proteolítica general comparado con la misma enzima de origen bovino (Kappeler y col., 2006, Jensen y col., 2013). Sin embargo, en Argentina el coagulante de camello se ha introducido para la elaboración de queso Reggianito sin contar con investigaciones previas acerca de su desempeño en este tipo de queso.

El queso Reggianito es una variedad de pasta dura cocida, lo que lo diferencia de otras variedades como el Cheddar, que si bien contienen baja humedad, no pasan por una etapa de cocción. El tratamiento térmico del Reggianito incluye dos etapas, una primera rampa de calentamiento a una velocidad de 0,5°C por minuto hasta llegar a 42-45°C, permaneciendo a esa temperatura por aproximadamente 15 min (etapa de secado), seguida de un calentamiento rápido hasta temperaturas que llegan a los 52-54°C, permaneciendo a esa temperatura por menos de 5 min (etapa de cocción). Luego de la cocción, el suero se drena y se hace presión sobre la cuajada para eliminar aberturas (etapa de pre-prensado de la masa). La cuajada luego es ubicada en moldes adecuados, de acero inoxidable o de plástico microperforado (Polietileno de Alta Densidad o Polipropileno Copolímero). El prensado se lleva a cabo durante 24 hs con volteo de las hormas, es decir, se toma el molde y se da vuelta la horma para que reciba igual presión en ambas caras. Transcurrido este tiempo, los quesos se dejan orear 24 hs y finalmente

se salan por inmersión en salmuera, a razón de un día por kg de peso. La maduración se lleva a cabo en cámara a una temperatura entre 10 y 15 °C, con una humedad del 85%, y el tiempo mínimo es de 6 meses (CAA, artículo 635, Gallino, 1994; Zalazar y col., 1999; Candiotti y col., 2002; Meinardi y col., 2002; Perotti y col., 2004; Sihufe y col., 2012).

4. La maduración del queso

4.1. Transformaciones bioquímicas de la maduración

La maduración, que insume tiempo y recursos, es necesaria para lograr que el queso desarrolle su aroma, sabor y textura, ya que las cuajadas recién elaboradas y los quesos jóvenes carecen de estas preciadas características (McSweeney, 2004; Zalazar y col., 2006a; McSweeney, 2011). La transformación es debida fundamentalmente a cambios bioquímicos, casi todos de naturaleza enzimática, que se llevan a cabo sobre los principales componentes de la leche que han sido retenidos en la cuajada: lactosa, materia grasa y proteínas. Estos cambios están acompañados por otros de naturaleza exclusivamente física, que ocurren simultáneamente y en cierta forma determinan las condiciones para que sucedan los primeros. Se trata de procesos de difusión de sal y de pérdida de humedad (Fox y McSweeney, 1998). Asimismo, se han informado algunos cambios netamente químicos, como los equilibrios químicos del calcio, y reacciones químicas no catabolizadas por enzimas, fenómenos que han sido mucho menos estudiados (Walstra y col., 2001)

El metabolismo de la lactosa en el queso juega un rol importante aunque la concentración de este azúcar en la cuajada sea muy baja desde el principio de la maduración. En efecto, la mayor parte se elimina con el suero (aproximadamente el 98%), y queda en la cuajada únicamente la lactosa disuelta en la fase acuosa, que metabolizan las bacterias lácticas del fermento, produciendo ácido láctico (McSweeney, 2004; McSweeney y Fox, 2004; Zalazar y col., 2006a; McSweeney, 2011). La lactosa residual presente en los quesos luego de las 24 hs de elaboración, va del 3 al 0,8%, según la variedad de queso. Estas pequeñas cantidades residuales pueden influir en fenómenos clave de la calidad del producto, como post acidificación o formación de compuestos volátiles. Por esta razón, el correcto desarrollo de la fermentación láctica es

un aspecto crucial de la elaboración de quesos (McSweeney y Fox, 2004; McSweeney, 2011).

Por otro lado, el lactato proveniente de la fermentación también puede sufrir transformaciones durante la maduración. Las bacterias ácido lácticas del fermento producen, en general, L-lactato, que puede ser isomerizado a D-lactato, reacción que se atribuye la mayor parte de las veces a las bacterias no fermento, denominadas NSLAB por sus siglas en inglés (Non Starter Lactic Acid Bacteria). En los quesos que contienen bacterias propiónicas u hongos, el lactato es un importante sustrato que determina la calidad y características específicas de los productos (McSweeney, 2004).

En cuanto al citrato, el 90% del mismo se pierde en el suero (Fox y col., 2000; McSweeney 2004; Zalazar y col., 2006a). El citrato que queda remanente, es de gran importancia para el desarrollo del flavour, dado que puede ser metabolizado por las bacterias citrato positivas generando compuestos volátiles que suman al flavour del queso (Fox y col., 2000; Quintans y col., 2008; McSweeney, 2011).

La lipólisis refiere a un conjunto de reacciones de hidrólisis de los triacilglicerolos para dar di o monoacilglicerolos, ácidos grasos libres (AGL) y glicerol, y es un fenómeno minoritario en la mayoría de las variedades de queso. Sólo en algunas variedades como quesos madurados por hongos y en menor medida en quesos duros, es un fenómeno importante (McSweeney, 2004). En los quesos duros de pasta cocida la degradación de los triglicéridos para dar ácidos grasos libres y sus derivados es significativa, probablemente debido al largo periodo de maduración, que permite la expresión de la actividad lipolítica relativamente débil que está presente en el queso (Gobetti y DiCagno, 2003). La lipólisis así desarrollada es una transformación necesaria para la formación del flavour genuino de este tipo de producto, en el que los AGL influyen directamente, especialmente los de cadena corta, que son volátiles. Los AGL pueden ser transformados por microorganismos en otros compuestos que impactan más fuertemente en el flavour, como las metilcetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehídos (Sousa y col. 2001; Perotti y col., 2005; Vélez, 2013)

La degradación de las proteínas que conforman la matriz proteica del queso, y la posterior hidrólisis de los péptidos provenientes de dicha transformación constituyen el conjunto de reacciones cuantitativamente más importante durante el período de

maduración y almacenamiento del queso y se conocen globalmente como proteólisis (Fox y col., 1993; Gobetti y DiCagno, 2003; O'Mahony y col., 2005). La presente tesis se enfoca en fenómenos proteolíticos durante la maduración de queso Reggianito, razón por la cual a continuación se dedica un apartado a este conjunto de transformaciones bioquímicas.

4.2. Proteólisis

Las reacciones que se agrupan bajo el título de proteólisis están vinculadas a distintos aspectos relacionados con la calidad del queso. En primer lugar, la textura y las propiedades de fractura parecen estar relacionadas al grado de hidrólisis de las proteínas, que a su vez impacta en su capacidad de ligar agua, aunque el equilibrio salino de los minerales de calcio -presentes en cantidades significativas en el queso – también ha sido señalado como un factor muy importante para determinar la estructura del alimento (Lucey y col., 2003; Hassan y col., 2004; O'Mahony y col., 2005). Por otra parte, la proteólisis y peptidólisis proveen los principales sustratos para la bioformación de aroma y sabor en queso (Sousa y col., 2001; Upadhyay y col., 2004; McSweeney, 2011).

4.2.1 Principales agentes proteolíticos que intervienen en la maduración de los quesos

Durante la maduración de los quesos, la proteólisis es catalizada por enzimas que provienen de distintas fuentes: enzimas del coagulante (quimosina, pepsina), de la leche (especialmente plasmina), del fermento primario y secundario, y de las NSLAB (Sousa y col., 2001, Upadhyay y col., 2004). En la Figura 1 se muestran los principales agentes proteolíticos que intervienen durante la maduración de los quesos.

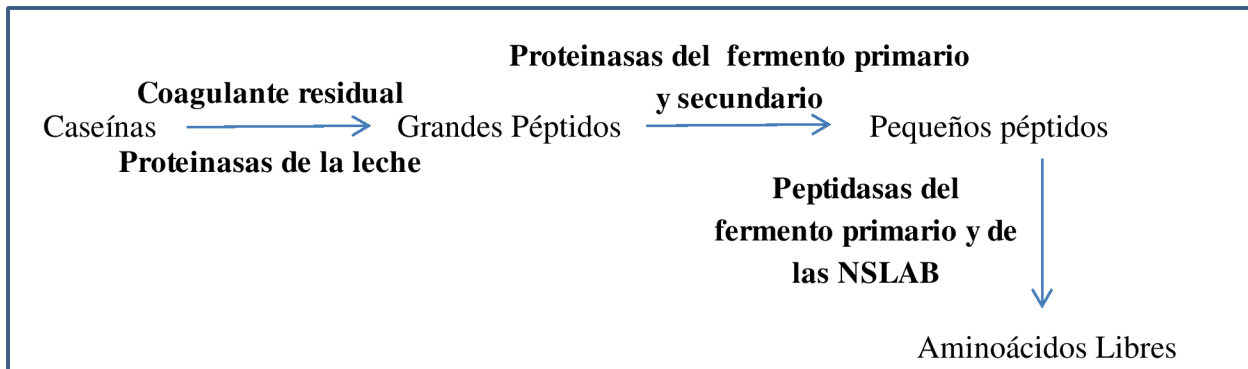


Figura 1. Agentes proteolíticos que intervienen en la maduración de los quesos (adaptado de Sousa y col., 2001).

Coagulante Residual

Las enzimas coagulantes son proteasas aspárticas, generalmente de origen animal, que se utilizan para coagular la leche durante la elaboración del queso. El principal rol del coagulante en la elaboración de quesos es hidrolizar específicamente el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína presente en la superficie de las micelas de caseínas, el cual es muchas veces más susceptible a la quimosina que cualquier otro enlace presente en todas las proteínas de la leche (Fox y col., 2000). Dicha hidrólisis desestabiliza la suspensión coloidal de micelas y provoca la coagulación (Dalglish y Corredig, 2012).

Además de esta propiedad tecnológica principal, la enzima coagulante residual es uno de los agentes proteolíticos que contribuye a la proteólisis durante la maduración en la mayoría de los quesos, particularmente en variedades con una cocción baja o media (Fox, 2003). La mayor parte del coagulante se pierde en el suero durante la elaboración. Sin embargo, un porcentaje variable del mismo (entre 0-30%) se retiene en la cuajada, lo que depende del proceso de elaboración del queso (pH del desuerado, temperatura de cocción, humedad de la cuajada) y del tipo de enzima (Sousa y col., 2001; McSweeney, 2004; Upadhyay y col., 2004; Bansal y col., 2007; Sheehan y col., 2007; Yegin y Dekker, 2013).

Durante la maduración del queso, el coagulante actúa fundamentalmente sobre la caseína α_{s1} , hidrolizando el enlace Phe₂₃-Phe₂₄ para dar los péptidos α_{s1} (f1-23) y α_{s1} (f24-199) o α_{s1} -I (Carles y Ribadeau-Dumas, 1985, McSweeney, 2004). También actúa en menor grado sobre la caseína β , cerca de la región hidrofóbica C-terminal, generando

péptidos cortos, los cuáles se relacionan con sabor amargo en los quesos (McSweeney, 2004). Las caseínas α_{s2} y κ son resistentes a la acción de la enzima coagulante durante la maduración (Fox, 1989).

Los aportes del coagulante residual a la proteólisis durante la maduración de quesos han sido parcialmente dilucidados para algunas variedades de queso, pero se conocen poco para los quesos duros de pasta cocida. En este sentido, Delacroix-Buchet y Fournier (1992) demostraron en queso Gruyere hidrólisis de la caseína α_{s1} tanto a 52 como a 56°C, lo que indicaría actividad del coagulante residual a esas temperaturas. Asimismo, Hayes y col (2002) verificaron en quesos Suizos, en los cuáles se aplicó una temperatura de cocción elevada (53°C durante 30 min), actividad coagulante residual, al igual que hidrólisis de la caseína α_{s1} . Kindstedt y col. (1995) encontraron que la proteólisis se hacía más lenta en Mozzarella cuando se reducía la dosis de quimosina usada en la elaboración, lo que sugiere que el cuajo estuvo activo a pesar de las altas temperaturas de cocción. Sin embargo, otros autores han postulado que el péptido $\alpha_{s1}(f24-199)$ es producido por la quimosina, pero antes de la etapa de cocción de la cuajada, en la tina durante la elaboración (Chianese y col., 1997, Gaiaschi y col., 2000). Asimismo, otra hipótesis da cuenta de que la enzima coagulante residual contribuye a la proteólisis de queso Reggianito, probablemente debido a una reactivación, y es al menos parcialmente responsable de la hidrólisis de la caseína α_{s1} durante la maduración de quesos de pasta cocida (Hynes y col., 2004a).

Debido a que la acción hidrolítica del coagulante residual se ejerce principalmente sobre la caseína α_{s1} , seguida de la caseína β , para dar péptidos medianos y grandes, su impacto en el flavour se considera secundario. Sin embargo, actividades muy elevadas de la enzima han sido relacionadas con el defecto de sabor amargo, originado por péptidos provenientes de la región hidrofóbica de la molécula de caseína β (Fox y col., 2000; Sousa y col., 2001). Por otra parte, el coagulante actúa como proveedor de péptidos medianos. Estos péptidos son luego utilizados por el sistema proteolítico de las bacterias lácticas del fermento a otros más pequeños y aminoácidos libres que contribuyen directa o indirectamente al flavour y aroma del producto terminado durante la maduración (Fox, 1989; Visser, 1993; Sousa y col., 2001; Hynes y col., 2004b; O'Mahony y col., 2005, Milesi y col., 2008a). Los aminoácidos no constituyen fuente de flavour por sí mismos (Wallace & Fox, 1997) pero son

precursores de compuestos volátiles que mayoritariamente constituyen el flavour del queso (Yvon, 2006).

Enzimas provenientes de la leche: Plasmina

La plasmina es una enzima de origen sanguíneo y constituye la principal proteasa natural de la leche. Su pH óptimo es de alrededor 7,5 y tiene una alta especificidad hacia las uniones peptídicas que poseen residuos de lisina (Kelly and McSweeney, 2003). Forma parte de un sistema complejo, que está constituido por la plasmina propiamente dicha, sus inhibidores, el plasminógeno o precursor inactivo, activadores del plasminógeno e inhibidores de los activadores del plasminógeno. En la Figura 2 se detalla el sistema complejo del que forma parte la plasmina en la leche.

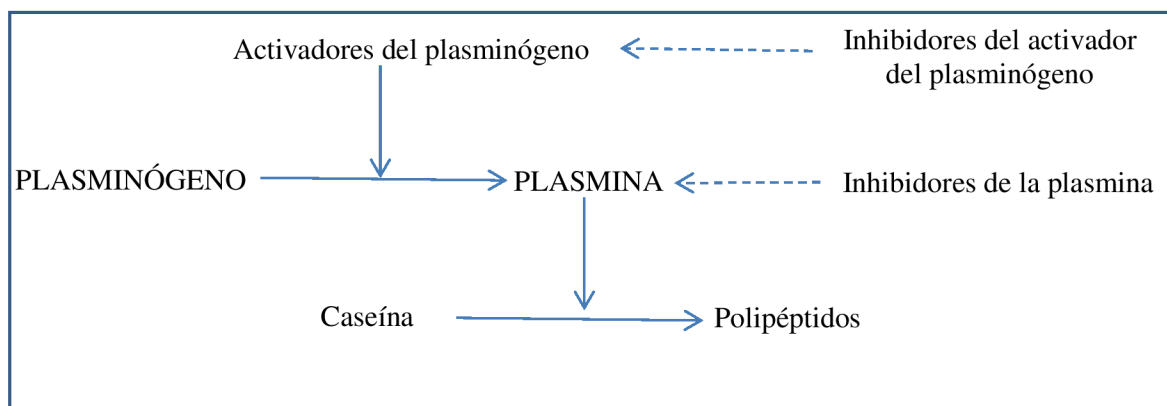


Figura 2. Sistema de la plasmina en leche (adaptado de Upadhyay y col., 2004)

La plasmina, el plasminógeno y el activador del plasminógeno se hallan asociados con las micelas de caseína y quedan retenidos en la cuajada durante la elaboración de los quesos. Los otros componentes (los inhibidores) se encuentran en el suero y son removidos durante su separación de la cuajada (McSweeney, 2004; Ismail y Nielsen, 2010). Se ha encontrado que tanto el agregado de cloruro de sodio como la acidificación de la leche reducen las interacciones entre la plasmina y el plasminógeno con las micelas de caseína (Grufferty y Fox, 1988). Los sustratos preferenciales de la plasmina son las caseínas β y la α_{S2} . A partir de la hidrólisis por esta enzima de la caseína β en los enlaces $Lys_{28}-Lys_{29}$, $Lys_{105}-His_{106}$ y $Lys_{107}-Glu_{108}$, se generan los fragmentos C-terminales denominados γ_1 , γ_2 y γ_3 (Rampilli y Raja, 1998; Sousa y col., 2001). Una característica de esta enzima, es su estabilidad al calor: se requiere una

temperatura de 80°C durante 10 min para producir una inactivación total de la enzima (Somers y Kelly, 2002). En los quesos, la plasmina es una de las enzimas responsables de la proteólisis primaria durante la maduración. Ciertas variables, como la temperatura de cocción de la cuajada y el pH alcanzado durante la elaboración, el lavado y el hilado de la cuajada, condicionan la actividad de la plasmina en la masa del queso y consecuentemente el grado de hidrólisis de sus sustratos preferenciales (Grufferty y Fox, 1988; Fernández, 2004; McSweeney, 2004; Ismail y Nielsen, 2010). En relación a la temperatura de cocción, algunos trabajos informan que la contribución de la plasmina a la hidrólisis de las caseínas es más pronunciada en variedades de quesos cuya elaboración requiere altas temperaturas de cocción (Grufferty y Fox, 1988, Sousa y col., 2001; Somers and Kelly, 2002; Ismail y Nielsen, 2010). En efecto, en quesos de pasta cocida, se verifica en general que la plasmina, participa de forma más notoria en la proteólisis primaria, debido, en parte, a que la misma presenta resistencia a las altas temperaturas de elaboración (Grufferty y Fox, 1988), o a un posible incremento neto de la actividad por la activación del plasminógeno. Dicha activación a su vez es ocasionada por la inactivación de los inhibidores del activador del plasminógeno por la temperatura, o a pérdidas en el suero de los inhibidores del activador del plasminógeno. (Richardson y Pearce, 1981; Farkye y Fox, 1990). El efecto del incremento en la actividad de la plasmina se ve potenciado por la inactivación al menos parcial de la enzima coagulante en este tipo de quesos, que pone en relieve las actividades proteolíticas típicas de la primera enzima.

Además de la plasmina existen otras enzimas nativas en la leche. La catepsina D es la más conocida y estudiada. Se ha demostrado que posee una actividad similar al coagulante residual sobre las caseínas α_{s1} y β . Posee actividad coagulante, pero la misma es muy pobre comparada con la acción de la quimosina. Si bien se ha sugerido que esta enzima posee alguna importancia en la maduración de quesos duros, la magnitud de dicha contribución no es conocida, debido a la similitud en cuanto a su especificidad sobre las caseínas, particularmente la caseína α_{s1} (Hurley y col., 2000; Sousa y col., 2001; McSweeney y col., 2004).

Microorganismos (fermento primario y secundario y bacterias no fermento)

Los microorganismos capaces de influir en la proteólisis incluyen a los pertenecientes al fermento primario, al fermento secundario o adjunto, y a las NSLAB (Lynch y col., 1996; Sousa y col., 2001, McSweeney, 2004).

La actividad proteolítica del fermento es considerada primordial en la proteólisis secundaria de todos los quesos madurados sin hongos y sin una flora superficial. Si bien las bacterias lácticas son consideradas poco proteolíticas comparadas con otras bacterias, tienen un sistema proteolítico bastante complejo, el cual les sirve para cumplir con sus exigentes requerimientos nutricionales de aminoácidos (Kok y de Vos, 1994; Steele, 1998; Sousa y col., 2001). Entre las bacterias lácticas, el sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* es el más conocido y estudiado (Monnet y col., 1994; Yvon y col., 1997; Atilas y col., 2000; Kieronczyk y col., 2003; Amárta y col., 2006; Sheehan y col., 2006; Gómez de Cadiñanos y col., 2013). Se han identificado cuatro componentes del sistema proteolítico de los lactococos: proteinasas de pared extracelulares (CEP, por sus siglas en inglés cell-envelope proteinase), una proteasa asociada a la membrana denominada Htra, un conjunto de peptidasas intracelulares (endopeptidasas, aminopeptidasas, di-/tri-peptidasas, iminopeptidasas y peptidasas específicas de prolina), y sistemas de transporte de di/tripéptidos y oligopéptidos (Kok y de Vos, 1994; Poquet y col., 2000; Smit y col., 2002). Las CEP de *Lactococcus* varían entre especies y cepas, y algunas cepas no poseen esta enzima (Monnet, y col., 1994). Las CEP hidrolizan las caseínas intactas con la formación de oligopéptidos. Estos últimos son transportados al interior de las células a través de los sistemas de transporte, donde son degradados por acción de las peptidasas (Smit y col., 2002). Las CEP se han clasificado en dos grupos: proteinasas tipo PI y PIII. Las proteinasas tipo PI degradan principalmente la caseína β , y solo muy lentamente las caseínas α_{s1} y κ , mientras que las proteinasas tipo PIII son capaces de hidrolizar rápidamente tanto la caseína α_{s1} como las caseínas β y κ . También durante la maduración, las CEP atacan los péptidos derivados de la acción de las enzimas no microbianas, como por ejemplo el péptido α_{s1} -I (f1-23), producto de la degradación de la caseína α_{s1} por acción del coagulante (McSweeney, 2004).

Las otras bacterias lácticas han sido comparativamente menos estudiadas, pero existe información sobre los sistemas proteolíticos y peptidolíticos de todas ellas (Chaves y col., 2002; Deutsch y col., 2002; Helinck y col., 2004, Dandoy y col., 2011)

En quesos duros argentinos de pasta cocida, se utilizan fermentos termófilos en los que predomina la especie *Lactobacillus helveticus* cuya temperatura óptima de crecimiento es de 45°C (Renheimer y col., 1996).

En general, y si bien existen diferencias entre cepas, *Lactobacillus helveticus* es una de las especies más proteolíticas de bacterias lácticas. Esta característica se ha atribuido en parte, al hecho de que numerosas cepas lisan tempranamente durante la maduración, liberando las peptidasas activas a la masa del queso (Valence y col., 2000; Chen y col., 2003; Slattery y col., 2010; Griffiths y Tellez, 2013). *Lactobacillus helveticus* posee un eficiente sistema proteolítico capaz de producir péptidos pequeños y aminoácidos libres a partir de las caseínas. Las proteasas localizadas en la pared de la célula bacteriana (CEP), son capaces de hidrolizar las caseínas en pequeños péptidos, que luego son transportados al interior de la célula para ser hidrolizados por acción de numerosas peptidasas intracelulares (Glibert y col., 1997; Slattery y col., 2010; Sadat-Mekeme y col., 2011 a y b; Griffiths y Tellez, 2013). A diferencia de las CEP de los lactococos, las de los lactobacilos están mucho menos caracterizadas (Slattery y col., 2010). En *Lactobacillus helveticus* se han identificado dos proteasas de pared, denominadas PrtH y PrtH2 (Glibert y col., 1997). En quesos Suizos, se ha sugerido que ciertos cultivos de *Lactobacillus helveticus*, a través de las CEP pueden hidrolizar la caseína α_{s1} dando lugar a la caseína α_{s1} -I, producto tradicionalmente asociado al coagulante residual (Sadat-Mekmene y col., 2013).

Las NSLAB no contribuyen a la acidificación durante la elaboración de los quesos, tal como lo hace el fermento primario, ya que no crecen bien en leche, pero participan en la proteólisis de los quesos. Estas bacterias pueden dominar la microflora durante la maduración, comenzando a prevalecer al tiempo que el número de bacterias lácticas del fermento generalmente disminuye (Sousa y col., 2001; McSweeney, 2004; Gatti y col., 2014). La flora NSLAB se compone de aquellas bacterias lácticas que no fueron agregadas ex profeso con el fermento y se detectan en el queso; habitualmente se trata de lactobacilos mesófilos, pediococos, enterococos y *Leuconostoc* spp. Los lactobacilos forman el grupo más frecuentemente encontrado (De Angelis y col., 2001;

Beresford y col., 2003), dentro de los cuáles, los más ampliamente encontradas en quesos son *Lb. casei* / *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. curvatus* (Cogan y Beresford, 2002; Bude Ugarte y col., 2006; Dolci y col., 2008). Los lactobacilos mesófilos no crecen bien en leche en ausencia de una fuente exógena de oligopéptidos y aminoácidos, porque suelen carecer de actividad proteasa; sin embargo se ha detectado que poseen una amplia gama de peptidasas. En efecto, varios estudios han demostrado que la adición como fermentos adjuntos de ciertas cepas de *Lactobacillus* condujeron a una mayor producción de péptidos cortos y aminoácidos libres comparado con quesos elaborados sin la adición de los mencionados fermentos (Williams y col., 1998; Hynes y col., 2003; Bergamini y col., 2006; Milesi y col., 2010; Burns y col., 2012; Bergamini y col., 2013)

4.3 Cambios en las características sensoriales de los quesos durante la maduración

Las características sensoriales de los quesos, que determinan su calidad, son propiedades que se perciben por los sentidos humanos, predominantemente durante el consumo y pueden ser descriptas como características de apariencia, de textura y de aroma y sabor o flavour (Fox y col., 2000).

La apariencia del queso es percibida antes de consumir el queso e incluye el color, la presencia o ausencia de ojos y la textura visual. También incluye el tamaño, la forma y el envase o presentación del queso (Murray and Delahunty, 2000)

La textura, en tanto, se puede definir como el atributo de un queso resultante de una combinación de propiedades físicas, incluyendo el tamaño, forma, la naturaleza y la conformación de los elementos estructurales constituyentes, que se perciben por una combinación de los sentidos del tacto (textura táctil), visión (textura visual) y el oído (textura auditiva). Durante la masticación y la ingesta, la percepción de textura se produce en las estructuras superficiales de la boca, alrededor de las raíces de los dientes y en los músculos y los tendones (Fox y col., 2000, Delahunty y Drake, 2004). La textura se puede evaluar a través de métodos sensoriales o métodos instrumentales. Los primeros permiten evaluar firmeza, dureza, presencia de grana, cohesividad, elasticidad, gomosidad, masticabilidad. Los métodos instrumentales se basan generalmente en pruebas de fuerza de compresión diseñadas para simular la masticación (Fox y col., 2000). Los métodos instrumentales más comúnmente utilizados para la determinación

de textura, son el ensayo de compresión uniaxial, por medio del cual se pueden determinar parámetros como deformación y esfuerzo a la fractura y trabajo en la fractura, y el análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en Inglés Texture Profile Analysis), por medio del cual se evalúan parámetros como fuerza, dureza, elasticidad, masticabilidad, gomosidad, adhesividad, cohesividad (Gunasekaram y Ak, 2003).

El olor o aroma suele ser el primer aspecto no textural percibido por el consumidor. Los estímulos para el olfato son compuestos volátiles transportados por el aire que les permiten viajar desde su origen hasta los receptores olfativos, donde se crean las percepciones de los olores distintivos (Chamorro y Losada, 2002). En el queso se han identificado cientos de compuestos volátiles diferentes, cada uno con un carácter distintivo de aroma, umbral de detección, volatilidad, entre otras propiedades. Esta diversidad hace que contribuyan de manera diferencial a las distintas variedades de queso. Los compuestos identificados en los quesos incluyen ácidos grasos, metilo, etilo y ésteres superiores, metil cetonas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes de cadena larga y corta y alcoholes aromáticos, aldehídos, aminas, amidas, fenoles y compuestos de azufre (Boscaini y col., 2003; Collins y col., 2003; Singh y col., 2003; McSweeney, 2004; Marilley y Casey, 2004; Smit y col., 2005; Yvon, 2006; Høier y col., 2010; McSweeney, 2011).

Los estímulos primarios para el gusto son compuestos no volátiles, y estos deben estar en contacto con los receptores del gusto. Este contacto crea percepciones que dotan cuatro cualidades distintivas de sabor, conocidas como dulce, salado, ácido y amargo. Un quinto sabor, 'umami', se ha aceptado más recientemente, sobre todo en Japón y otras culturas en las que es más conocido y fácil de percibir y es la nota típica asociada al ácido glutámico. Los compuestos que contribuyen directamente al gusto del queso incluyen el ácido láctico (ácido), cloruro de sodio (sal), sales minerales de potasio, calcio y magnesio (salado) y aminoácidos libres y péptidos de tipos diferentes (dulce, amargo, umami) (Delahunty y Drake, 2004).

El flavour es una parte importante de la calidad de los alimentos (Stevenson et al., 1996), siendo muchos de los compuestos químicos presentes en los mismos, los responsables de activar los receptores olfatorios y gustativos que permiten la percepción de este atributo. El flavour se compone principalmente de las sensaciones del aroma y del sabor. Además, otras percepciones, tales como los estímulos quinestésicos, hacen su contribución al flavour. En el caso de éstos, la detección es más general que la del gusto

y el olfato y se produce principalmente en los ojos, la nariz y la boca. La efervescencia de dióxido de carbono (CO₂), la sensación refrescante del mentol, la sensación de ardor de chile y el sabor picante de algunos quesos son quizás los mejores ejemplos (Delahunty y Drake, 2004).

Durante la maduración de los quesos, los cambios bioquímicos dan lugar a modificaciones en las características sensoriales, sobre la base de la composición inicial y del proceso de elaboración (Lucey y col., 2003).

En lo que respecta a la textura, la concentración de proteínas, fundamentalmente de caseínas, es muy importante. Al aumentar la concentración de caseínas, la matriz del queso se vuelve más elástica, y más resistente a la deformación, debido a que se incrementan las uniones entre y dentro de las moléculas de caseína. La grasa también contribuye a la textura de los quesos, dependiendo de la temperatura. Si la temperatura es baja y la grasa se encuentra en estado sólido, produce un aumento de la elasticidad de los quesos, ya que limita la deformación de la matriz proteica. Si la temperatura aumenta, y la grasa prevalece en su estado líquido, disminuye su contribución a la elasticidad, ya que actúa como lubricante y reduce el esfuerzo requerido para que se produzca la fractura de los quesos (Guinee, 2011). A una misma temperatura, los quesos reducidos en materia grasa, presentan una mayor firmeza, debido a una mayor interacción entre las caseínas que conforman la red proteica. En los quesos en los cuales el contenido de grasa y humedad son altos, la estructura de la red proteica está debilitada, por lo que resultan menos firmes. Por el contrario, una disminución en el contenido de humedad lleva a un incremento en la dureza de los quesos (Gunasekaram, 2003). Se considera que el evento bioquímico que tiene mayor influencia en la textura de los quesos es la proteólisis (Lucey y col., 2003). La hidrólisis de la caseína α_{s1} en quesos blandos y Cheddar ha sido asociada con una disminución de la firmeza de los quesos (De Jong, 1976, Creamer y Olson, 1982). También en queso Cheddar, se ha visto que la proteólisis lleva a una reducción de la deformación y el esfuerzo a la fractura (Creamer y Olson, 1982). En queso Reggiano Argentino, se ha observado que el incremento en las fracciones nitrógeno solubles, produce una disminución en la dureza y en la fuerza de ruptura (breaking point). Sin embargo, esa diferencia fue sólo detectada cuando el contenido de humedad no varía significativamente. La disminución del contenido de humedad lleva a un incremento en la medida de éstos parámetros de

textura, ocasionado por disminución de la proteólisis. El esfuerzo en el punto de fractura es independiente de las fracciones nitrógeno soluble, para todos los contenidos de agua (Bertola y col., 1995). En queso Cheddar, se ha visto que a medida que la maduración avanza, la fuerza y el grado de compresión en el momento de fractura disminuye, indicando una disminución en la firmeza del queso y un incremento de la granulosidad. Si bien se ha indicado repetidamente que esto ocurre principalmente por la proteólisis del queso a lo largo de la maduración, algunos autores más recientemente han llamado la atención sobre el hecho de que la proteólisis es un cambio concomitante con el ablandamiento y no guarda una relación causa-efecto. Estos autores atribuyen los cambios de textura fundamentalmente a cambios en los equilibrios salinos del calcio en el queso que ocurren simultáneamente con la proteólisis (O'Mahony y col., 2005). Ambos tipos de cambio, proteólisis y modificaciones entre las especies de calcio presentes en la matriz, son más acentuados al principio que al final de la maduración provocando que la textura varíe principalmente en esa etapa (Creamer y Olson 1982, Pollard 2003, Lucey 2003; Hassan y col., 2004, Lucey y col., 2005)

Los cambios de color que se producen en el queso durante la maduración generalmente se atribuyen a un cambio en el grado de hidratación de las caseínas, que altera las propiedades de dispersión de la luz (Paulson y col., 1998; Rudan y col., 1998). La disminución del parámetro L^* con la edad del queso se ha asociado en la variedad Emmental con la concentración de los componentes sólidos, debido a la reducción del contenido de agua que ocurre durante este proceso (Rohm and Jaron, 1996). Estos mismos autores, observaron durante la maduración un aumento en el parámetro b^* , y lo relacionaron también a la pérdida de agua, con la consecuente concentración de la materia grasa. El contenido de β caroteno de los quesos, que depende de la alimentación del ganado, correlaciona positivamente con el parámetro b^* (Descalzo y col., 2012).

En relación al sabor y aroma de los quesos, como ya se ha mencionado en las secciones 4.1 y 4.2, los productos generados durante la proteólisis y la lipólisis, y, fundamentalmente, el catabolismo de los productos de estas reacciones, son los principales responsables del desarrollo de los mismos en las diferentes variedades de quesos. Además, hay que tener en cuenta la importante contribución de los productos generados a partir del metabolismo de la lactosa, el lactato y el citrato (sección 4.1).

5. Estrategias tecnológicas para acelerar la maduración: un panorama general

La maduración de los quesos es la etapa más larga dentro del proceso productivo general. Mientras que los trabajos de transformación de la leche en cuajada en tina se miden en minutos, la maduración se mide en días, meses o años (Figura 3). Por esta razón tiene una gran incidencia sobre el aspecto económico, ya que grandes volúmenes del producto se encuentran inmovilizados.

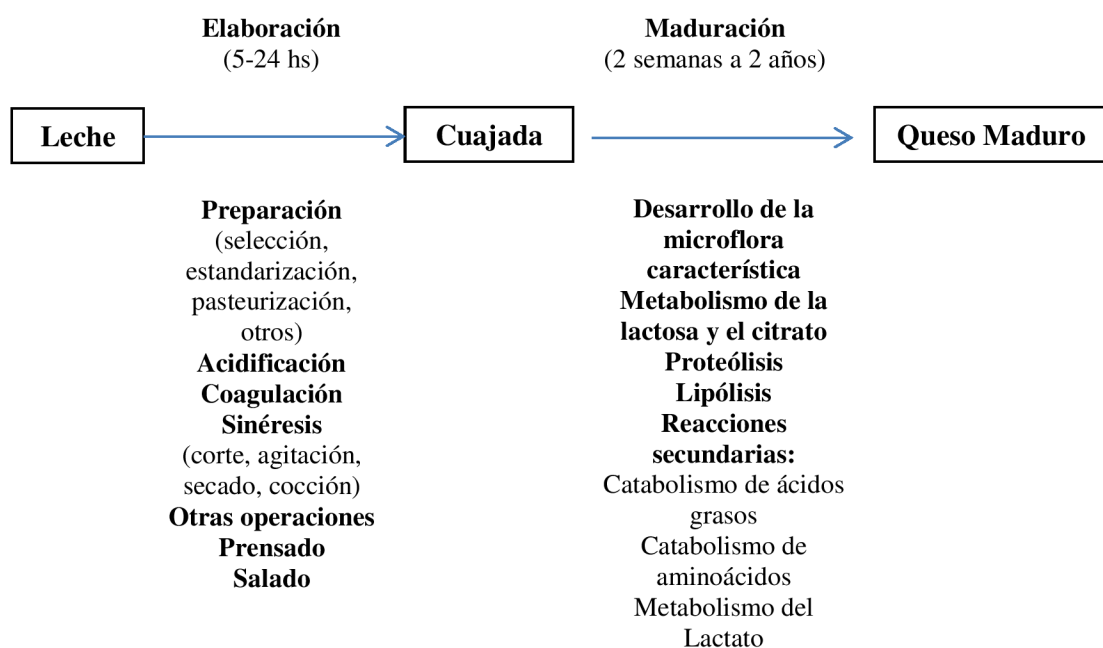


Figura 3. Esquema general de elaboración y maduración de quesos coagulados enzimáticamente (adaptado de Fox y McSweeney, 2004)

El incremento de la proteólisis y peptidólisis mediante diversas estrategias tecnológicas, ya sea mediante operaciones simples o la aplicación de tecnologías innovadoras, aparece como muy favorable desde el punto de vista de la aceleración de la maduración, y por consiguiente, de la disminución de los costos de producción de un alimento de elevado valor agregado (Fox y col., 2000; Zalazar y col., 2006b). Lo que se busca es reducir un tiempo de espera significativo en el costo del producto, sin alterar la bioquímica de la maduración.

Para aumentar la intensidad de las reacciones de hidrólisis de las caseínas intactas y de los péptidos provenientes de ellas, se han ensayado diversas metodologías, algunas de las cuales se citan a continuación.

5.1 Elevación de la temperatura de maduración

El incremento de la temperatura de maduración es un método simple, capaz de acelerar el período de maduración de los quesos, con el beneficio potencial de reducir los costos del almacenamiento refrigerado (O'Mahony y col., 2006). La desventaja de esta tecnología es que se corre el riesgo de que se desarrollen microorganismos indeseables y que se incrementen reacciones no específicas las que pueden dar lugar al desarrollo de flavours indeseables, además de potenciales defectos en la apariencia del queso, tales como ablandamiento o pérdida de la grana (Fox y col., 1996; Law, 2001). El queso Reggianito tradicionalmente se madura a una temperatura de 11- 13°C, a una humedad relativa entre 82 y 85%. Se han realizado estudios elevando esa temperatura de maduración (Sihufe y col., 2010; Ceruti y col., 2012), que mostraron efectos promisorios. En efecto, la elevación de la temperatura de maduración a 20°C, produjo un incremento en los productos de proteólisis, verificándose que a los 124 días los quesos madurados en esas condiciones, tenían un nivel de proteólisis similar a quesos controles de 180 días madurados a 12°C. Además algunas características sensoriales de los quesos madurados a mayor temperatura a los 124 días de maduración fueron comparables a las de quesos controles de 180 días de maduración (Ceruti y col., 2014). A pesar de la sencillez de esta estrategia, y de la evidencia aportada hasta el momento por trabajos de investigación, no existen antecedentes de su aplicación a nivel industrial en la Argentina.

5.2 Adición de enzimas exógenas

La adición de enzimas exógenas, como proteasas, carboxipeptidasas y lipasas es una metodología que se ha probado ampliamente (Fox y col., 2000; Law, 2001; El Soda y Awad, 2003; Kailasapathy y Lam, 2005; Wilkinson y Kilcawley, 2005; Upadhyay y col., 2006; Azarnia y col., 2011; Sihufe y col., 2011). Se trata de una tecnología muy costosa, ya que en general la pérdida de las enzimas en el suero es elevada (Upadhyay & McSweeney, 2003; Wilkinson & Kilcawley, 2005).

Hasta la fecha, los mejores resultados se han obtenido con lipasas, aplicadas en la industria quesera para acelerar la maduración de quesos duros, con resultados satisfactorios (Fox y col., 2000; Law, 2001; El Soda y Awad, 2003; Wilkinson y Kilcawley, 2005; Di Cagno y Gobetti, 2011; Kilcawley y col., 2012).

Por el contrario, las proteasas no han tenido mayor aceptación, ya que pueden causar defectos en el patrón de proteólisis, llevando a la producción de péptidos indeseables, sabores amargos, y por lo tanto modificando el flavour y la textura normal de los quesos (El Soda y col., 2003; Wilkinson & Kilcawley, 2005).

Se le ha otorgado especial atención al agregado de plasmina exógena, ya que al ser una enzima nativa de la leche se espera que no altere los perfiles habituales de proteólisis sino que solo los intensifique (Bastian y Brown, 1996; Fox y col., 2000b). En efecto, se ha observado que el agregado de plasmina exógena a la leche, produjo un incremento de la proteólisis primaria en quesos Cheddar (Farkye y Fox (1992), Mozzarella (Sommers y col., 2002) y Smear cheese (O'Farrel y col., 2002). Otra estrategia consiste en lograr un aumento de la concentración de plasmina en el queso por medio de la activación del plasminógeno, agregando uroquinasa. Esta técnica ha sido ensayada sobre quesos Suizos (Bastian y col., 1997) y Cheddar (Barret y col., 1999; Milesi y col. 2008a), conduciendo a un aumento de la proteólisis primaria. Rippel y col. (2004) lograron estimular la actividad del activador del plasminógeno por medio de α -lactoalbúmina nativa, y por β lactoglobulina desnaturalizada. También se ha probado la adición de estreptoquinasa, una proteasa exocelular producida por el *Streptococcus uberis*, que forma un complejo con el plasminógeno que induce a un cambio conformacional que activa la plasmina sin mediar una escisión proteolítica (Johnsen y col., 2000). Esta enzima, adicionada a la leche antes de la elaboración de queso Cheddar, también ha demostrado ser capaz de activar el plasminógeno (Upadhyay y col., 2004b). En este caso se observó una aceleración de la proteólisis primaria, lo que se evidenció por un incremento en el nitrógeno soluble a pH 4,6 y en la hidrólisis de la β caseína. La adición de plasmina exógena o la activación de plasminógeno para acelerar la maduración se mantiene a nivel de investigación, ya que por el momento es muy costosa.

5.3 Utilización de fermentos adjuntos

El uso de fermentos adjuntos, en general compuestos de bacterias lácticas vivas o atenuadas que actúan fundamentalmente sobre los péptidos de mediano y pequeño tamaño, para producir cantidades incrementadas de oligopéptidos y aminoácidos libres, es una estrategia que se utiliza para acelerar la maduración de los quesos (Fox y col., 2000; Law, 2001; El Soda, 2003; Hynes y col., 2003; Hynes y col., 2005; Zalazar y col., 2006b, Milesi y col. 2008b, Milesi y col., 2010; Burns y col., 2012). En este sentido, se ha descrito cómo el empleo de cepas seleccionadas de lactobacilos mesófilos aumenta la concentración de aminoácidos precursores de aroma, mejorando las características del queso.

6. La aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH)

El tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) sobre el queso recién elaborado es una estrategia que puede ser utilizada para acelerar la proteólisis. (Messens y col., 1999; Trujillo y col., 2000; Saldo y col., 2001; O'Reilly y col., 2002; Sheehan y col., 2005; Martínez-Rodríguez y col., 2012).

En la presente tesis, una de las estrategias que se aplican para acelerar la maduración del queso Reggiano es la aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH). Por esta razón, se dedica un apartado completo de la introducción a esta tecnología, haciendo énfasis sobre los efectos reportados en la literatura sobre la leche y los quesos.

6.1 Aplicación de APH en alimentos

En los últimos años, la demanda de productos saludables y de conveniencia ha aumentado de manera considerable. El consumidor moderno requiere alimentos que sean inocuos y nutritivos, libres de aditivos, con buen sabor y con larga vida útil. Estos cambios en el consumo, impulsaron la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación de alimentos, las cuales no modifican de manera sustancial sus atributos sensoriales, nutricionales y funcionales, manteniendo su cualidad de "frescura". En este contexto, en las últimas 3 décadas han surgido las denominadas tecnologías no térmicas, cuyo principal factor de procesamiento no es la temperatura, sino otras variables físicas (presión, campos eléctricos, ondas sónicas, etc.). Si bien en las tecnologías no térmicas puede producirse un aumento concomitante de la

temperatura, el tratamiento no se basa en este efecto, que además puede ser mitigado en el caso de APH mediante refrigeración. Entre las tecnologías no térmicas podemos mencionar: los campos eléctricos pulsantes de alta intensidad, los pulsos lumínicos, la irradiación, las radiaciones ultravioletas y la tecnología APH. Considerando el conjunto de tecnologías no térmicas, la tecnología APH es la que alcanzó mayor aplicación comercial (Patterson y col., 2007; Tewari, 2007; Tao y col., 2014). La tecnología APH brinda la posibilidad de contar con productos con características más naturales, con efecto mínimo sobre las propiedades sensoriales y nutricionales, libres de microorganismos patógenos y con bajos recuentos de microbiota alteradora (Torres y Velazquez, 2005).

El tratamiento mediante APH consiste en la aplicación, a un alimento envasado en un envase flexible y hermético, de una presión constante entre 100 y 900 MPa por tiempos cortos (normalmente <10 min) y temperaturas en el rango de -40°C a 110°C. Estas condiciones son las que se utilizan en equipos de laboratorio o planta piloto mientras que a nivel industrial la máxima presión que se aplica es 600 MPa, a temperatura ambiente o de refrigeración.

La tecnología APH comenzó a utilizarse en el siglo XIX y fue aplicada inicialmente en materiales cerámicos (Lamballerie - Anton y col., 2002). El primer estudio del efecto de esta tecnología en alimentos, fue realizado en 1899 cuando Bert Hite construyó un equipo de APH para disminuir la carga microbiana de la leche y otros alimentos (Hite, 1899). Sin embargo, debido a que esta tecnología tenía importantes dificultades para aplicarse y los costos de utilización eran elevados, recién en la segunda mitad del siglo XX (década del '70) se retomó e incrementó la investigación sobre su aplicación en alimentos (Galazka y col., 2000). En la década de los '80 se investigó fundamentalmente el efecto de las APH sobre la inactivación de los microorganismos. El primer producto tratado con APH fue jamón cocido lo cual ocurrió en Japón en el año 1990, mientras que el primer producto insertado en el mercado japonés fue una mermelada de frutillas de la marca Midi-Ya (Thakur & Nelson, 1998). En los años siguientes, esta tecnología fue aplicada sobre distintos productos, existiendo actualmente a nivel mundial más de 150 productos tratados con APH. Como ejemplo, se pueden citar: jugos de frutas (UltiFruit®, Francia; PreshaFruit®, Australia, Evolution Fresh, EEUU, BluePrintJuices), jugos orgánicos, te y batidos (Suja, EEUU), mermeladas, jamón cocido/curado (Espuña y Campofrio, España, Hormel, EEUU;

Vismara, Italia), carnes listas para consumir (Hormel y Perdue, EEUU, Maple Leaf, Canadá), pescados y mariscos; cortes de pollo y pavo (Campofrio, España), hamburguesas y salchichas (Fressure, Cargill, EEUU), guacamole, salsas y aderezos (Fresherized Food, EEUU; Verfruco, Mexico), platos preparados, como ensaladas a base de legumbres y verduras, con carne, pollo y pescados, sopas, cremas, platos a base de pastas o arroz con verduras; y dentro de los productos lácteos se pueden mencionar cremas de quesos y rellenos para sándwiches (Rodilla, España), salsas para ensaladas y untables, bebida en base a calostro (Col+, Nueva Zelanda), yogures, bebidas probióticas, snaks con jamón y queso (Duetto Deli Snack, Deli24, Reino Unido).

En general, las APH a temperaturas bajas o moderadas producen la inactivación de microorganismos vegetativos y enzimas, sin modificar en forma importante los atributos sensoriales y las propiedades nutricionales (particularmente vitaminas) del producto. Su característica más importante es la preservación de la “frescura” del alimento. Además, los tratamientos con APH permiten duplicar o triplicar la vida útil de los alimentos respecto a los tratamientos convencionales de preservación (Welti-Chanes y col., 2004). Los volúmenes producidos son aún bajos y el costo de inversión es todavía elevado. Sin embargo, la tecnología de APH genera un menor consumo de energía que las tecnologías convencionales de procesamiento térmico, por lo que los productos tratados con altas presiones resultan competitivos a nivel comercial (Garriga y col., 2004). En el pasado, debido a la baja disponibilidad de equipos APH en el mundo y a los escasos productos procesados por esta tecnología, la comercialización fue enfocada a productos alimenticios con un alto valor agregado. Sin embargo, debido al rápido desarrollo de esta tecnología y a la alta aceptación y demanda de estos productos por los consumidores, cada vez más productos procesados con APH están actualmente disponibles en supermercados y mercados locales, reduciendo considerablemente su costo (Bermúdez-Aguirre et. al., 2011). Dependiendo de los parámetros operativos y de la escala de producción (tamaño de los equipos), los costos de aplicación de esta tecnología están en el rango de US\$ 0,05 a 0,5 por litro o kilo de producto (Rastogi y col., 2007). Por ejemplo, para productos cárnicos “listos para consumir”, el costo del tratamiento por altas presiones en condiciones de procesamiento comercial (585 MPa, 3 minutos, carga del cilindro del 50%) ronda entre US\$ 0,08 y 0,22 por kilogramo, lo que hace a esta tecnología conveniente para una gran variedad de productos (Hernando-Sáinz et al., 2008).

La presión puede afectar las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas (Hong y col., 2006). Sin embargo, ese efecto depende del nivel de presión aplicado (Balny y col., 1993).

Debido a los cambios en la conformación de las proteínas, los tratamientos con APH modifican la funcionalidad de las mismas, induciendo efectos específicos en la textura y estructura de los alimentos. En consecuencia, su aplicación permite el desarrollo de nuevos productos y la optimización de procesos convencionales de la industria de los alimentos (Hugas y col., 2002; Torres y Velazquez, 2005; Devi y col., 2013).

6.2. Principios básicos

Esta tecnología se basa en tres principios: el principio de Le Chatelier, el principio isostático y el principio de reordenamiento microscópico.

El principio de Le Chatelier postula que cuando un sistema en equilibrio es alterado, el sistema responde de una manera que tiende a minimizar esta alteración (Norton y Sun, 2008). En el caso de las altas presiones, el principio se puede interpretar en términos de la relación entre la presión y el volumen. Esto significa que la presión afecta los fenómenos que resultan en una modificación del volumen, como por ejemplo el cambio en la conformación de las macromoléculas. Cualquier fenómeno (por ejemplo, cambio de fase, cambio en la configuración molecular, reacción química) que se acompaña de una disminución del volumen será mejorado por la presión y viceversa (Tao y col., 2014).

El principio isostático, postula que la presión se transmite en forma instantánea y uniforme a través del alimento, siempre que el mismo esté en contacto con el medio que transmite la presión. En consecuencia, el tiempo de tratamiento es corto y además es independiente de la forma y del tamaño de la muestra (Cheftel y Culioli, 1997).

El tercer principio se basa en el reordenamiento microscópico y postula que a temperatura constante, un incremento de presión induce un aumento del grado de ordenamiento de las moléculas de una sustancia dada (Heremans, 1989).

Si un producto alimenticio contiene suficiente humedad, la presión no lo dañará a nivel macroscópico, siempre y cuando la presión se aplique de manera uniforme en todas las direcciones. Esto puede describirse con el siguiente ejemplo: una uva se puede aplastar fácilmente al presionarla entre los dedos y ejerciendo presión a lo largo de un

eje. En cambio, si la uva está expuesta a una presión uniforme sumergiéndola en agua en el interior una botella sellada flexible, esta mantiene su forma independientemente de lo fuerte que la botella se apriete. En este caso, la presión transmitida desde la pared de la botella a través del agua se aplica uniformemente alrededor de la fruta. De manera similar, la presión no produce daño en la mayoría de los alimentos procesados por alta presión, siempre y cuando el alimento no tenga una estructura porosa. Las burbujas de aire colapsan por efecto de la presión debido a las diferencias entre la compresibilidad del aire y el agua, y a menos que el alimento sea perfectamente elástico y contenga al aire, este no recuperará su tamaño y forma originales (Balasubramaniam y col., 2008).

6.3 Efecto de las APH sobre los componentes de los alimentos y sobre los microorganismos

En general, las uniones covalentes no son afectadas por el proceso de APH a excepción de los grupos sulfhidrilos. Por esta razón, los compuestos de bajo peso molecular como vitaminas y componentes de aroma y sabor, no se alteran a presiones normalmente utilizadas (<1000 MPa). La formación de enlaces de hidrógeno se estabiliza por APH, ya que esto conduce a la disminución de volumen. La modificación de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, que son las fuerzas más grandes que mantienen la estructura terciaria de las proteínas, es acompañada por importantes cambios de hidratación, los cuales se supone que son las razones principales de la disminución de volumen asociada a la desnaturalización de proteína. Como consecuencia, las APH modifican las macromoléculas tales como las proteínas, provocando cambios en sus estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias alterando la estructura celular hasta cierto punto, y afectando las proteínas de la membrana y la conformación de lípidos y actividad de enzimas (Marcos y col., 2010).

El tratamiento con APH inactiva los microorganismos interrumpiendo las funciones celulares responsables de la reproducción y sobrevivencia. El principal daño se produce en la membrana, en la cual ocasiona una alteración en su integridad, disminuyendo su fluidez, lo que afecta el transporte de nutrientes hacia el interior de la célula y de desechos afuera de la misma. Además, la muerte celular puede producirse por alteraciones irreversibles en componentes celulares esenciales para el crecimiento y la reproducción (Torres y Velazquez, 2005; Tao y col., 2014). Por lo general, niveles de

presión moderadas (10-50 MPa) disminuyen la velocidad de reproducción y crecimiento de los microorganismos, mientras que altas presiones (generalmente > 300 MPa) a temperaturas bajas o ambiente producen inactivación de células vegetativas. El efecto ocasionado por el tratamiento con APH, además de las condiciones de presurización utilizadas (velocidad de compresión, presión, tiempo, temperatura) dependerá de la matriz alimentaria, ya que ciertas características del alimento, como pH, actividad acuosa (a_w), contenido proteico, presencia de ciertos cationes, influyen sobre el efecto de la alta presión sobre la inactivación de los microorganismos. En este sentido, se ha visto que utilizando el mismo tratamiento APH (700 MPa por 30 min a 20°C) se produjo una reducción de la *Escherichia coli* O157:H7 de 6 ciclos logarítmicos en buffer fosfato salino y de 4 ciclos logarítmicos en carne de pollo, mientras que en leche UHT, la reducción resultó menor a 2 ciclos logarítmicos (Patterson y col., 2007). En general, la susceptibilidad de los microorganismos al tratamiento con APH es mayor en alimentos con pH bajo y a_w elevada. Por otro lado, la composición de los alimentos modifica el efecto del tratamiento con APH sobre los microorganismos, ya que componentes como la grasa, proteínas, azúcares, sales y minerales parecen ejercer un efecto baroprotector, incrementando la resistencia de los microorganismos al efecto de la presión, lo que explica el menor efecto inhibitor del tratamiento con APH observado en la carne de pollo y en la leche en el ejemplo descrito en el párrafo anterior. También es variable la respuesta al tratamiento con APH dependiendo del tipo de microorganismo (género, especie, cepa). Se sabe que la resistencia aumenta en el siguiente orden: células vegetativas < hongos y levaduras < virus < esporas de bacterias

En las bacterias, las Gram negativas son menos resistentes que las Gram positivas, debido principalmente a las diferencias en su pared celular (Tao y col., 2014). En cuanto a la fase de crecimiento de los microorganismos, las células en estado de crecimiento exponencial son más susceptibles al tratamiento con APH que las células en fase estacionaria (Trujillo y col., 2002; Tao y col., 2014).

Debido a que las levaduras son generalmente sensibles al tratamiento con APH, y que un pH ácido también incrementa la sensibilidad de los microorganismos al tratamiento con APH, esta tecnología es muy utilizada para el tratamiento de jugos, salsas y puré de frutas.

Las esporas de bacterias son muy resistentes a las APH, por lo que se requiere un tratamiento muy intenso, superior a 800 MPa (a temperaturas bajas o ambiente) para

lograr su inactivación. Combinando el tratamiento APH con altas temperaturas (tratamientos térmicos asistidos por altas presiones, en inglés pressure assisted thermal sterilization PATS) es posible mejorar la efectividad sobre la inactivación de las esporas, aunque en estos procesos el mayor efecto letal sería de naturaleza térmica (Tao y col., 2014)

6.4. Equipos y descripción del proceso APH

Los sistemas APH disponibles a nivel industrial pueden ser discontinuos (batch) o semi-continuos. El procesamiento discontinuo (Figura 4) es el que se aplica mayoritariamente y se utiliza para el tratamiento de alimentos sólidos, envasados en envases flexibles y herméticos, y alimentos líquidos contenidos en botellas o pouches de material plástico. El sistema semi-continuo se utiliza a nivel industrial exclusivamente en la pasteurización de jugos de productos frutihortícolas, aplicándose el tratamiento del producto a granel (Tao y col., 2014).

El sistema de APH utilizado en este trabajo de tesis fue un equipo Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System, modelo FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido) de escala laboratorio, que opera en forma discontinua y dispone de cuatro partes. Cada una de las ellas se describe a continuación.

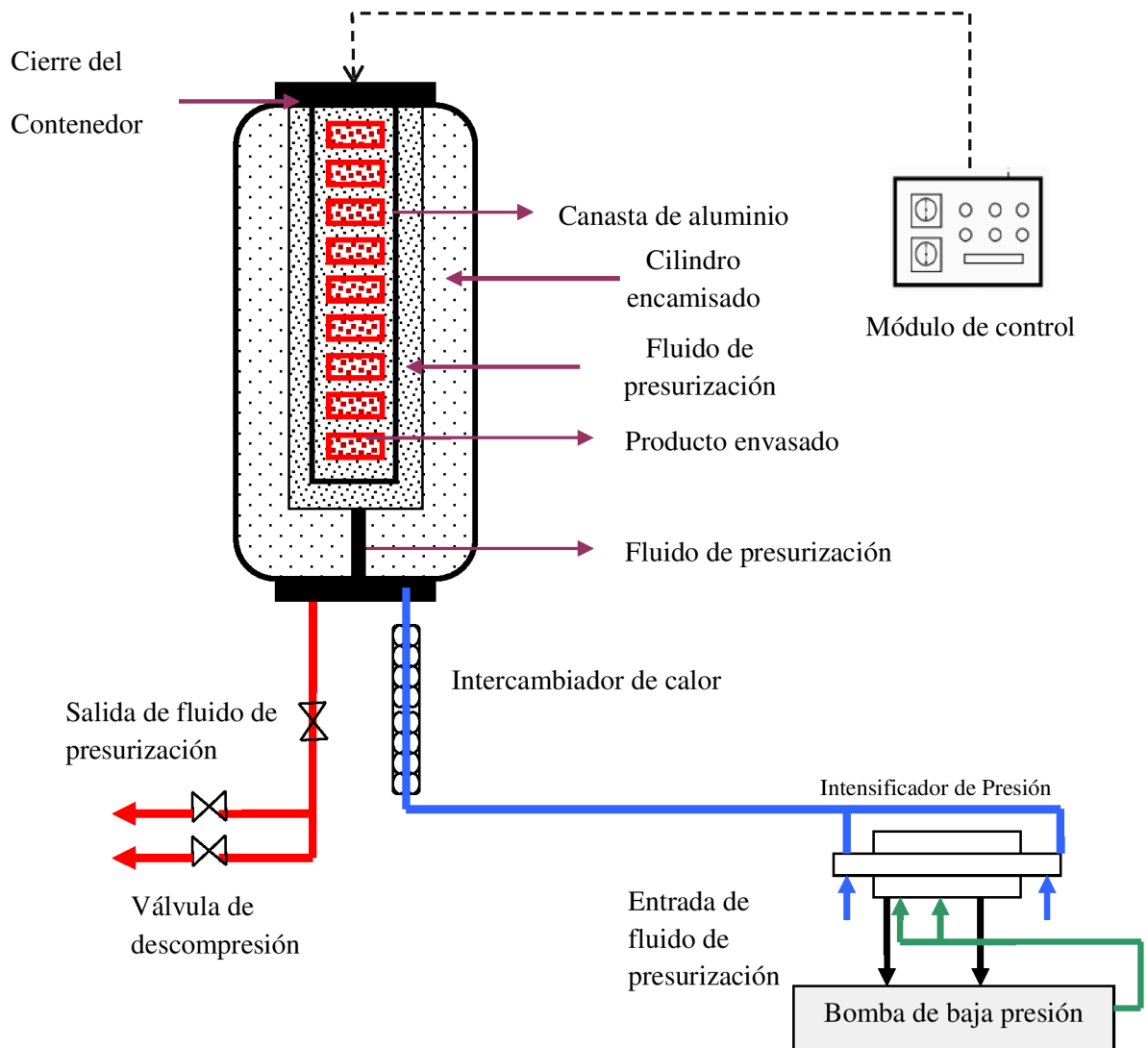


Figura 4: Sistema batch de Altas Presiones Hidrostáticas (adaptada de Somerville, 2009).

Módulo de control

El módulo de control consta de una computadora que dispone de un PLC con software SCADA para el control automático del equipo (Figura 5). En la interfase del sistema SCADA se ingresan las condiciones de operación (velocidad de compresión, presión de trabajo, tiempo de mantenimiento a la presión de trabajo, temperatura de la camisa de intercambio de calor del cilindro, temperatura del intercambiador de calor) y datos de la muestra.

El sistema también controla la operación de los módulos de refrigeración y de calefacción, permitiendo acondicionar la temperatura del cilindro (dispone de una camisa de intercambio de calor) y la temperatura del fluido de presurización al ingresar

al cilindro (el equipo dispone de un intercambiador de calor). El sistema SCADA también controla el funcionamiento de cada parte del equipo, la apertura y cierre de válvulas, monitorea las principales variables del proceso y las almacena en el disco rígido de la computadora. El procesamiento posterior de esos datos permite obtener gráficos presión-tiempo y temperatura-tiempo.



Figura 5. Imagen correspondiente al módulo de control del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922.

Módulo de refrigeración y sistema de calefacción

Permite acondicionar la temperatura del cilindro a temperaturas de refrigeración o subcero (hasta -10°C). Por el módulo de refrigeración (Figura 6) recircula una mezcla de agua y etilenglicol, la cual refrigera a través de un serpentín, el fluido de intercambio (mezcla de agua y propilenglicol) almacenado en el tanque de acondicionamiento térmico ubicado en el módulo de servicio del sistema.



Figura 6. Imagen correspondiente al módulo de refrigeración marca Euro Chiller, acoplado al equipo APH.

A su vez, el fluido de intercambio recircula entre el tanque de acondicionamiento y la camisa de intercambio de calor del cilindro de alta presión. En el caso que se quiera calefaccionar el cilindro, se calienta el fluido de intercambio mediante resistencias eléctricas ubicadas en el tanque de acondicionamiento.

Módulo de prensa

El módulo de prensa dispone de un cilindro encamisado en el cual ingresa el fluido de transmisión de la presión (agua, aceites de siliconas, mezclas de agua y alcoholes o agua y aceites) (Figura 7a). El fluido de presurización utilizado en este trabajo fue una solución de propilenglicol (al 30% v/v) en agua. Según se indicó antes, en la camisa de intercambio de calor del cilindro de alta presión también circula una mezcla de agua y propilenglicol.

En el interior del cilindro se coloca la canasta de aluminio de paredes perforadas donde se introduce el alimento envasado en un envase flexible (Figura 7b). La presión máxima de operación del equipo es de 900 MPa y el cilindro posee una capacidad de 2 litros.

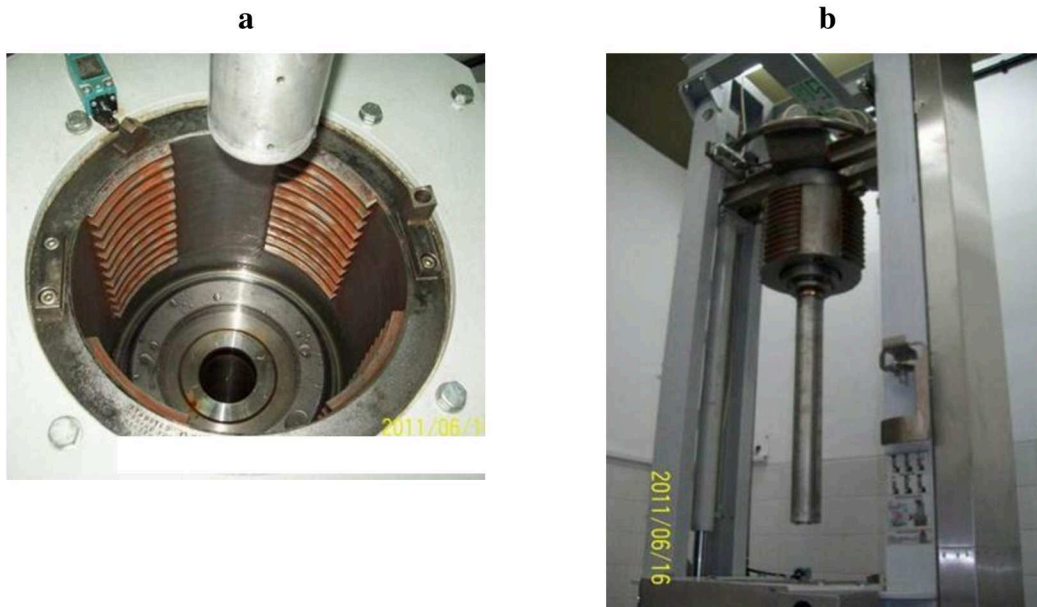


Figura 7. Módulo de prensa del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922. **a-** Cilindro de alta presión encamisado; **b-** Canasta de aluminio para carga del alimento envasado en el cilindro del equipo APH

Módulo de servicio

Contiene las distintas bombas de precarga y elevación de la presión, los intensificadores de presión, las válvulas de descompresión y el tanque de acondicionamiento térmico del cilindro de alta presión (Figura 8).



Figura 8. Imagen correspondiente al módulo de servicio del equipo de APH Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System modelo FPG9400:922.

La operación discontinua o batch se aplica en seis etapas:

1. Carga del alimento envasado en los canastos del sistema APH.
2. Carga de canastos en el cilindro de alta presión.
3. Aumento de la presión hasta la condición de operación (compresión).
4. Mantenimiento de la presión de operación (tiempo de mantenimiento o holding).
5. Descompresión.
6. Descarga de canastos.

En el caso del sistema APH utilizado en el trabajo de tesis, el proceso se inicia al introducir el queso envasado al vacío (en bolsas de película Cryovac BB2800CB; permeabilidades: O₂ 30 cm³ m⁻² 24hs⁻¹ bar⁻¹; CO₂ 150 cm³ m⁻² 24 hs⁻¹ bar⁻¹; vapor de agua 20 g 24 hs⁻¹ m⁻², Sealed Air Co., Buenos Aires, Argentina) en la canasta de aluminio (Figura 7b), la que luego se introduce en el cilindro encamisado (Figura 7a). Posteriormente, se cierra el contenedor del cilindro y se da inicio al proceso a través del módulo de control. En forma automática la bomba de precarga comienza a llenar el

cilindro de alta presión con el fluido de presurización y posteriormente los intensificadores comienzan a elevar la presión hasta alcanzar la presión de trabajo programada. Esta etapa de elevación de la presión se denomina etapa de presurización o compresión y el tiempo que demanda se lo denomina tiempo de presurización, compresión o come up time. Una vez que se alcanza la presión de trabajo se mantiene ese valor durante el tiempo establecido (tiempo de mantenimiento o holding time). Una vez finalizado el tiempo de mantenimiento de la presión, el equipo comienza a vaciar el líquido del recipiente descomprimiendo en dos o más etapas, hasta alcanzar la presión atmosférica. Posteriormente, cuando el sistema SCADA habilita la apertura del contenedor del cilindro, se puede retirar el cierre electrónico, abrir la tapa y retirar la canasta de aluminio con el alimento ya tratado.

El tiempo total del proceso (cycle time) comprende: el tiempo de compresión o presurización, el tiempo de mantenimiento de la presión y el tiempo de descompresión. En el sistema APH utilizado en este estudio se puede modificar el tiempo de compresión (variando la velocidad de presurización) y el tiempo de mantenimiento, pero no el tiempo de descompresión, porque la velocidad de descompresión no se puede modificar (definida por default por la firma fabricante del sistema).

6.5. Efecto de la tecnología APH sobre la calidad de leche y quesos.

Como ya se ha mencionado, en 1899 se realizaron las primeras experiencias con el uso de altas presiones para inactivar microorganismos y así prolongar la conservación de la leche (Hite, 1899). En esas primeras experiencias, ya fue posible reducir en seis órdenes decimales el recuento microbiano de la leche, por medio de un tratamiento a 689 MPa durante 10 min a temperatura ambiente. Sin embargo, la falta de disponibilidad de equipos adecuados obstaculizó nuevas investigaciones hasta la segunda mitad del siglo XX. En leche y productos lácteos, los primeros estudios comenzaron a partir del año 1990. Los principales resultados se detallan a continuación.

6.5.1 Aplicación de APH a la leche

6.5.1.1. Efecto sobre los componentes

Proteínas

Las caseínas resultan ser el componente de la leche más afectado por el tratamiento con APH. El tratamiento provoca la disrupción de las micelas con la consecuente formación de micelas de menor tamaño (Needs y col., 2000; Trujillo y col., 2002; Huppertz y col., 2006a). Este efecto se incrementa en el rango de presiones entre 200 a 400 MPa, mientras que a presiones mayores a 400 MPa, la disrupción de las micelas de caseína es completa. En tratamientos prolongados (por encima de los 60 min) a 250 y 300 MPa se informó la formación de agregados de caseínas, pero esto no fue confirmado a presiones entre 350 y 400 MPa (Huppertz y col., 2006a). Huppertz y col. (2007) proponen que existe un fenómeno de disrupción y re-asociación de las micelas de caseínas cuando son sometidas al tratamiento APH. La disrupción puede ser debida a que el tratamiento APH induce una solubilización del fosfato de calcio coloidal, ocasionado por un cambio negativo de volumen, como consecuencia de un arreglo más compacto de las moléculas de agua alrededor de los iones cargados, llevando a un incremento de la solubilidad de los iones (Huppertz y col., 2002). El agua experimenta una reducción de volumen de aproximadamente un 4% cuando se encuentra a 100 MPa, llegando al 15% cuando la presión aumenta a 600 MPa a temperatura ambiente (Cheftel, 1995). La re-asociación de las micelas de caseína en tratamientos prolongados a 200 – 300 MPa puede ser debido a que la alta presión a su vez, provoca un incremento de la hidrofobicidad superficial, lo que induce la asociación de las micelas en agregados de forma irregular (Huppertz y col., 2006a). Para que se produzcan los agregados micelares, es necesaria la presencia de núcleos de fosfato de calcio micelar. Por encima de 300 MPa no ocurre re asociación, debido a que a esas presiones, disminuye la cantidad de fosfato de calcio micelar (Huppertz y col., 2007).

En cuanto a las proteínas del suero, se ha observado que la α -lactoalbúmina es más resistente a los tratamientos con APH que la β -lactoglobulina. Esto se debe a que la α -lactalbúmina presenta una estructura más compacta, debido a la presencia de un mayor número de uniones disulfuro (Huppertz y col., 2006a). La β -lactoglobulina resulta afectada a partir de los 200 MPa, observándose un aumento en la velocidad de agregación. La α -lactalbúmina se desnaturaliza a partir de los 500 MPa, al igual que las inmunoglobulinas (Devi y col., 2013). La albúmina de suero bovino (BSA) se desnaturaliza a presiones superiores a 400 MPa. Esta baroestabilidad se debe a que posee una estructura muy rígida debido a la presencia de 17 uniones disulfuro intra molecular (Huppertz y col., 2006).

Grasa

El tratamiento con APH modifica el tamaño y la cantidad de los glóbulos grasos de la leche. En leche de oveja, se demostró que el tamaño de los glóbulos grasos resultaba modificado por presiones superiores a 500 MPa. El tratamiento con APH a 25 y 50°C mostró una tendencia a incrementar el número de glóbulos grasos de tamaño reducido, de entre 1 y 2 μm . (Gervilla y col., 2001, Trujillo y col., 2002). En ese mismo estudio, se verificó que los tratamientos entre 100 y 500 MPa a 4, 25 y 50°C no incrementaron el contenido de ácidos grasos libres, lo que sugirió que la membrana de los glóbulos grasos no resultó dañada por el tratamiento con APH (Huppertz y col., 2002).

Lactosa

En cuanto a la lactosa, se ha informado que no resulta afectada por el tratamiento con APH a presiones entre 100 y 400 MPa, durante 10 – 60 min, a 25°C (López-Fandiño y col., 1996)

Componentes minoritarios

Como ya se ha mencionado, a diferencia de los tratamientos térmicos, en los cuales son afectados tanto las uniones covalentes como las no covalentes, el tratamiento con APH a temperatura ambiente o moderada sólo rompe uniones no covalentes (puente de hidrógeno, uniones hidrofóbicas, uniones iónicas). Por lo tanto, las moléculas pequeñas presentes en la leche, como vitaminas, aminoácidos, azúcares simples o componentes del flavour permanecen inalteradas luego del tratamiento (Cheftel, 1995). En un estudio realizado por Sierra y col. (2000) se observó que el tratamiento de la leche a 400 MPa por 30 min a 25°C no produjo pérdidas significativas en el contenido de vitaminas B₁ y B₆

6.5.1.2 Efecto sobre las Enzimas

Existe evidencia de que la aplicación de presiones hidrostáticas bajas o moderadas (entre 100 y 400 MPa) puede incrementar la actividad de enzimas (Anese y col., 1995; Cano y col., 1997), mientras que presiones superiores pueden inactivarlas (Gomes y Ledward, 1996; Goodner y col., 1998, Huppertz y col., 2004). La activación o inactivación de las enzimas, depende de cambios directos en su estructura, en el

mecanismo de reacción -por ejemplo, un cambio en la velocidad de reacción de un paso limitante para que la enzima actúe-, o cambios en el sustrato -que afecten, por ejemplo, el sitio de unión de la enzima, o que limite el desarrollo de algún paso limitante para su activación. A su vez, el tratamiento con APH, produce la compresión del solvente, lo que puede conducir a un aumento de la velocidad de reacción. Contrariamente, esa compresión de solvente aumenta la viscosidad de medio, lo que va en detrimento la velocidad de reacción en sistemas heterogéneos (Eisenmemenger y col., 2009).

La plasmina ha demostrado ser altamente baroestable. Diluyendo la enzima en buffer, y aplicando presiones entre 100 y 800 MPa a 25°C durante 5 min, se verificó que su actividad no fue afectada por ningún tratamiento (Malone y col., 2003). Mientras que en la leche, se ha visto una actividad reducida a presiones mayores a 400 MPa (Scollard y col., 2000a, b; Garcia-Risco y col, 2000, 2003; Huppertz y col., 2003). Tratamientos a presiones superiores de 600 MPa durante más de 10 min, produjeron una reducción de la actividad de la plasmina igual o mayor que el 70% (Scollard y col., 2000b; Huppertz y col. 2003). Scollard y col (2000a) observaron en experiencias realizadas en buffers que la adición de β - lactoglobulina produjo un aumento de la susceptibilidad de la plasmina a la inactivación, lo que explicaría la mayor barorresistencia demostrada por Malone y col. (2003) cuando aplicaron APH a la enzima pura diluida en un medio buffer. Si bien no se ha informado un incremento en la actividad de la plasmina en leche debido al tratamiento con APH, algunos autores han observado un aumento de los valores del nitrógeno soluble a pH 4,6, o una mayor degradación de las caseínas β y α_{s2} luego del tratamiento con APH, sustratos preferenciales de esta enzima (Garcia-Risco y col., 2003; Scollard y col., 2000b). Esto puede deberse a la combinación de la baroestabilidad de la plasmina con los intensos cambios provocados en las caseínas por el tratamiento con APH, los que puede facilitar la acción de esta enzima sobre las moléculas de caseína. Asimismo puede significar cambios diferenciados en los distintos componentes del sistema de activadores e inhibidores de la enzima.

6.5.1.3 Efecto sobre los microorganismos

En leche, se han realizado varios estudios de inactivación de microorganismos patógenos y alteradores (*Escherichia. coli*, *Listeria innocua*, *Pseudomona fluorescens*, *Lactobacillus helveticus*, *Staphylococcus aureus*), naturalmente presentes o inoculados, los cuáles demostraron que es posible obtener leche “cruda” con condiciones

microbiológicas comparables a una leche pasteurizada de forma térmica (72°C-15 s) cuando se aplican presiones entre 400 y 600 MPa. (Capellas y col., 1996; Mussa y Ramaswamy, 1997; Buffa y col., 2001a; Guamis y col., 2005). Pero no es posible obtener leche esterilizada, debido a la resistencia de las esporas bacterianas a esas presiones, excepto que se combinen los tratamientos APH con altas temperaturas.

6.5.2. Producción de quesos con leche tratada con APH

Como se ha mencionado en la sección anterior, el tratamiento con APH puede ser utilizado para asegurar la calidad microbiológica de la leche que se utilizará para la elaboración de los quesos, ya que presenta sobre los microorganismos patógenos y alteradores un efecto comparable a la pasteurización térmica. También se ha mencionado que el tratamiento con APH de la leche, causa modificaciones en las proteínas presentes en la misma, tales como desnaturalización de las proteínas solubles, disrupción de las micelas de caseína, y alteración del equilibrio mineral. Teniendo en cuenta esto, se han realizado estudios para evaluar el efecto del tratamiento con APH sobre la aptitud casearia de la leche, y sobre las características de los quesos elaborados con leche tratada con APH.

El tiempo de coagulación de la leche luego de la adición del cuajo es afectado por el tratamiento con APH. Zobrist y col. (2005) demostraron que la aplicación de tratamientos a 100 y 250 MPa a leche descremada redujo significativamente el tiempo de coagulación comparado con el de muestras no tratadas. A su vez, la aplicación de un nivel de presión de 400 MPa no produjo diferencias con el control, mientras que un nivel de presión de 600 MPa aumentó significativamente el tiempo de coagulación. El efecto del tratamiento con APH sobre el tiempo de coagulación, se postuló que sucedía por dos mecanismos diferentes: la disrupción de las micelas de caseína, y la desnaturalización de las proteínas del suero (Huppertz y col., 2005). Se considera que a presiones entre 100 y 300 MPa, predomina el primer mecanismo, debido a que se produce una disociación de las moléculas de caseína κ desde las micelas, desestabilizando la suspensión coloidal y favoreciendo la coagulación (Needs y col., 2000; Huppertz y col., 2005; Zobrist y col., 2005). A presiones mayores a 400 MPa, se cree que predomina el segundo mecanismo, por el cual la β -lactoglobulina

desnaturalizada, se asocia a micelas de caseína, incrementando el tiempo de coagulación de manera similar a lo que ocurre a causa del tratamiento térmico. A presiones de 600 MPa, se postula que el tiempo de coagulación aumenta como consecuencia de la disrupción de las micelas de caseína que lleva a una mayor área disponible para interactuar con las proteínas de suero desnaturalizadas (Needs y col., 2000; Zobrist y col., 2005). En leche de cabra tratada a 500 MPa, también se observó un aumento del tiempo de coagulación, lo que fue asociado a este mecanismo (Buffa y col., 2001b)

En varias investigaciones, se verificó que el tratamiento con APH produjo un incremento en la firmeza del coágulo y en la velocidad a la cual esta se adquiere (Needs y col., 2000; Buffa y col., 2001b; Huppertz y col., 2005; Zobrist y col., 2005). Este efecto se ha atribuido a una mayor área disponible en las micelas para interactuar entre sí como consecuencia de la disrupción.

Por otro lado, el tratamiento de la leche con APH previo a la elaboración de los quesos produjo un mayor rendimiento quesero comparado con quesos elaborados con leches no tratadas (Trujillo y col., 1999; Huppertz y col., 2004; San Martín-González y col., 2007; Voigt y col., 2012). Los quesos elaborados con leche tratada con APH presentaron además mayor contenido de humedad y menor pérdida de proteínas en el suero. Este efecto fue atribuido a la incorporación en la cuajada de proteínas solubles desnaturalizadas por acción de la presión (Huppertz y col., 2004). En cuanto al mayor contenido de humedad, esto puede deberse a que el tratamiento con APH produjo una mayor hidratación de las micelas de caseína.

En relación a la textura, estudios de compresión uniaxial realizados por Buffa y col. (2001c) en quesos de cabra elaborados con leche tratada con APH (500 MPa, 15 min), demostraron que los quesos tratados con APH fueron más firmes y menos fracturables que los quesos elaborados con leche pasteurizada térmicamente, pero no se diferenciaron de los quesos elaborados con leche cruda. Las diferencias fueron menos notables al final de la maduración. En este mismo trabajo, se estudió la microestructura de los quesos, y se observó que los quesos tratados con APH presentaron una estructura más regular y una matriz proteica más compacta, con glóbulos grasos más pequeños y uniformes que los quesos elaborados con leche cruda.

En un estudio realizado en queso Cheddar elaborado con leche tratada con APH (400 y 600 MPa, 10 min), en el cual la textura fue analizada a través de un ensayo de TPA, se observó que los quesos elaborados con leche tratada a 400 MPa presentaron a los 21 días de maduración mayores valores para todos los parámetros evaluados (dureza, gomosidad y masticabilidad) con respecto a los elaborados con leche cruda y tratada a 600 MPa. A los 180 días, los parámetros evaluados fueron menores en todos los quesos elaborados con leche tratada a 600 MPa, comparado con los elaborados con leche cruda y tratada a 400 MPa. Estos quesos elaborados con leche tratada a la mayor presión, tuvieron mayor proteólisis, por lo tanto los autores atribuyeron a esto los cambios observados en la textura (Voigt y col., 2012)

En quesos Brie, se observó que los quesos elaborados con leche tratada con APH (500 MPa 15 min) tuvieron características sensoriales diferentes a los elaborados con leche cruda o pasteurizada térmicamente. No obstante, la calidad sensorial fue considerada aceptable por el panel (Voigt y col., 2011). Tampoco se encontraron diferencias sensoriales cuando se compararon quesos de cabra elaborados con leche cruda, tratada con APH (500 MPa 15 min) o pasteurizada (Buffa y col., 2001d)

6.5.3 Efecto del tratamiento con APH sobre el queso ya elaborado

6.5.3.1 Efecto sobre los microorganismos

En quesos, se ha estudiado el impacto de tratamientos APH luego de la elaboración sobre los microorganismos patógenos, microorganismos del fermento y sobre las NSLAB.

En relación a los microorganismos patógenos, la mayoría de los estudios se han realizado en quesos que se elaboran con leche cruda, en los cuales no se aplica previamente ningún tratamiento térmico para eliminar esta microbiota. En estos quesos, la aplicación de la tecnología APH puede ser utilizada para asegurar la inocuidad de los mismos. En general se ha observado que el tratamiento con APH causa una mayor inactivación de microorganismos en quesos de bajo pH y elevada a_w (Martínez - Rodríguez y col., 2012). Se ha estudiado el efecto del tratamiento con APH sobre la inactivación de *Staphylococcus aureus*, en quesos frescos elaborados con leche cruda que se consumen con poco tiempo de maduración. Para ello, se elaboraron quesos con

leche pasteurizada inoculada posteriormente con diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, utilizando una concentración aproximada del inóculo expresada en \log_{10} UFC/g de 7,5. Luego de las 24 hs de elaboración, los quesos fueron tratados a 300, 400 y 500 MPa durante 10 min a 5 y 20°C. Se observó que la aplicación de 500 MPa durante 10 min a 5°C fue la más eficiente para reducir los recuentos a los 30 días de maduración, a valores de $6 \pm 0,1$ y $4,7 \pm 0,5 \log_{10}$ UFC/g dependiendo de la cepa estudiada. Sin embargo, el tratamiento no produjo efectos sobre la producción de enterotoxinas (López-Pedemonte y col., 2007). Gallot-Lavallée (1998) estudió la eficacia del tratamiento con APH para inactivar *Listeria monocytogenes* en queso de cabra elaborados con leche cruda. En este estudio se observó que un tratamiento de 450 MPa durante 10 min o 500 MPa durante 5 min a 11°C redujo los recuentos 5,6 ciclos logarítmicos, sin afectar las características sensoriales del queso. También se evaluó el efecto del tratamiento con APH (450 y 500 MPa 10 y 15 min) sobre *Listeria innocua* en quesos de oveja elaborados con leche pasteurizada inoculada posteriormente con este microorganismo (Gervilla y col., 1997). En este caso, se verificó un mayor efecto cuando el tratamiento con APH se aplicó a baja temperatura (2°C), comparando con la aplicación a temperatura ambiente. Capellas y col. (1996) también observaron una disminución de 7 ciclos logarítmicos en el número de *Escherichia coli* cuando se aplicaron tratamientos de 400 y 500 MPa durante 5 y 15 min a queso fresco de cabra. Estos autores, también verificaron el efecto sobre *Staphylococcus carnosus*, que es más resistente al tratamiento con APH que *Escherichia coli*. En efecto, el tratamiento que fue efectivo para inactivar totalmente a *Escherichia coli*, solo redujo la población de *Staphylococcus carnosus* en 2 ciclos logarítmicos. En otro estudio se probó sobre este último microorganismo el efecto de la aplicación de un tratamiento más severo (500 MPa, 5 min, a 50°C), verificándose una reducción de 7 ciclos logarítmicos (Capellas y col., 2000). Sin embargo, el tratamiento a 50°C produjo una textura no aceptable en el queso. En queso de cabra Ibores, el cual se elabora con leche cruda, se aplicaron tratamientos a 400 y 600 MPa durante 7 min a los 60 y 90 días de maduración del queso. Se observó que los recuentos de microorganismos mesófilos, Enterobacteriaceae (indicadores de higiene) y *Listeria* spp. fueron reducidos luego del tratamiento con APH, en comparación con los recuentos observados en los quesos no tratados, siendo mayor la reducción en el caso de los quesos tratados a 600 MPa, tanto en los tratados a los 60 como a los 90 días de maduración (Delgado y col., 2013).

En cuanto a los recuentos de las bacterias del fermento, se ha observado que en quesos madurados por hongos, en un fermento compuesto por bacterias ácido lácticas y *Penicillium roqueforti*, el tratamiento con APH (400 y 600 MPa, 10 min, 20°C) produjo la reducción de todos los microorganismos presentes, aumentando el efecto letal al elevar el nivel de presión (Voigt y col., 2010). También fueron observadas reducciones de los recuentos de bacterias del fermento luego de tratamientos con presiones próximas o superiores a 400 MPa en quesos Cheddar, con fermentos compuestos por diferentes cepas de *Lactococcus lactis* (O'Reilly y col., 2002; Wick y col., 2004; O'Reilly y col., 2008; Ozturk y col., 2013a; Ozturk y col., 2013b), en quesos de oveja cuyo fermento estaba compuesto por cepas de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Moschopoulou y col., 2010), en quesos de cabra en los cuales el fermento está integrado por diferentes cepas de *Lactococcus lactis* (Saldo y col., 2000; Novella-Rodriguez y col., 2002) y en quesos Brie en los cuales el fermento estaba compuesto por un cultivo láctico mesófilo y por *Penicillium camemberti* (Calzada y col., 2014). El nivel de presión es una variable de gran influencia en el efecto del tratamiento sobre la carga microbiana. Como ejemplo, en quesos de oveja se observó que tratamientos a 200 MPa no produjeron una disminución del recuento de bacterias mesófilas totales, en comparación con los quesos controles, sin embargo, a 500 MPa se observó una disminución significativa (Moschopoulou y col., 2010). También en quesos Cheddar se observó que presiones por debajo de 200 MPa fueron insuficientes para causar una reducción significativa del número de microorganismos del fermento comparado con los controles (Ozturk y col., 2013a, Wick y col., 2004). En comparación con el efecto del nivel de presión, el tiempo de mantenimiento de la presión mostró poca influencia sobre los recuentos de microorganismos del fermento (Ozturk y col., 2013a, Wick y col., 2004). En quesos Cheddar que se elaboraron utilizando diferentes concentraciones de sal, se observó que al disminuir dicho contenido, se incrementaba el efecto de la presión sobre la reducción de los microorganismos del fermento, lo que se atribuyó a un aumento de la actividad de agua al reducir la concentración de sal, efecto que mejora la eficacia del tratamiento con APH (Ozturk y col., 2013b). La matriz del queso juega un papel protector sobre el efecto del tratamiento con APH sobre los microorganismos. Al respecto, se ha demostrado que aplicando presiones entre 100 y 400 MPa por 20 min a 25°C en buffer

citrato y en quesos Cheddar, la disminución de los recuentos fue menor en los quesos comparado con el efecto observado en buffer (O'Reilly y col., 2002).

En los estudios en los cuales se evaluó el efecto de las APH sobre las NSLAB en diferentes variedades de quesos, también se verificó una reducción de las mismas, cuando la presión aplicada fue igual o mayor a 400 MPa (Novella-Rodriguez y col., 2002, Wick y col., 2004; Rynne y col., 2008; Moschopoulou y col., 2010, Ozturk y col., 2013). También en quesos de oveja tratados a 300 MPa se observó la reducción del recuento de las NSLAB comparando con los quesos controles (Juan y col., 2007). Como se mencionó en la sección 4.2.1, en el conjunto de las NSLAB, los lactobacilos forman el grupo más frecuentemente encontrado en quesos (De Angelis y col., 2001; Beresford y col., 2003).

6.5.3.2 Efecto sobre la composición y el pH

El tratamiento con APH no ha afectado el contenido de grasa y proteínas de distintas variedades de quesos sometidos a diferentes combinaciones de presión y tiempo de mantenimiento (Messens y col., 1998; Capellas y col., 2001; Saldo y col., 2002; Juan y col., 2004; Serrano y col., 2004; Sheehan y col., 2005; Juan y col., 2008; Rynne y col., 2008; Moschopoulou y col., 2010; Koca y col., 2011; Ozturk y col., 2013 a y b). En la mayoría de esas investigaciones, el contenido de humedad tampoco fue modificado por el tratamiento con APH. Sin embargo, en un trabajo publicado por Koca y col., en el cual se aplicó presiones de 50, 100 200 y 400 MPa por 5 y 15 min la humedad de los quesos tratados a mayor presión fue mayor al final de la maduración. Este mismo efecto fue observado en queso de cabra a los cuales se les aplicó una presión de 400 MPa durante 5 min (Saldo y col., 2000) y en quesos de oveja tratados a 400 y 500 MPa durante 10 min (Juan y col., 2007). Estos autores atribuyeron este mayor contenido de humedad al final de la maduración en los quesos tratados con APH a que el tratamiento podría conducir a la formación de una red de proteínas diferente, que interactúa mejor con el agua, por lo que el contenido de agua retenida por la matriz proteica es mayor, a pesar de partir del mismo contenido de humedad inicial que los quesos controles. Esto llevaría a pensar que a lo largo de la maduración, las pérdidas de humedad serían mayores en los quesos controles.

En relación al pH, varios autores encontraron diferencias atribuibles al tratamiento con APH. En este sentido, Rynne y col. (2008) informaron que quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min al día posterior a la elaboración, tuvieron un pH superior a los controles, a lo largo de todo el periodo de maduración. En este mismo tipo de queso, se observó un efecto lineal positivo de la presión sobre el pH, al variar la presión entre 50 y 400 MPa durante 5 y 20 min (Ozturk y col., 2013). Este mismo efecto fue informado para queso Mozzarella (Sheehan y col., 2005) y queso de cabra (Saldo y col., 2002) tratados a 400 MPa durante 5 min, y en quesos de oveja tratados a 300 MPa 10 min (Juan y col., 2008). El aumento del pH en los quesos tratados con APH ha sido asociado a varios factores, entre los que se incluye: 1- un incremento de la disociación de los grupos ionizables (por ejemplo grupos carboxilos) de los sistemas proteicos, lo cual cambia la concentración de hidrogeniones libres, y por lo tanto el pH; 2- la inactivación de las bacterias del fermento antes de que se complete la acidificación (Sheehan y col., 2005; Rynne y col., 2008). En quesos Gouda tratados a 300 MPa durante 6 min, se observó un aumento de pH el cual revirtió luego de 14 días de maduración, tiempo en el cual el valor de pH de las muestras presurizadas se igualó al de los quesos controles (Messens y col., 1998). Un resultado similar fue observado por Garde y col. (2007) en quesos de oveja La Serena elaborados con leche cruda, en los cuales se aplicó un tratamiento con APH de 300 y 600 MPa durante 10 min. Ellos encontraron que al inicio de la maduración, los quesos tratados tuvieron mayores pH comparados con el control, siendo mayor el efecto en los quesos tratados a 600 MPa, pero al final de la maduración, los quesos tratados y controles no se diferenciaron en el valor del pH. Este efecto reversible fue asociado a una liberación temporaria de fosfato de calcio coloidal a la fase acuosa del queso (Messens y col., 1998). En una variedad de queso Turco semiduro madurado en salmuera, en los cuales se aplicaron diferentes combinaciones de presión y tiempo (50, 100 200 y 400 MPa por 5 y 15 min) (Koca y col., 2011) no se observaron cambios en el pH atribuibles al tratamiento con APH. La misma falta de efecto en el pH debido al tratamiento con APH se observó en queso de oveja madurado en salmuera (Moschopoulou y col., 2010). Estos autores atribuyen la falta de efecto al hecho de que el pH de estos quesos es de aproximadamente 4,6. A esos valores de pH, el fosfato de calcio coloidal es transferido al suero como calcio iónico antes del tratamiento con APH, lo que explica la falta de diferencia entre los quesos tratados y controles. Los mismos valores de pH fueron determinados en los quesos

estudiados por Koca y col. (2011), lo que explica el igual efecto del tratamiento con APH. En el estudio de Garde y col. (2007) se realizó además la aplicación del tratamiento con APH luego de transcurridos 50 días de maduración, en este caso no se verificó efecto del tratamiento sobre los valores de pH, ya que para ninguna presión el pH de los quesos tratados se diferenció del correspondiente a los controles. Lo mismo fue observado en el estudio de Juan y col. (2008) cuando el tratamiento con APH se realizó luego de 15 días de maduración. En quesos azules madurados por hongos, en los cuales el tratamiento se aplicó en estadios más avanzados de la maduración, luego de transcurridos 42 días posteriores a la elaboración, se observó que los quesos tratados a 400 y 600 MPa tuvieron menor pH que los controles (Voigt y col., 2010). Estos trabajos ponen de manifiesto la influencia del tiempo de maduración al cual se aplica el tratamiento con APH sobre los efectos observados.

6.5.3.3 Efecto sobre la microestructura

Existen algunos estudios que informan acerca de cambios en la microestructura de quesos tratados con APH, basados en la aplicación de microcopía confocal láser de barrido. En quesos de cabra en los cuales se aplicó una presión de 50 MPa durante 72 hs, se observó una distribución más regular del tamaño de los ojos mecánicos, una red proteica más continua y menor cantidad de espacios vacíos que en los quesos controles. A su vez, en los controles se observó una estructura similar a un bizcocho esponjoso, con muchos ojos mecánicos y glóbulos grasos de diferentes formas y tamaños. En un estudio realizado por O'Reilly y col. (2003) en quesos Cheddar se encontró que los quesos tratados a 350 MPa durante 70 hs, presentaron una estructura más compacta, en la cual las proteínas formaron una red más densa, que emulsionó mejor la grasa. El suero se hallaba absorbido en esa densa matriz, hidratando la matriz proteica. A su vez, en quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min no se encontraron diferencias entre los quesos tratados y controles (Rynne y col., 2008). En queso Cheddar reducido en grasa, a 225 MPa durante 11 min se observó que los glóbulos de grasa fueron apenas visibles, mientras que el tratamiento a 402 MPa durante 11 min redujo aún más su tamaño. Los autores indicaron que el tratamiento con APH podría haber dispersado la grasa entre la matriz proteica, por ello los glóbulos de grasa individuales fueron menos visibles con el aumento de la presión (Ozturk y col., 2013a). En queso Mozzarella, la aplicación de presiones superiores a 350 MPa produjo quesos con una matriz proteica

continua y homogénea, y redujo el tamaño de canales de grasa y suero (O'Reilly, y col., 2002). En quesos semiduros madurados en salmuera, se observó que inmediatamente luego del tratamiento con APH, los quesos tratados a presiones superiores a 200 MPa mostraron una matriz proteica más compacta, con menos ojos y con glóbulos grasos más pequeños, y más uniformemente distribuidos en la matriz proteica en comparación con los quesos controles (Koca y col., 2011).

6.5.3.4 Efecto sobre proteólisis

El interés en estudiar el efecto del tratamiento con APH sobre la proteólisis de quesos, se inició en parte por los prometedores resultados presentados en la patente de Yokohama y col. (1992), en la cual se evidenció que quesos Cheddar que fueron expuestos a presiones de 50 MPa durante 3 días a 25°C, presentaron una concentración de aminoácidos libres y un flavour comparable a quesos comerciales con 6 meses de maduración. A partir de este estudio, comenzaron a realizarse otras investigaciones, en quesos Cheddar (O'Reilly y col., 2000, O'Reilly y col., 2001), Gouda (Messens y col., 1999), y queso duro de cabra (Saldo y col., 2001), utilizando tratamientos similares a las aplicados por Yokohama y col. Estos trabajos en su mayoría concluyeron que las combinaciones presión - tiempo aplicadas tuvieron un efecto menor sobre la maduración de los quesos. Esto en parte fue atribuido a que en el trabajo de Yokohama y col. además del tratamiento con APH, los autores utilizaron dosis de bacterias del fermento aproximadamente diez veces mayor que las frecuentemente utilizadas para la elaboración de queso Cheddar, lo que seguramente influyó en la aceleración de la maduración observada.

Posteriormente comenzaron a plantearse nuevos estudios, en diferentes variedades de queso, variando las combinaciones presión-tiempo, y evaluando el impacto sobre diferentes aspectos relacionados a la maduración de quesos. En quesos Cheddar se estudiaron diferentes niveles de presión (entre 50 y 400 MPa) y tiempos de mantenimiento de la presión extensos (entre 3,5 y 81,5 hs) o cortos (menores a 20 min) (O'Reilly y col., 2000a, O'Reilly y col., 2002; O'Reilly y col., 2003). Se observó que en general, los niveles de presión más bajos (entre 50 y 200 MPa) combinados con tiempos extensos (82 hs) principalmente impactaron sobre la velocidad de proteólisis, mientras que presiones más elevadas (entre 200 y 400 MPa) durante tiempos cortos (20 min) causaron cambios en la estructura de las proteínas, mejorando las propiedades

funcionales de estos quesos. Además se observó que los días transcurridos desde la elaboración de los quesos hasta la aplicación del tratamiento APH también influía en los resultados. Así, se verificó que los efectos fueron más notorios en términos de acelerar la proteólisis cuando el tratamiento con APH se aplicó el día después al de la elaboración en comparación a los quesos tratados con APH a los 15 días posteriores a la elaboración (O'Reilly y col., 2000a). También en el estudio de O'Reilly y col. (2003) se observó que la temperatura de tratamiento tuvo un efecto significativo sobre los resultados. En este estudio, los tratamientos con APH se realizaron a 8°C y a 25°C, verificándose que el tratamiento a 25°C resultó más efectivo para incrementar los niveles de proteólisis en los quesos.

Sin embargo, resulta necesario enfatizar que los resultados son muy variables. También en queso Cheddar, en un estudio en el cual se emplearon presiones entre 200 y 800 MPa durante 5 min, no se observó incremento en los niveles de aminoácidos libres para ninguno de los niveles de presión aplicados. Incluso se verificó un efecto contrario, ya que los quesos tratados a presiones mayores a 400 MPa mostraron niveles de aminoácidos libres inferiores que los quesos tratados a menor presión y que el control. Estos autores concluyeron que el tratamiento con APH a presiones mayores a 400 MPa, retrasó o enlenteció la maduración de los quesos. Se debe tener en cuenta que en este caso, el tratamiento fue aplicado luego de un mes de elaboración de los mismos (Wick y col., 2004). En esta misma variedad de queso, se realizaron estudios aplicando un tratamiento de 400 MPa durante 10 min, al día siguiente de la elaboración de los quesos (Rynne y col., 2008), evidenciándose muy poco efecto sobre la proteólisis primaria y ningún efecto sobre el nivel de aminoácidos libres en comparación con los quesos controles. En quesos Cheddar reducidos en materia grasa, en los cuales el tratamiento se aplicó a los 7 días posteriores a la elaboración, utilizando presiones entre 50 y 400 MPa y tiempos de mantenimiento entre 5 y 20 min, la velocidad de la proteólisis no fue modificada. Se observaron diferencias en la textura en los quesos que se trataron a presiones mayores a 225 MPa, presentando estos quesos mejoras en la misma: textura menos firme, con mejor capacidad de derretimiento (Ozturk y col., 2013a). Tampoco se encontraron modificaciones en los indicadores de la proteólisis cuando se aplicó una presión de 405 MPa durante 3 min a quesos Cheddar con concentraciones de sal normales y reducidas una semana posterior a la elaboración. Sin embargo en estos quesos se observaron menores recuentos de los microorganismos del fermento y de las

NSLAB y modificaron algunas propiedades texturales y reológicas (Ozturk y col., 2013b). En otra variedad de queso duro no cocido, en el que se aplicaron presiones entre 200 y 500 MPa durante 10 min el día posterior a la elaboración, se verificó un aumento en la velocidad de proteólisis principalmente en los quesos que fueron tratados a 300 MPa (Yang y col., 2014). En queso Mozzarella, la aplicación de un tratamiento a 400 MPa durante 5 min el día siguiente de la elaboración no tuvo efectos sobre la proteólisis (Sheehan y col., 2005). Tampoco se evidenció un aumento de la proteólisis en queso Gouda, en los cuales el rango de presión aplicada estuvo entre 50 y 400 MPa durante 20 a 100 min y los tratamientos fueron aplicados el día posterior a la elaboración de los quesos (Messens y col., 1999). En quesos Edam, la aplicación de un nivel de presión entre 200 y 500 MPa durante 30 min a los quesos recién salidos de la etapa de salado y luego de 4, 6 y 8 semanas de maduración no modificó la velocidad de la proteólisis, aunque se evidenciaron mejoras en la consistencia de los quesos (Iwaczak y Winiewska, 2005). En quesos duros de cabra, se observó que un tratamiento a 400 MPa aplicado el día siguiente a la elaboración, aumentó la velocidad de proteólisis, produciéndose modificaciones en la composición de los quesos con respecto a los controles (Saldo y col., 2002). En quesos de oveja, la aplicación de un tratamiento a 300 MPa durante 10 min el día posterior al de la elaboración, produjo un incremento en la velocidad de proteólisis, mayores niveles de aminoácidos libres y una mejora en la textura de los quesos en comparación a los controles (Juan y col., 2008). En otra variedad de queso semiduro de oveja, denominado La Serena, se observó que un tratamiento de 300 ó 400 MPa durante 10 min a los dos días posteriores a la elaboración, produjo un retraso en la proteólisis primaria, lo que se verificó por una menor hidrólisis de la caseína α_{s1} . Sin embargo, se observó una aceleración de la proteólisis secundaria, demostrada por mayores niveles de aminoácidos libres en los quesos tratados comparados con los controles (Garde y col., 2007). En este estudio, también se trataron con APH quesos de 50 días de maduración, sin verificar efectos sobre la proteólisis. También han sido objeto de estudio quesos con hongos, tales como el Brie y quesos azules, en los cuales se aplicaron presiones de 400 y 600 MPa, durante 5 y 10 min respectivamente. En ambos quesos se evidenció una disminución de la población microbiana en general, y modificaciones en la proteólisis y en el flavour de los quesos tratados con respecto a los controles (Calzada y col., 2014; Voigt y col., 2010). En los quesos Brie el tratamiento se

aplicó a los 14 y 21 días posteriores a la elaboración, mientras que en los quesos azules, el mismo fue aplicado a los quesos con 42 días de maduración.

Como se observa, existe una gran diversidad de resultados, dependiendo del tipo de queso evaluado, y de las condiciones y del momento de aplicación del tratamiento APH, el mismo puede acelerar o enlentecer la proteólisis.

Según fue mencionado en la sección 4.2.1, la plasmina y el coagulante residual son enzimas que intervienen activamente en el proceso de proteólisis, particularmente en la proteólisis primaria. Por esta razón, algunos estudios han evaluado el efecto del tratamiento con APH sobre la actividad de estas enzimas en los quesos. En este sentido Saldo y col. (2002) observaron en quesos de cabra tratados a 400 MPa que la actividad de la plasmina no fue modificada, aunque se evidenció una disminución en la actividad de la enzima coagulante residual. En quesos Cheddar tratados a 400 MPa se observó la misma falta de efecto sobre la actividad de la plasmina, mientras que la actividad del coagulante residual tampoco resultó afectada por el tratamiento con APH. Huppertz y col. (2004) evaluaron la actividad de ambas enzimas en queso Cheddar, utilizando presiones de 200, 400, 600 y 800 MPa, en un rango de tiempo entre 0-60 min, a 8, 20 y 30 °C. En el caso de tiempo 0, los quesos fueron comprimidos e inmediatamente descomprimidos, sin tiempo de mantenimiento. En este estudio, se observó que la actividad de plasmina disminuyó significativamente en comparación con el control, cuando se utilizaron presiones de 600 y 800 MPa, durante tiempos mayores a 15 min, a temperaturas de 20 y 30°C. En cuanto a la actividad del coagulante residual los autores encontraron que el tratamiento con APH produjo la inactivación de esta enzima a presiones mayores a 400 MPa. En estudios en queso de oveja, en los cuales se aplicaron presiones de 200, 300, 400 y 500 MPa durante 10 min a los quesos al día siguiente de la elaboración y a los 15 días de maduración, se encontró que en los quesos en los cuales el tratamiento se aplicó al día siguiente a la elaboración, la actividad del coagulante residual fue reducida significativamente con respecto al control y a los otros tratamientos cuando se aplicó una presión mayor o igual a 400 MPa. A su vez, cuando los tratamientos con APH se aplicaron a los 15 días de maduración, no se observaron diferencias entre los diferentes tratamientos y el control (Juan y col., 2007). En este mismo estudio, la actividad de la plasmina no resultó afectada por ninguno de los tratamientos aplicados. En los estudios comentados en los párrafos anteriores, la actividad de la plasmina y del coagulante residual fueron cuantificados por ensayos

sobre sustratos específicos (Saldo y col., 2002; Huppertz y col., 2004; Juan y col., 2007). En otros trabajos, algunos autores discuten las actividades de estas enzimas basándose en el análisis de sus productos de reacción (fracciones de nitrógeno solubles o perfiles electroforéticos) (Messens y col., 1999; O'Reilly y col., 2002).

6.5.3.5 Efecto sobre propiedades texturales, parámetros cromáticos y características sensoriales

La textura y color de quesos tratados por APH han sido estudiados por métodos instrumentales y mediante paneles.

En relación a la textura, Wick y col. (2004) realizaron un estudio con queso Cheddar a los cuales se aplicaron presiones entre 200 y 800 MPa durante 5 min luego de 1 ó 4 meses de maduración. Los autores informaron que los tratamientos con APH aplicados a los quesos luego de 1 mes de maduración, a presiones iguales o menores a 300 MPa tuvieron poco efecto sobre las propiedades texturales de los quesos, evaluadas a través de ensayos de compresión uniaxial. Los quesos tratados a presiones de 400, 500 y 800 MPa mostraron una deformación a la fractura significativamente superior al resto, mientras que en los quesos tratados a 800 MPa, se observaron diferencias significativas en el esfuerzo y en el trabajo a la fractura con respecto a los otros quesos a partir de los 70 días de maduración, presentando para ambos parámetros valores superiores que el resto de los quesos. Los autores relacionaron estas diferencias con una maduración más lenta en los quesos tratados a esa presión (Wick y col., 2004). Por otro lado, la aplicación del tratamiento a los 4 meses de maduración, no tuvo efecto sobre las propiedades texturales, a excepción del esfuerzo a la fractura, el cual se incrementó en los quesos tratados con APH al final de la maduración (196 días). En este mismo tipo de quesos, un tratamiento a 400 MPa durante 10 min luego de 1 día de maduración de los quesos (Rynne y col., 2008) no afectó la firmeza de los mismos aunque se observó un incremento en la deformación y en el esfuerzo a la fractura a lo largo de los 180 días de maduración evaluados. Al igual que en este estudio, en queso semiduro de oveja tratado a 300 MPa durante 10 min, se observó un incremento en la deformación y en el esfuerzo a la fractura en los quesos tratados con APH con respecto a los controles, con la diferencia que el mayor valor de esfuerzo a la fractura se verificó solamente al inicio de la maduración, igualándose al control a medida que el tiempo de maduración avanzó (Juan y col., 2008). En otro estudio realizado en queso Cheddar en el cual se aplicó un

tratamiento con APH de 405 MPa durante 3 min (Ozturk y col., 2013b), se evaluó la textura a través del ensayo TPA. Se observó que la dureza de los quesos tratados con APH fue menor que en los quesos controles, pero solamente al inicio de la maduración, sin encontrar diferencias significativas luego de 1 mes de maduración. En queso Cheddar reducido en grasa, se realizó un estudio aplicando diferentes combinaciones presión-tiempo (rango de presión de 50 a 400 MPa, durante un rango de tiempo de 5 a 20 min) (Ozturk y col., 2013a). La textura fue evaluada a través de ensayos de compresión uniaxial y de TPA. Se observó que el incremento de la presión, a partir de 225 MPa, produjo una disminución de la dureza de los quesos, siendo este efecto observado durante todo el período de maduración. En el ensayo de compresión uniaxial, los quesos tratados con APH tuvieron un mayor valor de deformación a la fractura. Resultados similares, por medio de un ensayo de TPA, fueron observados en queso Gouda (Messens y col., 2000), donde se observó que los quesos tratados a 225 y 400 MPa presentaron menor dureza y fractura no visible. Al igual que en el estudio de Ozturk y col. (2013b) el efecto sobre la dureza fue más notorio al inicio de la maduración, igualándose los valores a los controles al final de la misma. A su vez en este estudio se observó una mayor cohesividad de los quesos Gouda tratados a 225 y 400 MPa aunque solamente al inicio de la maduración. La elasticidad no resultó afectada por el tratamiento con APH (Messens y col., 2000). En otro estudio en queso Gouda, la aplicación de las mismas presiones produjo resultados similares en cuanto a dureza y cohesividad, pero no al inicio sino a los 20 días de maduración, y las diferencias se mantuvieron en el tiempo, principalmente en los quesos presurizados a 400 MPa (Liu y col., 2011). En queso Mozzarella, una presión de 400 MPa durante 5 min no afectó la firmeza ni el esfuerzo a la fractura de los quesos tratados en comparación con los quesos controles (Sheehan y col., 2005). En una variedad de queso Turco semiduro madurado en salmuera, se aplicaron diferentes combinaciones de presión y tiempo (50, 100, 200 y 400 MPa por 5 y 15 min) (Koca y col., 2011). En este estudio se observaron que los cambios más relevantes en la textura, evaluada mediante ensayo de TPA, se produjeron en los quesos tratados a 200 y 400 MPa, principalmente en los tratados durante 15 min. En efecto, los quesos tratados a 200 durante 15 min y todos los tratados a 400, presentaron menores valores de dureza, elasticidad, gomosidad y masticabilidad. Saldo y col. (2001) también encontraron menor elasticidad en los quesos tratados con APH (50 MPa-72 hs) que en los controles. En un trabajo realizado

con queso Brie, se aplicaron tratamientos a 400 ó 600 MPa durante 5 min luego de 2 ó 3 semanas posteriores a la elaboración. En este estudio se observó que la textura se mantuvo más firme a lo largo de la maduración en los quesos en los cuáles el tratamiento con APH se aplicó a las 2 semanas, en relación a la textura de los quesos controles. En efecto, estos quesos presentaron durante la maduración mayor esfuerzo a la fractura, elasticidad y firmeza que los quesos controles. Por el contrario, en los quesos en los cuáles el tratamiento se aplicó a las 3 semanas, se evidenció una rápida declinación en los parámetros de textura con el avance de la maduración (Calzada y col., 2014). Estudios en queso blando de Escocia, en los cuales se aplicaron presiones inferiores a 300 MPa durante un rango de tiempo de 1 a 30 min, mostraron que al aumentar la presión, se incrementó la dureza y disminuyó la adhesividad de los quesos (Okpala y col., 2010). Juan y col. (2007b) estudiaron el efecto de tratamientos entre 200 y 500 MPa por 10 min, aplicado a 1 día ó 15 días posteriores a la elaboración en quesos semiduro de oveja. La textura fue evaluada por medio de un ensayo de compresión uniaxial. Ellos observaron que los quesos en los cuáles el tratamiento con APH se realizó a los 15 días luego de la elaboración, fueron similares al control en sus características texturales. Presiones de 200 y 300 MPa mejoraron la firmeza de los quesos, mientras que los tratados a las más altas presiones evaluadas (500 MPa) presentaron la menor fracturabilidad y rigidez. Estos autores relacionaron los resultados con una mayor capacidad de retención de agua, un mayor valor de pH y una microestructura más homogénea en los quesos tratados con APH, lo que redujo las posibles áreas de fractura al aplicar el ensayo de compresión uniaxial a los quesos. El tratamiento con APH a 300 ó 400 MPa durante 10 min a los 2 días posteriores a la elaboración, a quesos semiduros elaborados con leche de oveja denominados La Serena (Garde y col., 2007), produjo en ambos casos mayores valores de fracturabilidad, dureza y elasticidad que en los quesos controles a lo largo de toda la maduración. La mayor dureza observada en los quesos tratados con APH estaría relacionada con una menor proteólisis en los mismos comparados con los controles.

En cuanto a los parámetros cromáticos, se observó que quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min (Rynne y col., 2008) presentaron valores de a^* (verde-rojo) menores y valores de b^* (azul-amarillo) mayores en relación al control, lo que resultaría en quesos más verdosos y amarillos, sin afectar el valor de L^* (luminosidad). En quesos

semiduros madurados en salmuera, en los cuales se aplicaron diferentes combinaciones de presión (50, 100, 200 y 400 MPa) y tiempo (5 y 15 min) se observaron resultados similares a los hallados por Rynne y col. en el parámetro L^* para todas las presiones evaluadas, y en los parámetros a^* y b^* cuando se aplicaron presiones de 400 MPa durante 15 min, obteniéndose quesos que resultaron más verdosos y amarillos a esa presión (Koca y col., 2011). En queso Mozzarella, un tratamiento con APH de 400 MPa durante 5 min produjo una disminución de los parámetros L^* y b^* , y un aumento del parámetro a^* , en comparación a los quesos controles. Esas diferencias se observaron solamente al inicio de la maduración, un día luego del tratamiento con APH (Sheehan y col., 2005). Similares efectos sobre los parámetros a^* y L^* fueron observados por Saldo y col. (2001) en queso de cabra en los cuales se aplicó un tratamiento de 50 MPa durante 72 hs. A su vez, en los quesos tratados con APH el parámetro b^* aumentó. Por lo tanto, en este estudio, los quesos tratados por APH presentaron una coloración amarillo rojiza a diferencia de los quesos controles, que resultaron amarillos verdosos. En este mismo tipo de quesos, la aplicación de un tratamiento de 400 MPa durante 5 min produjo el mismo resultado (reducción del parámetro L^* , e incremento de los parámetros a^* y b^*), pero al final de la maduración, los valores se igualaron a los de los quesos controles (Saldo y col., 2002b). En otro estudio realizado en queso de cabra elaborado con leche cruda, en el cual se aplicaron tratamientos con APH de 400 y 600 MPa durante 7 min, se observó que el parámetro L^* aumentó, el parámetro a^* disminuyó, mientras que el parámetro b^* no fue afectado por los tratamientos (Delgado y col., 2013). Estas diferencias con los resultados informados por Saldo y col, pueden deberse al hecho de que en este último estudio, el tratamiento con APH se realizó a los quesos de 60 días de maduración, mientras que en las investigaciones de Saldo y col., el tratamiento se aplicó a los quesos recién elaborados. Esto refuerza la idea de que el tiempo luego de la elaboración al cual se aplica el tratamiento con APH es un factor relevante. En quesos blandos Escoceses y en quesos semiduros de oveja tratados con APH también se verificó ese aumento en el parámetro b^* (Juan y col., 2008; Okpala y col., 2010). A su vez, los quesos de oveja tratados con APH mostraron a lo largo de la maduración, un menor valor de L^* comparado con los controles, mientras que el parámetro a^* mostró un valor mayor a los controles solamente en el día 90 (Juan y col., 2008).

A excepción de lo observado en queso Mozzarella (Sheehan y col., 2005), en todos los quesos evaluados el parámetro b^* fue más elevado en los quesos tratados con APH que en los controles, por lo que el tratamiento con APH tendería a aumentar la intensidad del color amarillo en los quesos (Saldo y col., 2001; Rynne y col., 2008; Juan y col., 2008; Okpala y col., 2010; Koca y col., 2011). Esto también fue observado por medio de análisis visual mediante panel entrenado en queso fresco tratado con APH a 400 MPa durante 20 min (Sandra y col., 2004), quienes calificaron como más amarillos a los quesos tratados con APH en relación a los quesos controles.

Por lo general, los cambios en la textura y en los parámetros cromáticos evidenciados en estos estudios, fueron atribuidos por los autores a los cambios en la microestructura de los quesos debido al tratamiento con APH, los cuales fueron descritos en la sección 6.5.3.3. El tratamiento con APH produce una nueva organización de los componentes del queso, lo que conduce a una nueva estructura con características reológicas y color diferentes (Messens y col., 2000). También, como se mencionó en la sección 4.3, la textura y el color de los quesos se modifica por los cambios en la composición y por los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración de los mismos, principalmente la proteólisis (Lucey y col., 2003).

Algunos estudios evaluaron también el impacto del tratamiento con APH sobre el análisis sensorial de los quesos mediante panel entrenado, considerando los atributos diferenciales para cada tipo de queso. Rynne y col. (2008) informaron cambios en las características sensoriales de queso Cheddar tratados con APH. A los 90 días de maduración, los quesos tratados con APH tuvieron un puntaje mayor para algunos atributos sensoriales en relación a los quesos controles, pero esos atributos no fueron los indicadores de una mayor maduración. A los 180 días de maduración, se detectó en los quesos tratados con APH un puntaje inferior que en los quesos controles. En otro estudio realizado en este mismo tipo de queso, la aplicación de presiones similares no produjo cambios en las características sensoriales comparadas con el control (Ozturk y col., 2013b). En queso Cheddar reducido en grasa, en los cuales se aplicó un rango de presión entre 50 a 400 MPa, durante un rango de tiempo de 5 a 20 min se observó que presiones superiores a 350 MPa produjo en los quesos un incremento en el sabor amargo y cierto dulzor (Ozturk y col., 2013a). A su vez, un estudio realizado en queso duro, en el cual se aplicaron presiones entre 200 y 500 MPa, demostró que los quesos

tratados a 300 MPa fueron los que tuvieron el mejor puntaje para los atributos apariencia, flavour, textura y aroma (Yang y col., 2014). En queso Brie, se observó que el tratamiento con APH permitió mantener en los quesos tratados características sensoriales aceptables por más tiempo que los controles, reduciendo el sabor amargo (Calzada y col., 2014). Contrariamente, quesos de oveja tratados a 300 ó 400 MPa durante 10 min al inicio de la maduración (Garde y col., 2007; Juan y col., 2008) se diferenciaron negativamente en cuanto a las características sensoriales sabor y aroma comparados con los controles. Como se mencionó en la sección 6.5.3.1 de esta introducción, el tratamiento con APH puede alterar el balance entre microorganismos vivos, muertos o que sufrieron lisis en los quesos, afectando además la actividad de las enzimas microbianas, lo que modificaría o limitaría la formación de los compuestos volátiles que son responsables del sabor y aroma de las diferentes variedades de quesos. Esto se ha observado en varios estudios en los cuales se evalúan los compuestos volátiles generados durante la maduración en quesos controles y tratados con APH (Ávila y col., 2006; Juan y col., 2007b; Voigt y col., 2010; Delgado y col., 2011; Evert-Arraigada y col., 2013; Calzada y col., 2014).

Como se observa según la información publicada por diferentes autores, el efecto del tratamiento con APH sobre textura, parámetros cromáticos y atributos sensoriales depende del tipo de queso evaluado, de las condiciones de presión y tiempo aplicadas y del momento luego de la elaboración del queso en el cual se aplica el tratamiento con APH.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este Trabajo de Tesis consistió en acelerar la proteólisis y peptidólisis de queso Reggianito Argentino durante la maduración.

Para ello, se aplicaron dos estrategias tecnológicas:

- Incremento de la actividad de enzimas proteolíticas no microbianas - nativas o habitualmente presentes en el queso - por modificación de la temperatura de cocción y ensayo de dos coagulantes diferentes
- Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas.

Objetivos específicos

- Validar dos modelos de queso Reggianito para ser utilizados en las experiencias de la tesis
 - Determinar la influencia de la temperatura de cocción sobre la actividad de plasmina y de quimosina y su efecto sobre la proteólisis, durante la maduración del queso Reggianito Argentino
 - Investigar si existen diferencias en la influencia de la temperatura de cocción sobre quimosina bovina producida por fermentación y quimosina de camello producida por fermentación, y la proteólisis de quesos elaborados con dichos coagulantes.
 - Conocer el impacto de la tecnología APH en la composición, carga microbiana, actividad de plasmina y quimosina y en la proteólisis y peptidólisis de quesos Reggianito Argentino durante la maduración.
 - Determinar el efecto del tratamiento con APH sobre la textura, los parámetros cromáticos y las características sensoriales del queso Reggianito Argentino

Capítulo 1

*VALIDACIÓN DE MODELOS DE QUESO DURO DE
PASTA COCIDA*

1. Introducción

El proceso de maduración de quesos consiste básicamente en la transformación de la cuajada recién elaborada, de pobres características reológicas y sensoriales, en el queso terminado, uno de los productos alimenticios máspreciado por la variedad de sus sabores, aromas y textura (Fox, 2003; Zalazar y col., 2006a). La transformación es debida fundamentalmente a cambios bioquímicos, casi todos de naturaleza enzimática, que se llevan a cabo sobre los principales componentes de la leche que han sido retenidos en la cuajada: lactosa, materia grasa y proteínas. Estos cambios están acompañados por otros de naturaleza física, que ocurren simultáneamente y en cierta forma determinan las condiciones para que sucedan los primeros. Se trata de procesos de difusión de sal y de pérdida de humedad (Fox y McSweeney, 1998). Asimismo, se han informado algunos cambios netamente químicos, como los equilibrios químicos del calcio, y reacciones químicas no catabolizadas por enzimas, fenómenos que han sido mucho menos estudiados (Walstra y col., 2001)

La mayoría de los estudios sobre la contribución de los diversos agentes de la maduración al desarrollo del flavour y la calidad del queso se han efectuado mediante ensayos de elaboraciones de queso a escala piloto (Hunter y col., 1997). Este tipo de experimentos requiere equipamiento específico y presenta una alta demanda de recursos económicos, tiempo, y personal capacitado. Asimismo, tanto la reproducibilidad como el control de las condiciones microbiológicas pueden ser difíciles de lograr a escala piloto (Martley y Crow, 1993; Chapot-Chartier y col., 1994). Sin embargo, una alternativa que permite lograr resultados reproducibles y controlar las variables de proceso, es realizar elaboraciones en miniplantas experimentales a escalas reducidas, procesando volúmenes de leche inferiores a los 200 litros. Este tipo de elaboraciones se ha implementado con muy buenos resultados en el caso de quesos duros y semiduros elaborados en el INLAIN (Zalazar y col., 1999; Candioti y col., 2002; Hynes y col., 2003; Perotti y col., 2005 Bergamini y col., 2006), y también en quesos duros de pasta cocida elaborados en el INTA EEA Rafaela (Meinardi y col., 2008; Vélez y col., 2009; Costabel y col., 2013; Audero y col., 2014). Otro aspecto a tener en cuenta en quesos duros fundamentalmente, es el extenso período de maduración. Este hecho limita significativamente el número de ensayos que pueden llevarse a cabo en un tiempo determinado. En este sentido, se han propuesto como alternativa varios sistemas modelo

para estudiar el impacto en la calidad del queso de enzimas y fermentos primarios o adjuntos, entre otros factores tecnológicos, en forma rápida y económica.

Uno de los modelos propuestos consiste en sistemas acuosos que simulan las condiciones del queso. Su principal ventaja es que varios parámetros, tales como el pH y la concentración de NaCl, pueden ser definidos más fácilmente que en el alimento; sin embargo presentan la desventaja de que no reproducen las condiciones de elaboración, ni la complejidad de los cambios medioambientales que ocurren durante la maduración. Otro modelo ampliamente utilizado son los slurries, o pastas de queso, en los que se logra una mayor aproximación a las condiciones reales que en los sistemas acuosos. Sin embargo, presentan la desventaja de que su cuerpo, textura y actividad acuosa difieren de la del queso. A pesar de que los sistemas acuosos y los slurries de quesos no reproducen las condiciones reales de elaboración y maduración, son útiles para estudiar en forma preliminar la influencia de los distintos agentes en la bioquímica de la maduración del queso (Fox y col., 1996, Milesi, 2009; Milesi, 2011; Bergamini y col. 2013)

Los modelos experimentales que mejor reproducen las condiciones reales de elaboración y maduración son los quesos elaborados a escala de laboratorio. Los quesos miniatura pueden elaborarse bajo condiciones microbiológicas controladas de una manera más sencilla que a escala piloto, y son reproducibles dado que la miniaturización permite lograr un mejor control (Shakeel-Ur-Rehman y col., 2001). Se han llevado a cabo numerosos estudios en miniquesos, con diferentes propósitos, entre ellos pueden citarse el modelo de queso miniatura para queso Cheddar (Shakeel-Ur-Rehman y col., 1998; Milesi y col., 2008), el queso de pasta lavada “Saint-Paulin” (Hynes y col., 2000), el Ch-easy® (Smit y col., 1995), queso Caciotta (Di Cagno y col., 2006), quesos de pasta blanda tipo Cremoso Argentino (Milesi, 2007), los modelos MicroCheese y ScreenCheese (Engels y col., 2012), entre otros.

En el presente capítulo se evaluó la reproducibilidad de dos modelos experimentales de queso duro de pasta cocida, utilizados posteriormente en las experiencias detalladas en los capítulos 2, 3 y 4. Para ello, se trabajó con un conjunto de tinas individuales en el INLAIN, y en una miniplanta automatizada en el INTA. En los miniquesos elaborados en las tinas paralelas del INLAIN, cada una de las tinas constituyó una unidad experimental, por lo tanto, la reproducibilidad se evaluó entre las

4 tinas. En cuanto a los quesos elaborados en el INTA, la unidad experimental fue la tina, por lo tanto, la reproducibilidad se evaluó entre diferentes elaboraciones.

2. Materiales y Métodos

2.1 Quesos miniatura– tinas paralelas

El modelo de quesos miniatura se utiliza frecuentemente en el INLAIN adaptado a variedades de pasta blanda (Milesi y col., 2007), queso duro de pasta no cocida – Cheddar (Milesi y col., 2008b) y pasta dura cocida (Aparo, 2005; Vélez y col., 2010).

La primera parte de la experimentación de este trabajo de tesis, consistió en reproducir y optimizar el modelo desarrollado por Hynes y col. para quesos duros de pasta cocida (2004a). Se realizaron 4 elaboraciones, comparando en cada una de ellas la reproducibilidad entre las tinas.

Se utilizó un conjunto de 4 tinas queseras de 5 l de capacidad, que se operan en paralelo (Figura 1.1). Para las elaboraciones se utilizó leche cruda de gran mezcla (pH $6,65 \pm 0,05$ y acidez 18 ± 1 °D) procedente de una industria láctea de Santa Fe (Milkaut SA, Franck, Argentina). En primer lugar, todo el volumen de leche (25 l) se colocó en una tina de 50 l para proceder al acondicionamiento de la misma. Se estandarizó la leche hasta una concentración de grasa de 2,5 g/100 ml, por mezcla de leche entera y leche descremada, y se pasteurizó 65°C por 20 min. Una vez que la leche se enfrió hasta la temperatura de coagulación (33°C) se agregó CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Alemania) para alcanzar una concentración final en la leche de 0,02 % (p/v). Posteriormente se procedió al ajuste del pH a un valor de 6,3, a través del agregado de una solución de ácido láctico (1,5 % p/v) (Tuteur, Buenos Aires, Argentina). Luego se adicionó el fermento, a una concentración de 10⁶ UFC/ml de leche, el cual se trató de fermento comercial de *Lactobacillus helveticus* (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina). El aporte de ácido láctico permite sustituir el suero fermento por un fermento seleccionado de bacterias liofilizadas (Meinardi y col., 2008). Luego se procedió a distribuir la leche en las 4 minitinas de 5 l y a cada una se le adicionó el coagulante, que consistió en quimosina pura 100%, 570 IMCU ml⁻¹ (CHY-MAX[®], Chr. Hansen) disueltos en 10 ml de agua destilada. El coagulante se adicionó a una concentración de 0,06 ml/l de leche. La concentración de coagulante adicionada, fue definida por medio de un ensayo in vitro (Costabel y col., 2008), utilizando un coagulómetro (INRA, PIGNAT, Francia) de

manera de obtener un tiempo de coagulación en tina entre 6 y 8 min. En esta experiencia, el tiempo de coagulación luego de la adición del coagulante se detectó visualmente, y estuvo en el rango de 8 y 10 min. Esto se debió a que el coagulómetro tiene mayor sensibilidad y permite detectar el inicio de la coagulación, mientras que visualmente la coagulación se detecta unos min más tarde, cuando se empiezan a hacer más grandes los pequeños coágulo que se forman inicialmente. Una vez que el coágulo adquirió la firmeza adecuada (entre 12 a 15 min) se procedió al corte manual del mismo. Se realizó un primer corte de la cuajada y se esperó a que el coágulo se desprenda de las paredes de la tina y exude suero. Luego se realizó una segunda etapa de corte, consistente en cortes sucesivos continuos, hasta alcanzar un tamaño adecuado de grano de cuajada para este tipo de queso (similar a medio grano de arroz). La mezcla de granos de cuajada y suero fue calentada lentamente, a una velocidad de $0,5^{\circ}\text{C} / \text{min}$, hasta llegar a 44°C , permaneciendo a esa temperatura por aproximadamente 15 min (etapa de secado de los granos). Luego se elevó la temperatura de la mezcla más rápidamente ($1^{\circ}\text{C} / \text{min}$) hasta llegar a la temperatura de cocción, que alcanzó los 52°C . La mezcla se mantuvo a esa temperatura por aproximadamente 3 min (etapa de cocción de la cuajada). Luego de la etapa de cocción, se detuvo la agitación y se permitió que la cuajada se depositara en el fondo de las tinas, para su posterior extracción y moldeo. Posteriormente los miniquesos se prensaron por 20 horas, y se salaron por inmersión en salmuera a 12°C . Por cada tina se obtuvo un queso de aproximadamente 450 g, por lo que por elaboración se obtuvieron 4 quesos, que se maduraron en cámara con temperatura y humedad controlada (85% de humedad relativa y 12°C de temperatura) durante 90 días. Para evitar una pérdida de humedad excesiva en los miniquesos y lograr que los mismos tengan una humedad similar a los quesos de mayor tamaño, se procedió a envasarlos al vacío a los 15 días posteriores a cada elaboración en bolsas de película Cryovac BB2800CB (permeabilidades: O_2 $30 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} 24\text{hs}^{-1} \text{ bar}^{-1}$; CO_2 $150 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} 24 \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$; vapor de agua $20 \text{ g} 24 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-2}$, Sealed Air Co., Buenos Aires, Argentina), utilizando una envasadora al vacío de mesada Rapivac modelo Minimax 430. Para determinar el tiempo de envasado, se monitoreó la humedad de los quesos cada dos días. Cuando la misma estuvo entre 34- 35%, adecuada para un queso duro, se procedió al envasado, lo que ocurrió a los 15 días posteriores a la elaboración.



Figura 1.1. Tinas paralelas de 5 l de capacidad utilizadas para la elaboración de los quesos en el INLAIN

En la Figura 1.2 se presenta un esquema del proceso de elaboración descrito, utilizado en las elaboraciones correspondientes al ensayo del capítulo 2.

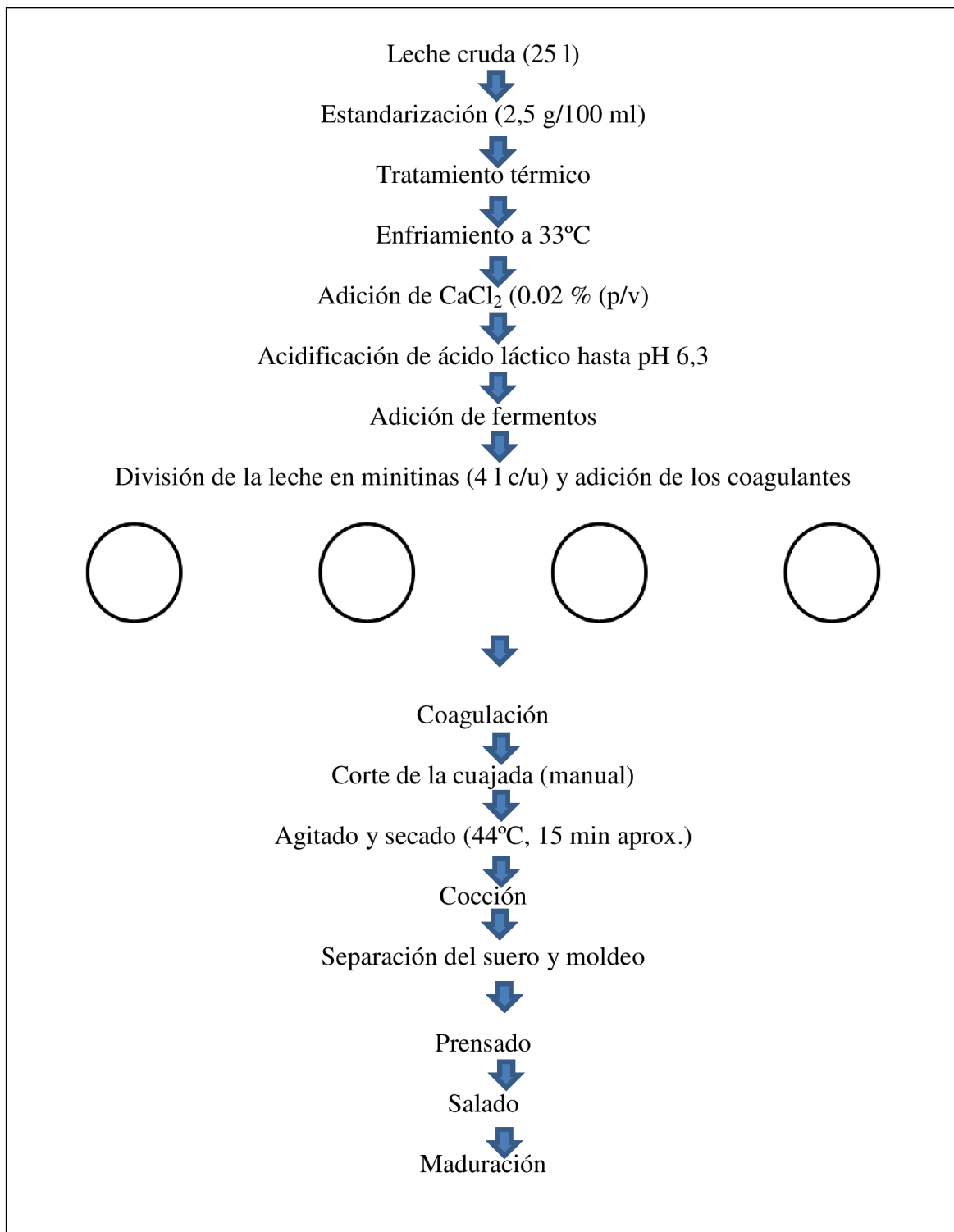


Figura 1.2. Esquema del proceso de elaboración de quesos miniatura en el INLAIN

2.2 Quesos miniatura - miniplanta automatizada

Los quesos que fueron sometidos al tratamiento con altas presiones hidrostáticas (descritos en los capítulos 3 y 4) fueron elaborados en el Área de Procesos del

laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria del INTA EEA Rafaela. En el mismo, se dispone de una planta que trata de reproducir a pequeña escala, la elaboración de diferentes variedades de queso, utilizando equipamiento similar al frecuentemente encontrado a nivel industrial, pero a menor escala (Figura 1.3). La capacidad máxima de proceso es de 180 litros por elaboración. En el área se dispone además de equipamiento adecuado para monitorear minuciosamente las diferentes variables de proceso, de modo de estandarizar las diferentes tecnologías desarrolladas, haciendo que el proceso de elaboración sea constante. De esta manera, se logra que en un mismo ensayo, la tecnología de elaboración no sea una causa de variación en los resultados obtenidos.



Figura 1.3. Elaboración de quesos en el Área de Procesos del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria. INTA EEA Rafaela

Para la elaboración de quesos duros de pasta cocida, se utilizó una técnica desarrollada conjuntamente por investigadores del INTA y del INLAIN, la cual combina el uso de un fermento directo seleccionado de lactobacilos termófilos con la acidificación de la leche por agregado de ácido láctico. Se realizaron 4 elaboraciones de quesos con la finalidad de comparar la reproducibilidad entre las tinajas de elaboración. Para cada elaboración se utilizaron 180 litros de leche cruda proveniente del tambo

experimental de la EEA Rafaela, cuya composición, acidez y pH promedio fueron: grasa $3,40 \pm 0,31$ %; proteínas $3,13 \pm 0,08$ %; sólidos totales $12,06 \pm 0,35$ %; acidez $16,0 \pm 0,5$ y pH $6,75 \pm 0,06$. En cada caso, se utilizó leche de buena calidad higiénico sanitaria (recuento de bacterias totales entre 30.000 y 100.000 UFC/ml y recuento de células somáticas entre 90.000 y 400.000 cel/ml). La leche cruda fue estandarizada hasta una relación grasa/proteína de $0,70 \pm 0,02$, por mezcla de leche entera y leche desnatada. Posteriormente se pasteurizó en tina a 65°C durante 20 min y se enfrió hasta $32-33^{\circ}\text{C}$, temperatura óptima para la coagulación de esta variedad de queso. Una vez alcanzada esa temperatura se agregó CaCl_2 (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 0.02 % (p/v). Posteriormente, se procedió a acidificar la leche mediante el agregado de ácido láctico (1,5 % p/v) (Tuteur, Buenos Aires, Argentina), hasta obtener un valor de pH de $6,25 \pm 0,02$. Luego se adicionó el fermento, el cual se trató de un fermento comercial de *Lactobacillus helveticus* (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina). La enzima coagulante consistió en quimosina pura 100%, 570 IMCU ml^{-1} (CHY-MAX[®], Chr. Hansen) la cual fue adicionada a la leche a una concentración de 0,06 ml/l de leche, igual que la empleada en la sección 2.1 de éste capítulo. Luego de adicionar el coagulante, se introdujo en la tina el coagulómetro (INRA, PIGNAT, France) y se detectó el tiempo de coagulación usando el software Coag del equipo. El tiempo de coagulación promedio \pm la desviación estándar correspondiente a las 4 elaboraciones fue $7,45 \pm 0,52$ min. El corte de la cuajada se realizó cuando el coágulo adquirió fuerza suficiente, lo que ocurrió luego de transcurrido un lapso extra, igual a un tercio del tiempo de coagulación detectado. Se efectuaron cortes sucesivos separados por etapas de agitación hasta obtener un tamaño de grano similar a la mitad de un grano de arroz. El corte y agitación se realizó utilizando liras mecánicas, a velocidad controlada automáticamente. La mezcla de granos de cuajada y suero se calentó lentamente ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hasta 42°C , lo que comúnmente se denomina rampa de secado. El secado de los granos de cuajada se completó manteniendo a 42°C durante 15 min. Culminada esta etapa, se procedió a elevar rápidamente la temperatura ($1^{\circ}\text{C} / \text{min}$) hasta 51°C (rampa de cocción). El tiempo de cocción a 51°C fue de 3 min. Posteriormente se realizó el pre-prensado de la cuajada, durante 20 min. Luego los quesos se formaron en moldes de acero inoxidable de tamaño adecuado para quesos Reggianito. Una parte de la masa pre-prensada fue moldeada en moldes cilíndricos miniatura de material plástico, de 5,5 cm de diámetro por 10 cm de

alto, los que permitieron obtener miniquesos de un tamaño óptimo para introducirlos en el cilindro del equipo de altas presiones hidrostáticas (APH). Luego de moldeados, los quesos fueron prensados durante 20 horas en prensa horizontal y posteriormente se salaron en salmuera saturada a 12°C, a razón de 1 día por kg de queso. Teniendo en cuenta esta relación, y el peso antes de entrada en salmuera, los quesos de mayor tamaño se salaron durante 5 días aproximadamente, y los miniquesos durante 6 horas. El peso promedio de los quesos a la salida de salmuera fue de 5,5 kg y 250 g para los quesos y miniquesos respectivamente. Posteriormente, todos los quesos se maduraron en cámara con temperatura y humedad controlada (12°C, 85% de humedad) por un período máximo de 90 días. Al igual que lo detallado en la sección 2.1 del presente capítulo, para evitar una pérdida de humedad excesiva en los miniquesos y lograr que los mismos tengan una humedad similar a los quesos de mayor tamaño, se procedió a envasarlos al vacío a los 10 días posteriores a cada elaboración, utilizando el mismo tipo de bolsas y la misma envasadora al vacío que la descrita en la sección 2.1 de éste capítulo. Para determinar el tiempo de envasado, se monitoreó la humedad de los quesos, seleccionando dos quesos de cada elaboración, cada dos días. Cuando la misma fue del 34-35 %, adecuada para un queso duro, se procedió al envasado, lo que ocurrió a los 10 días posteriores a la elaboración.

En la Figura 1.4 se presenta un esquema general de la elaboración.

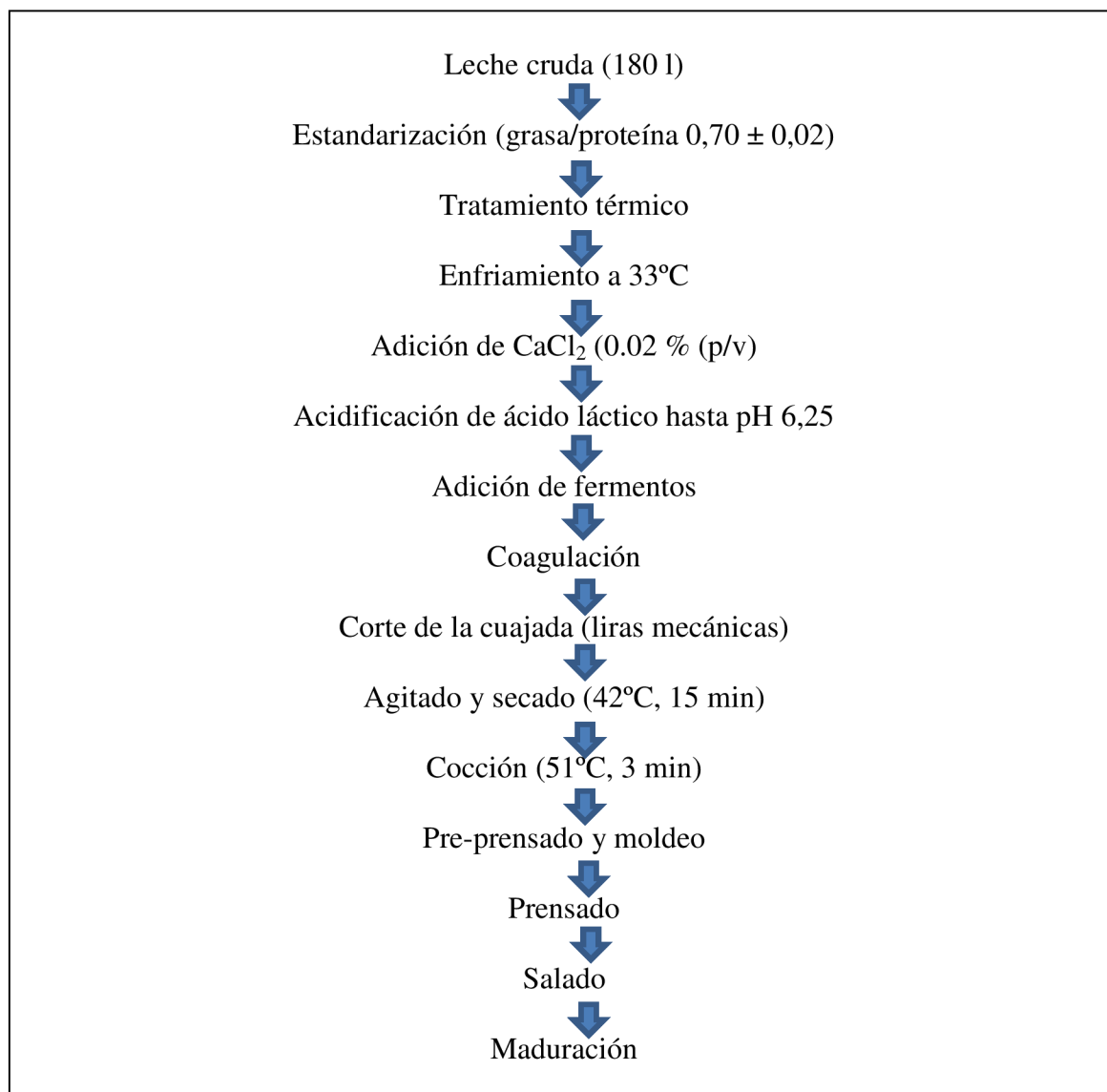


Figura 1.4. Esquema del proceso de elaboración de quesos en la miniplanta automatizada del INTA

2.3 Análisis de los quesos

Para corroborar la reproducibilidad de las elaboraciones, se realizaron los análisis de humedad, proteínas, materia grasa y pH a los quesos elaborados en ambos ensayos a los 3 y 90 días de maduración. El tiempo de maduración fue fijado en 90 días, teniendo en cuenta los resultados de experiencias previas, en las cuales se observó que a ese tiempo, en los quesos miniatura, se obtuvo una composición química y evolución de la proteólisis similar a la de los quesos de 180 días de tamaño comercial (Hynes y col., 2004a; Vélez y col., 2010; Vélez, 2013). Además se realizó una comparación entre la humedad y el contenido de NaCl entre los quesos de 180 y miniquesos de 90 días de

maduración elaborados de acuerdo a la sección 2.2 de éste capítulo, con la finalidad de verificar que los mismos sean comparables en estos parámetros, que son los que principalmente condicionan la condiciones ambientales de la matriz del queso.

2.3.1 pH

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

2.3.2 Humedad

El porcentaje de humedad se determinó por secado de las muestras de cuajada/queso en estufa a $102 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta pesada constante, de acuerdo a la metodología normalizada de la Federación Internacional de Lechería (IDF N° 4 A, 2004).

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

2.3.3 Materia Grasa

El contenido de materia grasa (MG) en la cuajada/queso fue determinado por el método butirométrico de Gerber van Gulik (IDF N° 152 A, 1997), empleando un butirómetro específico para queso. Se pesaron aproximadamente 2,5 g de muestra

(pesada exacta) y se agregó una solución de ácido sulfúrico (densidad 1,52) hasta llenar completamente el bulbo del butirómetro. Luego se adicionó 1 ml de alcohol isoamílico. Se tapó el butirómetro, se agitó suavemente, y se colocó en un baño a 60 – 70°C para favorecer la completa disolución del queso. Por último, se centrifugó a máxima velocidad entre 5 y 10 min utilizando una centrífuga específica para butirómetros (Centrífuga de Gerber). Finalmente, se leyó, en la escala, en un baño a 65°C, el espacio ocupado por la grasa y este valor se utilizó para el cálculo de la MG en el queso (% p/p).

2.3.4 Proteínas

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

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

2.3.5 Cloruro de Sodio

El contenido de cloruro de sodio se determinó por titulación, de acuerdo a la norma IRAM 14023-2 (2008). En un erlenmeyer de 250 ml se pesaron 2 g de queso, y se agregaron 25 ml de solución de nitrato de plata 0,1 M y 25 ml de ácido nítrico

concentrado. Luego de agitar, la mezcla se calentó hasta ebullición, y se agregaron 10 ml de una solución de permanganato de potasio al 5%. Cuando la mezcla de reacción se decoloró, se agregaron 5 ml más de solución de permanganato de potasio. La presencia de un exceso de permanganato (color marrón) indica que la destrucción de la materia orgánica se ha completado. El exceso de permanganato se eliminó por adición de una pequeña cantidad de glucosa. Luego se adicionó 100 ml de agua y 2 ml de la solución de sulfato de hierro (III) y amonio y se mezcló. Inmediatamente se valoró el exceso de nitrato de plata con una solución de tiocianato de potasio 0,1 N hasta que la solución viró al color rojo-marrón.

2.4 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante análisis de la variancia (ANOVA) de una vía, utilizando el programa estadístico InfoStat (Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

3. Resultados

3.1 Quesos miniatura– tinas paralelas

Haciendo un análisis de varianza de todos los quesos elaborados, a los 3 y 90 días de maduración, se observó que la composición química y el pH de los quesos no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los miniquesos elaborados en el mismo día con la misma leche, o en días diferentes con distinta leche, lo que demostró que el modelo dio como resultado unidades experimentales reproducibles.

Tabla 1.1. Composición química y pH de los quesos de las diferentes tinas de elaboración a los 3 y 90 días posteriores a la elaboración. Para cada variable, se presenta el valor medio \pm desviación estándar de las 4 réplicas de elaboración.

Variables	Tinas			
	1	2	3	4
día 3				
Humedad (%)	44,14 \pm 0,42	44,04 \pm 1,83	43,26 \pm 1,31	43,83 \pm 1,29
Grasa (%)	24,03 \pm 1,08	24,11 \pm 0,94	23,73 \pm 0,79	24,3 \pm 0,65
Proteínas (%)	25,99 \pm 0,67	26,25 \pm 0,35	26,49 \pm 0,26	26,87 \pm 0,56
pH	5,18 \pm 0,04	5,21 \pm 0,02	5,19 \pm 0,04	5,18 \pm 0,04
día 90				
Humedad (%)	34,98 \pm 1,27	34,39 \pm 1,03	34,50 \pm 0,47	34,69 \pm 1,43
Grasa (%)	28,26 \pm 0,25	27,62 \pm 0,98	27,72 \pm 1,01	28,34 \pm 1,4
Proteínas (%)	33,97 \pm 0,66	33,96 \pm 0,55	33,87 \pm 1,10	34,22 \pm 0,54
pH	5,33 \pm 0,10	5,40 \pm 0,08	5,38 \pm 0,14	5,35 \pm 0,10

La humedad de los quesos disminuyó y la concentración de grasa y proteínas aumentó con el avance de la maduración, como consecuencia de la evaporación en las cámaras durante este período.

3.2 Quesos elaborados en miniplanta automatizada

En la Tabla 1.2 se presentan los resultados de los quesos provenientes de las diferentes elaboraciones. No existieron diferencias estadísticas en cuanto a su composición química y pH comparando los valores tanto al inicio como a los 180 días de maduración. Tampoco se diferenciaron los quesos de mayor tamaño a los 180 días de maduración de los miniquesos de 90 días de maduración en cuanto al contenido de humedad y NaCl, lo que manifiesta que el tiempo de salado y el tiempo al cual los miniquesos se envasaron fue el adecuado para obtener similares valores en ambos tamaños de quesos.

Tabla 1.2. Composición química y pH de los quesos de las 4 elaboraciones realizadas a los 3, 90 y 180 días posteriores a la elaboración.

Variables	Elaboración			
	1	2	3	4
	día 3			
Humedad (%)	40,76	41,26	41,48	41,02
Grasa (%)	25,9	25,47	25,5	25,9
Proteínas (%)	28,81	29,54	30,86	29,52
pH	5,2	5,18	5,18	5,22
	día 180			
Humedad (%)	35,22	35,24	33,53	33,59
Grasa (%)	27,66	28,08	28,71	28,48
Proteínas (%)	31,24	31,2	31,33	32,07
pH	5,32	5,33	5,43	5,3
NaCl (%)	0,89	0,85	0,83	0,9
	Miniquesos 90 días			
Humedad (%)	34,19	33,89	33,16	33,04
NaCl (%)	0,81	0,8	0,86	0,85

Al igual que lo observado en los miniquesos de la sección 3.1, a medida que avanzó la maduración, la humedad de los quesos disminuyó y la concentración de grasa y proteínas aumentó, como consecuencia de la evaporación en la cámara de maduración.

4. Discusión

En ambos modelos, la reproducibilidad entre tinas en el caso del primero y entre elaboraciones en el caso del segundo fue adecuada. Los valores fueron similares a los informados para este tipo de quesos tanto en los productos convencionales (Candioti y col., 2002, Costabel y col., 2013; Audero y col., 2014), como los miniaturizados (Hynes y col., 2004a; Aparo, 2005; Vélez, 2010). Al final de la maduración los valores se encontraron de acuerdo con los requerimientos del Código Alimentario Argentino para quesos duros tipo Reggianito (ANMAT, 2014).

Varios modelos de queso miniatura han sido desarrollados previamente, informando valores de composición global similar a los de los quesos convencionales obtenidos a nivel industrial. Pueden citarse como ejemplo, los protocolos para la elaboración de quesos miniatura tipo Cheddar desarrollados por Shakeel-Ur-Rehman y

col. (1998) y Milesi y col. (2008b), el protocolo para queso blando descrito por Milesi y col. (2007), o el protocolo diseñado por Hynes y col. (2000) para la elaboración de quesos miniatura tipo Cheddar y Saint Paulin (queso de pasta lavada). Resultados similares fueron observados por Di Cagno y col. (2006) quienes elaboraron quesos miniatura tipo Caciotta utilizando el método de Shakeel-Ur-Rheman y col. (1998) adaptado a la tecnología de fabricación de esta variedad. En lo que hace específicamente a miniquesos de pasta dura cocida, Hynes y col. (2004a), Aparo y col. (2005) y Vélez y col. (2010) aplicaron estos modelos exitosamente para investigaciones sobre proteólisis y lipólisis.

El presente trabajo, por un lado, adaptó y optimizó el modelo desarrollado por Hynes y col. para quesos duros de pasta cocida (2004). La utilización de fermentos comerciales liofilizados compuestos por *Lactobacillus helveticus* en los dos modelos que se presentaron en este capítulo, permitió estandarizar el proceso de elaboración, logrando de esta forma que los cambios evidenciados en la proteólisis, sean atribuidos a las variables de interés. En efecto, el uso de fermentos naturales de suero, aún el compuesto por cepas seleccionadas de *Lb. helveticus* cultivadas en suero estéril (Candiotti y col., 2002; Hynes y col., 2003), introduce una mayor variabilidad por la complejidad de su composición inicial. Otro cambio introducido en los presentes modelos fue el coagulante utilizado, el cual tenía una fuerza coagulante mayor que en el modelo descrito por Hynes y col. Esto permitió que la coagulación, el endurecimiento del coágulo y el corte se realicen en menor tiempo, disminuyendo por lo tanto el tiempo total de la elaboración. La reproducibilidad de este modelo trabajando según las condiciones descritas, fue mayor que la obtenida previamente utilizando el mismo equipamiento pero un coagulante de menor fuerza y un fermento de suero compuesto por cepas seleccionadas de *Lb. helveticus* (Aparo, 2005).

Por otra parte, se puso a punto un segundo modelo. Como se mencionó anteriormente, por medio del control de las variables de proceso, y la utilización de fermento comercial, se logró obtener elaboraciones reproducibles entre diferentes días de elaboración. La miniaturización de los quesos elaborados en la planta piloto automatizada fue necesaria para poder realizar el tratamiento con APH a los quesos Reggianito, ya que el cilindro del equipo de Altas Presiones Hidrostáticas posee dimensiones reducidas. Se han realizado otros ensayos en diferentes variedades de queso, en los cuáles los quesos se elaboraron según el protocolo tradicional y luego se

moldearon en moldes miniatura para poder realizar posteriormente el tratamiento con APH (Garde y col., 2007; Koca y col., 2011; Evert-Arriagada y col., 2013). En otros trabajos, a partir del queso elaborado de dimensiones de un queso convencional, se obtuvieron los bloques de dimensiones adecuadas, que luego fueron introducidos en el cilindro del equipo (Saldo y col., 2001; O'Reilly y col., 2003; Sheehan y col., 2005; Juan y col., 2007 a y b; Rynne y col., 2008; Moschopoulou y col., 2010; Okpala y col., 2010; Ozturk y col., 2013 a y b; Calzada y col., 2014). En el caso del queso Reggianito, esta alternativa no se realizó teniendo en cuenta especialmente que el salado es por inmersión en salmuera, por lo tanto, la difusión de la sal de forma homogénea en toda la matriz del queso no es inmediata, por lo tanto no se podría subdividir el queso luego de salado de salmuera para aplicar el tratamiento con APH. Esto es una diferencia con el queso Cheddar que es de salado directo y permite el corte de la horma en sub bloques homogéneos.

5. Conclusión

La miniaturización de unidades experimentales o especímenes muestrales en estudios de maduración de quesos no es un mero efecto cosmético o de apariencia, especialmente porque las variedades argentinas son mayormente saladas por inmersión en salmuera. De esta manera, la ganancia de sal, pero también la velocidad de enfriado y la pérdida de humedad van a jugar a la hora de definir la humedad final y el pH de los quesos, que a su vez tendrán influencia en las actividades enzimáticas de la maduración. Mediante la puesta a punto de los modelos descriptos, en estas primeras experiencias de la tesis fue posible obtener matrices alimentarias reproducibles y comparables a los sistemas reales. Las fuentes de variación provenientes de la elaboración fueron minimizados y tanto el fermento, como el coagulante y el proceso se estandarizaron para poner de relevancia el efecto de los factores en estudio en los ensayos descriptos en los capítulos siguientes.

Capítulo 2

***INFLUENCIA DEL TIPO DE COAGULANTE Y DE LA
TEMPERATURA DE COCCIÓN SOBRE LA
PROTEÓLISIS DE QUESO REGGIANITO***

1. Introducción

En los quesos duros, la maduración es un proceso largo, que lleva entre 6 y 24 meses, durante el cual la degradación de las proteínas que conforman la matriz proteica del queso, y la posterior hidrólisis de los péptidos provenientes de dicha transformación, constituyen el conjunto de reacciones cuantitativamente más importante (Neviani y Carini, 1994; Candiotti y col., 2002; Gobetti y DiCagno, 2003; Fox, 2003; Perotti y col., 2005; Gatti y col., 2013). Además, durante este periodo se produce una moderada lipólisis, cambios metabólicos en los hidratos de carbono disponibles, y el catabolismo de aminoácidos libres y ácidos grasos libres (McSweeney y Sousa, 2000; Tavaría y col., 2002; Yvon y col., 2006; Peralta y col., 2014). Todas estas reacciones, influyen en la textura y funcionalidad, y son responsables del desarrollo del flavour de los quesos (Fox, 2003; McSweeney, 2004; Sgarbi y col., 2013).

Se han propuesto diversas estrategias tecnológicas para reducir este periodo, el cual resulta muy costoso debido a que un gran capital se encuentra inmovilizado. Entre tales estrategias, se puede mencionar el incremento de la temperatura de maduración (Sihufe y col., 2010; Ceruti y col., 2012), la adición de enzimas exógenas (Fox y col., 2000; El Soda y Awad, 2003; Kailasapathy y Lam, 2005; Wilkinson y Kilcawley, 2005; Azarnia y col., 2011; Sihufe y col., 2011), y el uso de fermentos adjuntos (El Soda y col. 2000; Irigoyen y col., 2007; Milesi y col., 2008, Peralta y col., 2014).

El agregado de enzimas exógenas resulta adecuado para acelerar las transformaciones bioquímicas, pero es costoso, ya que la mayor parte de las enzimas se pierde en el suero (Upadhyay y McSweeney, 2003; Wilkinson y Kilcawley, 2005). Por esta razón, en la presente tesis se ha avanzado sobre el incremento en las actividades proteolíticas que habitualmente se encuentran presentes y activas en el queso: la enzima coagulante residual y la plasmina.

El coagulante agregado a la leche para producir la transformación casearia es capaz de intervenir en mayor o menor medida en la degradación de las caseínas, según el tipo de queso (Aparo y col., 2004; Hynes y col., 2004a; Bansal y col., 2007). Asimismo, la plasmina – una proteasa nativa de la leche – degrada algunos de los componentes individuales de las caseínas durante la maduración de los productos (Farkye y Fox, 1992; Fox y col., 2000; Kelly y McSweeney, 2003; Ismail y Nielsen,

2010). El incremento de tales actividades por modificaciones tecnológicas, puede conducir a una proteólisis más rápida o de mayor avance en los productos finales (Farkye y Fox, 1992; Hynes y col., 2004a).

Existen antecedentes para este enfoque: Sommers y Kelly (2002) estudiaron el efecto del tratamiento térmico de la leche y de la temperatura de cocción sobre quesos miniatura, concluyendo que la cocción tiene un efecto importante sobre la actividad de la plasmina, pero que no sucede lo mismo con la temperatura de tratamiento térmico previo de la leche. Vélez y col. (2011) comprobaron que en quesos duros fue posible aumentar la actividad de la plasmina incorporando una etapa de lavado de la cuajada y modificando el pH de drenado del suero. En cuanto al coagulante residual, se ha demostrado que la temperatura de cocción, la dosis y la actividad proteolítica del coagulante utilizado, el pH de drenado del suero y la humedad del queso pueden modificar su actividad proteolítica (Bansal y col., 2007).

En este capítulo, se estudió la influencia de la temperatura de cocción sobre la actividad de plasmina y de quimosina y su efecto sobre la proteólisis, durante la maduración del queso Reggianito, para investigar si tales modificaciones podrían acelerar la maduración de los quesos. Para ello, se realizaron ensayos de elaboración utilizando la enzima coagulante más utilizada en la elaboración de queso Reggianito - quimosina bovina producida por fermentación - y un coagulante de reciente introducción al mercado argentino: quimosina de camello producida por fermentación.

2. Materiales y Métodos

2.1 Diseño experimental

En este capítulo se estudió la influencia del tipo de coagulante y temperatura de cocción sobre la proteólisis de queso Reggianito. Ambos factores fueron ensayados a dos niveles, en los tres tiempos seleccionados del período de maduración (inicial, medio y final). Se emplearon dos tipos de enzimas coagulantes recombinantes: quimosina bovina (Chy-Max ultra, 950 IMCU, CH) y quimosina de camello (Chy Max M, 740 IMCU, CA), ambas provistas por Chr. Hansen Argentina (Quilmes, Argentina). Se aplicaron dos temperaturas de cocción diferentes de la cuajada: 50 y 56°C. Estas temperaturas fueron seleccionadas teniendo en cuenta que según la bibliografía

existente sobre tecnología de elaboración de queso Reggiano y consultas realizadas a los maestros queseros de diferentes empresas lácteas que elaboran este tipo de queso, generalmente la temperatura de cocción promedio que se utiliza está entre 52-54°C. Sin embargo, el rango es mayor, ya que la tecnología de elaboración de queso Reggiano no está tan estandarizada como en el caso de sus antecedentes Italianos. 56°C fue la mayor temperatura registrada en las consultas realizadas, y si bien 50°C fue menor que la temperatura registrada, se propuso como estrategia para aumentar la actividad coagulante residual y acelerar la maduración. Los quesos obtenidos de los cuatro tratamientos fueron denominados CA-50°C, CA-56°C, CH-50°C y CH-56°C (Tabla 2.1). Las elaboraciones se realizaron por duplicado en el mismo día, obteniéndose quesos de aproximadamente 450 g que fueron envasados al vacío utilizando bolsas Cryovac BB2800CB (Sealed Air Co., Buenos Aires, Argentina), una vez que alcanzaron el nivel adecuado de humedad para este tipo de queso (aprox. 36%), y se maduraron durante 90 días en cámara a 12-14° C y 80% de humedad relativa. Los quesos de los 4 tratamientos se elaboraron el mismo día, utilizando la misma leche. Se realizaron cuatro réplicas completas del ensayo.

Tabla 2.1. Tratamientos evaluados. Enzima coagulante y temperatura de cocción aplicados en cada tratamiento.

Tratamiento	Enzima coagulante	Temperatura de cocción (°C)
CA-50°C	CA	50
CA-56°C	CA	56
CH-50°C	CH	50
CH-56°C	CH	56

2.2 Determinación de la dosis de coagulante

Antes de realizar la elaboración de los quesos, se procedió a determinar la dosis de cada enzima coagulante a utilizar en los experimentos, de modo de obtener tiempos de coagulación similar en todas las experiencias. Para este ensayo, se utiliza un coagulómetro (INRA-PIGNAT, Francia), que consiste en una sonda térmica, que determina el tiempo en el cual la leche comienza a coagular luego de que se le ha

adicionado la enzima coagulante. Consiste en un ensayo *in vitro*, que reproduce a pequeña escala la coagulación de la leche (Figura 2.1). Se utilizó para las determinaciones leche del tambo experimental el INTA EEA Rafaela. Para cada ensayo, una muestra de leche de 600 ml se colocó en un vaso de precipitados, y se calentó hasta 33°C. Posteriormente, se adicionó CaCl_2 (Merck, Darmstadt, Alemania), en una dosis similar a la utilizada para la elaboración de queso Reggianito (0,02 % p/v). Luego se adicionó el coagulante a ensayar, diluido en una pequeña cantidad de agua destilada, para facilitar una adecuada distribución del coagulante en la leche, evitando coagulaciones puntuales al adicionar el coagulante. La dosis adicionada de cada enzima fue calculada de acuerdo a las unidades internacionales de coagulación (IMCU por sus siglas en inglés internacional milk-clotting unit) indicadas por el proveedor en la etiqueta de cada coagulante.



Figura 2.1. Determinación *in vitro* del tiempo de coagulación

Las dosis ensayadas fueron: 2, 3, 5 y 6 ml/100 l de leche para CA y 3, 3,5, 4 y 5 ml/100 l de leche para CH. El tiempo de coagulación fue obtenido a partir del software Coag (INRA, Pignat, France). Cada ensayo se realizó por triplicado.

2.3 Elaboración de los quesos

Para la elaboración de los quesos, se utilizó el modelo de quesos miniatura de pasta dura cocida descrito en la sección 2.1 del capítulo 1, en el cual se utiliza un

conjunto de 4 tinas queseras de 5l de capacidad, que se operaron en paralelo. La leche utilizada para las elaboraciones fue leche cruda de gran mezcla (pH $6,65 \pm 0,05$ y acidez 18 ± 1 °D) procedente de una industria láctea de Santa Fe (Milkaut SA, Franck, Argentina). Antes de colocarlas en las minitinas, se procedió a estandarizar el volumen total de leche (25 l) a una concentración de grasa de 2,5 g/100 ml y pasteurizarla a 65°C por 20 min. Una vez que la leche se enfrió hasta la temperatura de coagulación (33°C) se procedió al ajuste del pH a un valor de 6,3, a través del agregado de ácido láctico (1,5 g/ 100 ml). Luego se adicionó el fermento, a una concentración de 10^6 cfu/ml de leche, el cual se trató de fermento comercial compuesto por *Lactobacillus helveticus* (Chr. Hansen Argentina, Quilmes, Argentina). Luego se procedió a distribuirlas en las 4 minitinas de 5 l. Posteriormente se adicionaron los coagulantes, según la dosis calculada en la sección 2.2 del presente capítulo, previa disolución en 10 ml de agua destilada. El siguiente esquema muestra el coagulante adicionado y la temperatura de cocción empleado en las 4 tinas de elaboración

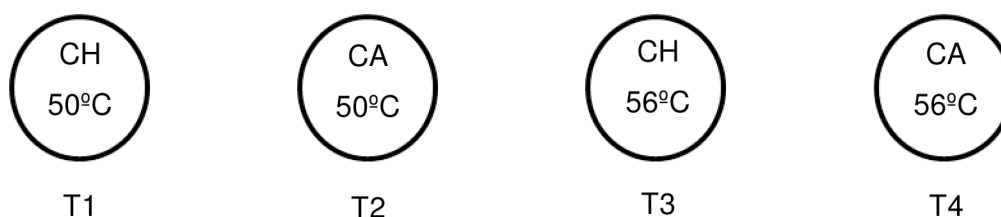


Figura 2.2. Esquema de experimental de elaboración en las minitinas (T). CH: quimosina bovina, CA: quimosina de camello

El corte del coágulo se realizó una vez que el mismo adquirió la firmeza adecuada, lo cual ocurrió entre 12 a 15 min. La temperatura de cocción fue de 50°C para las tinas 1 y 2 y de 56°C para las tinas 3 y 4. La mezcla fue mantenida a esa temperatura por 3 min (etapa de cocción de la cuajada). Las elaboraciones se realizaron de tal forma de obtener en los quesos niveles de humedad similares, por lo tanto, se controlaron de manera subjetiva las operaciones fundamentales que regulan la humedad de los quesos, en este caso, el tiempo de secado y de cocción. Luego de la etapa de cocción, se procedió a la separación del suero y la cuajada fue moldeada en moldes aptos para estos miniquesos. Posteriormente se prensaron por 20 horas, y se salaron por inmersión en salmuera a 12°C. Las elaboraciones se realizaron por duplicado en días sucesivos, obteniéndose por cada tina un queso de aproximadamente 450 g, por lo que

por elaboración se obtuvieron 4 quesos, los cuáles se maduraron en cámara con temperatura y humedad controlada (85% de humedad relativa y 12°C de temperatura). Luego de 15 días de maduración, según lo establecido en la sección 2.1 del capítulo 1, los mismos fueron envasados al vacío en bolsas de película Cryovac BB2800CB (Sealed Air Co., Buenos Aires, Argentina), utilizando una envasadora al vacío de mesada RapiVac modelo Minimax 430, para evitar pérdidas excesivas de humedad debido al pequeño tamaño de los quesos.

2.4 Análisis de los quesos

A los 6, 50 y 90 días luego de la elaboración, se procedió al muestreo y análisis de los quesos. Para cada tiempo de muestreo se limpió la superficie de los quesos y se tomó la muestra (aproximadamente 50 g) utilizando un calador en condiciones asépticas y descartándose la parte más cercana a la corteza. La muestra extraída se trituró con la ayuda de una prensa manual, se colocó en colectores adecuados y luego se homogeneizó rápidamente para evitar la pérdida de humedad. Luego del muestreo, los orificios de los quesos se rellenaron con parafina en condiciones asépticas para permitir la conservación del producto y la continuación de la maduración sin que se produzca contaminación por microorganismos indeseables presentes en el medio ambiente. Los quesos fueron analizados en cuanto a: composición química a los 50 días de maduración, pH, actividad coagulante residual y evolución de la proteólisis mediante fraccionamiento nitrogenado, electroforesis y perfiles peptídicos a los 3 tiempos de muestreo. A los 90 días de maduración, se determinó además la actividad de plasmina. A los 3 y 90 días de maduración se realizó el recuento microbiológico de los quesos. La composición química de los quesos se monitoreó en un único punto (50 días de maduración) con la finalidad de verificar que todos los quesos sean comparables desde el punto de vista de la composición. Las determinaciones químicas no se realizaron a los 6 días de maduración, ya que como se mencionó en el capítulo 1, a ese tiempo los quesos no tienen aún el contenido de humedad adecuado para un queso duro. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Las determinaciones de pH, composición química y recuentos microbiológicos se realizaron inmediatamente luego del muestreo, mientras que para las demás determinaciones las muestras trituradas se colocaron en colectores adecuados y se almacenaron a -18°C hasta el momento del análisis.

2.4.1 Composición química, pH y análisis microbiológicos

Las proteínas totales, grasa, materia seca y pH fueron analizados de acuerdo a los métodos de referencia descritos en el capítulo 1.

El recuento de la flora láctica total en los quesos a los 3 y 90 días se realizó en placas de agar leche descremada (APC-leche) luego de 48 h de incubación a 37°C (Candioti y col., 2002). Para ello, la muestra tomada en condiciones de asepsia (10 g) fue emulsionada con 90 ml de citrato de sodio estéril (2% p/v) en un recipiente mezclador estéril. Se realizaron diluciones decimales en agua de peptona de caseína al 0,1% y alícuotas de 0,1 ml de las diluciones apropiadas fueron sembradas en superficie en el medio mencionado.

2.4.2 Actividad coagulante residual

La determinación de la actividad coagulante residual se realizó tomando como base la metodología descrita por Hurley y col. (1999), en la cual se cuantifica la hidrólisis del heptapéptido sintético Pro-Thr-Glu-Phe-[NO₂-Phe]-Arg-Leu (Bachem California, Inc., Torrance, USA), específico de proteasas aspárticas. Se preparó una solución del este péptido de 1 mg ml⁻¹ en agua bidestilada, que se conservó congelada en alícuotas de 1 ml a -18°C. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo en un medio de pH controlado, incubando el péptido con un extracto de queso durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la ruptura del mismo y la consecuente liberación del producto de reacción: un tripéptido que contiene el grupo NO₂ ([NO₂-Phe]-Arg-Leu), y que posteriormente, es cuantificado por cromatografía líquida en fase reversa (HPLC-RP) a 300 nm. La concentración del producto de la hidrólisis es proporcional a la actividad de la enzima (Hurley y col., 1999).

La metodología descrita por Hurley y col. fue adaptada en el INLAIN para su aplicación en queso Reggianito, una matriz alimentaria con baja actividad residual de coagulante (Pozza, L., 2012). Para ello, se buscó incrementar la sensibilidad de la determinación mediante la modificación de diversos parámetros, como son longitud de onda de detección, pH de la mezcla de reacción, método de extracción de la muestra y tiempo de reacción.

Para cada determinación, la muestra de queso (250 mg) fue pesada en un tubo Falcon de 15 ml y se adicionó 5 ml de agua. Luego, el tubo se colocó en un baño maría a 37°C durante 30 min, agitando en vórtex a intervalos de 5 min para lograr una correcta

dispersión del queso y extracción de la enzima coagulante. Posteriormente se centrifugó a 2000 g por 5 min para eliminar la capa de grasa y, en los extractos acuosos, también las proteínas precipitadas. La capa acuosa fue separada y utilizada para preparar la mezcla de reacción. Para iniciar la reacción, un volumen de 30 μl de la solución del péptido se adicionó a 200 μl de buffer formiato de sodio 0,1 M pH 4,1, en un eppendorf, y se agregaron 70 μl de la muestra. La mezcla se incubó a 37°C durante 6 horas, y finalmente la reacción enzimática se detuvo por calentamiento a 70°C por 10 min. Luego se procedió al filtrado de las muestras, a través de un filtro de 0,45 μm de tamaño de poro (Millex, Millipore, São Paulo, Brasil), y 60 μl del filtrado fueron inyectados en el equipo HPLC. El equipamiento utilizado consistió de un sistema de HPLC clásico, provisto de una bomba cuaternaria, un desgasificador en línea, un inyector de tipo manual y un detector UV-Visible, todo perteneciente a la serie 200 de Perkin Elmer. Además el equipo contaba con un horno para columna de la serie Flexar de Perkin Elmer, el cual se utilizó para estandarizar la temperatura de corrida. La adquisición y el procesamiento de los datos cromatográficos se llevó a cabo por medio de una interfase analógica conectada a una PC con la aplicación Turbochrom® (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Para la separación cromatográfica se empleó una columna analítica de fase reversa (Aquapore OD-300 C18 de 220 x 4,6 mm). La fase móvil consistió en una mezcla de los solventes A (Ácido trifluoroacético 0,1% v/v en agua) y B (Ácido trifluoroacético 0,1% v/v en acetonitrilo), de acuerdo al gradiente establecido por Hurley y col. (1999) con algunas modificaciones cuyos objetivos fueron: permitir una mejor estabilización del sistema entre corridas y obtener una mejor resolución de los picos del sustrato y del producto de reacción, pues la columna utilizada no es exactamente la misma que la empleada por Hurley y col. (1999) (columna Nucleosil de C8 de 250 x 4,6 mm, 300 Å de tamaño de poro y 5 μm de tamaño de partícula). La columna se equilibró inicialmente con 15% del solvente B, condición que se mantuvo durante 5 min luego de la inyección de la muestra. Posteriormente, se realizó un gradiente por incrementos lineales del solvente B de la siguiente forma: de 15 a 45% en 20 min, de 45 a 95% en 3 min, manteniéndose finalmente por 2 min a 95% B; luego se retornó a las condiciones iniciales en 2 min, las que se mantuvieron durante 8 min antes de la inyección de la siguiente muestra. El flujo de fase móvil fue de 1 ml min^{-1} , el volumen de inyección de 60 μl y la longitud de onda de detección de 270 nm.

Los resultados fueron expresados con nmol de producto por gramo de queso seco por hora.

2.4.3 Actividad de plasmina

La actividad de la enzima se determinó según la técnica fluorométrica de Richardson y Pearce (1981), con algunas modificaciones. La misma se basa en la liberación del producto fluorescente 7-amino-4-metil cumarina (AMC) por acción de la plasmina sobre el péptido cumarínico no fluorescente N-succinyl-L-alanyl-L-phenylalanil-L-lysyl-7-amido-4-methyl cumarina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos). La intensidad de fluorescencia se monitoreó durante 30 min en intervalos de 5 min en un espectrofotómetro de fluorescencia (Hitachi F-2000, Japón) con longitudes de onda de excitación y emisión de 380 y 460 nm respectivamente.

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

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

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

Se realizaron gráficas de intensidad de fluorescencia vs. tiempo de reacción para cada muestra, y la pendiente obtenida se relacionó con la pendiente de una curva de calibración. La curva se realizó midiendo la intensidad de fluorescencia de soluciones

de AMC de concentraciones conocidas. La actividad enzimática se expresó por gramo de queso en base seca, y se la definió como nmoles de 7-amido- 4metil- cumarina (AMC) liberados por min a pH 7,5 y 25°C.

2.4.4 Seguimiento de la proteólisis

El proceso de proteólisis durante la maduración del queso involucra varias etapas y distintos agentes proteolíticos, por lo que una caracterización adecuada de la misma sólo puede lograrse mediante la aplicación simultánea de varias metodologías. La electroforesis es la técnica que generalmente se aplica para caracterizar la proteólisis primaria, mientras que la proteólisis secundaria se evalúa mejor mediante la determinación del contenido de nitrógeno de las distintas fracciones solubles de un extracto del queso y el análisis cromatográfico en fase reversa, que proporciona una huella digital de los perfiles peptídicos del queso (Fox y McSweeney, 1998, Upadhyay y col., 2004).

El estudio de la proteólisis durante la maduración de los quesos se llevó a cabo mediante tres técnicas analíticas: determinación de las fracciones nitrógeno soluble (NS) a pH 4,6 (NS-pH 4,6); en tricloroacético 12% (NS-TCA) y en ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-PTA), electroforesis sobre gel de poliacrilamida en presencia de urea (Urea-PAGE) y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) de la fracción del queso soluble en agua.

Contenido de Nitrógeno soluble

Esta metodología tiene como objetivo evaluar el grado de proteólisis de las caseínas y consiste, básicamente, en un fraccionamiento de los compuestos nitrogenados presentes en un extracto acuoso del queso, según la solubilidad de los mismos en distintos agentes precipitantes, y la posterior cuantificación del contenido de nitrógeno de cada fracción mediante el método de Kjeldahl. No se trata de un método específico, ya que no brinda información sobre la naturaleza de los compuestos nitrogenados y sólo proporciona una idea aproximada de su tamaño (Sousa y col., 2001, Upadhyay y col., 2004). En efecto, los cientos de péptidos presentes en la muestra son fraccionados de acuerdo a su masa molecular, su hidrofobicidad y conformación en las distintas fracciones. La técnica es adecuada para comparar el grado de avance de la proteólisis entre distintas muestras de queso y es muy utilizada en todo el mundo (Ardö, 1999).

Para llevar a cabo dicho fraccionamiento, en primer lugar, se preparó una suspensión del queso en citrato de sodio, y posteriormente, varias alícuotas del extracto se fraccionaron con distintos agentes precipitantes (Gripon y col., 1975, Bernal y col., 2001). De esta manera, 10 g de queso se homogeneizaron en un mortero con 20 ml de citrato de sodio 0,5 M y pH 7. La suspensión homogénea se trasvasó a un vaso de precipitado adicionando agua destilada hasta completar un volumen de aproximadamente 90 ml. Se agregó gota a gota una solución de HCl 20% v/v a la suspensión, bajo agitación mecánica, hasta alcanzar pH 4,6. Una vez que dicho valor se estabilizó, se centrifugó a 900 g durante 10 min, obteniéndose dos fracciones, una soluble y otra insoluble. La fracción insoluble se destinó al estudio electroforético conservándose congelada a -18°C hasta su posterior análisis. La fracción soluble se trasvasó a un matraz de 100 ml, se enrasó con agua destilada y se homogeneizó. Se tomaron 10 ml para la determinación del contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), realizando la digestión y destilación posteriores.

Luego, se tomaron 15 ml de la fracción anterior, que se colocaron en un vaso de precipitado, al cual se adicionaron lentamente 15 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 24% y en condiciones de agitación. Se dejó en reposo durante 30 min y se filtró sobre papel Whatman N° 42. Se tomó un volumen de 20 ml para la determinación del contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl. Esta fracción se denominó nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (NS-TCA).

Finalmente, la última fracción que se analizó fue el nitrógeno soluble en ácido fosfotúngstico 2,5% (NS-PTA). Para ello, se tomaron 25 ml de la fracción soluble a pH 4,6, que se colocaron en un tubo Falcon, al cual se le adicionaron 12,5 ml de ácido sulfúrico 25% v/v y 12,5 ml de ácido fosfotúngstico (PTA) 10% p/v, se agitó, dejándose luego en reposo durante 24 h en la heladera (5°C). Al día siguiente, el contenido total del tubo se filtró sobre papel Whatman N° 42 y se digirieron 30 ml del filtrado para la determinación del contenido de nitrógeno.

Todas las fracciones NS se expresaron como porcentaje del Nitrógeno total.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

El residuo insoluble a pH 4,6 se analizó por electroforesis. Esta fracción está compuesta principalmente por las caseínas nativas sin degradar y los grandes péptidos producidos por la actividad proteolítica del coagulante y la plasmina (Ardö, 1999,

Zalazar y col., 2004). El residuo insoluble a pH 4,6 se analizó por electroforesis Urea-PAGE. Se utilizó una cuba vertical Mini-Protean II (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos), con una fuente de poder modelo 1000/500 (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos) aplicando un sistema de gel discontinuo (Andrews, 1983). Se empleó una concentración de acrilamida de 4% para el gel de apilamiento, y de 7,5% para el gel de separación (Hynes y col., 1999). Los geles se colorearon con solución de Coomassie Blue R-250 al 0,2% (p/v) en ácido acético, etanol y agua destilada (1,6:4:4) durante 1 h (Blakesley y Boezi, 1977), y luego se decoloraron mediante repetidos lavados con solución decolorante, compuesta por ácido acético, etanol y agua destilada (1:2,5:6,5). Las bandas de los perfiles electroforéticos fueron analizados visualmente.

Perfiles peptídicos por HPLC

Mediante esta metodología se resuelven péptidos o grupos de péptidos, y se obtiene un perfil proteolítico característico de cada muestra. El perfil peptídico representa una “fotografía instantánea” del proceso de proteólisis a un tiempo determinado, por lo que es característico de cada muestra y refleja el complejo equilibrio entre la producción de los péptidos y su posterior degradación para dar aminoácidos libres y sus productos metabólicos (Pripp y col., 2000).

El equipamiento utilizado fue el mismo que el descrito para el análisis de actividad coagulante, pero las condiciones cromatográficas fueron diferentes. Las corridas se llevaron a cabo a una temperatura de 40°C, y longitud de onda de detección de 214 nm. Los solventes de elución empleados en cada corrida fueron Agua-Ácido trifluoroacético 1000:1,1 (Solvente A) y Acetonitrilo-Agua-Ácido trifluoroacético 600:400:1 (Solvente B) (Hynes y col., 2003). El flujo de fase móvil fue de 1 ml min⁻¹ y el gradiente de elución que permite la separación de los péptidos solubles en agua se detalla a continuación: la estabilización inicial de la columna se realiza con el solvente A al 100% durante los primeros 10 min de corrida; luego la proporción de A comienza a disminuir mientras que la de B aumenta, llegando a los 90 min con una proporción de solventes de 20% para A y 80% para B; al siguiente minuto B llega al 100%, condición que se mantiene durante 4 min más y finalmente se retornó a las condiciones iniciales en 1 min manteniéndolas durante los 10 min restantes. Todos los cambios realizados fueron lineales.

El análisis de los perfiles peptídicos se realizó sobre un extracto de queso soluble en agua. Para ello, se pesaron 5,00 g de una muestra de queso que se colocaron en un mortero, y se agregó aproximadamente 15 ml de agua destilada en forma gradual, disgregando la muestra hasta homogeneización total. Se trasvasó el contenido del mortero a un tubo Falcon de 50 ml de capacidad, enjuagando con 5 ml de agua destilada, e incorporando dicho líquido al tubo. Durante esta operación, se trató de no incorporar la materia grasa al tubo, ya que su presencia dificulta el procedimiento posterior de filtrado. El tubo se colocó en un baño maría a 40°C, y se mantuvo durante 1 h, luego de lo cual se centrifugó a 3000 g durante 30 min. Luego, se descartó cualquier resto de grasa que hubiere quedado en el tubo con la ayuda de una varilla de vidrio, y la fracción acuosa se trasvasó a un matraz de 25 ml, previo filtrado a través de papel de filtrado rápido. El matraz se enrasó con agua destilada, se homogeneizó, y se colocó en colectores adecuados. Una alícuota de este extracto fue filtrada a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Millex, Millipore, São Paulo, Brazil), y un volumen de 60 µl fue inyectado en el HPLC (Hynes y col., 2003). El análisis de los perfiles peptídicos se realizó visualmente.

2.5 Análisis estadístico

La concentración de grasa, proteínas, humedad, plasmina y plasminógeno fueron procesadas por análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Para las demás variables, el tiempo de maduración, el tipo de coagulante utilizado y las diferentes temperaturas de cocción de los diferentes tratamientos aplicados fueron seleccionados como factores principales para el análisis. Se utilizó un diseño factorial para medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED, SAS Ver. 9.2, SAS Institute, Inc., Cary, Estados Unidos). En el caso en que la interacción resultó significativa ($P \leq 0.05$), se procedió a la "apertura" de la misma. Esto consiste en probar las hipótesis correspondientes a los efectos simples de uno de los factores para cada uno de los niveles del otro factor, considerando como término de error el correspondiente al modelo completo. Posteriormente, para cada efecto simple que resultó significativo se aplicó una prueba de comparaciones múltiples (Prueba de LSD) para detectar grupos de niveles homogéneos ($\alpha = 0,05$).

3. Resultados

3.1 Determinación de la dosis de coagulante

La Figura 2.3 muestra las dosis de coagulantes ensayadas y los tiempos de coagulación luego de la adición del coagulante obtenidos.

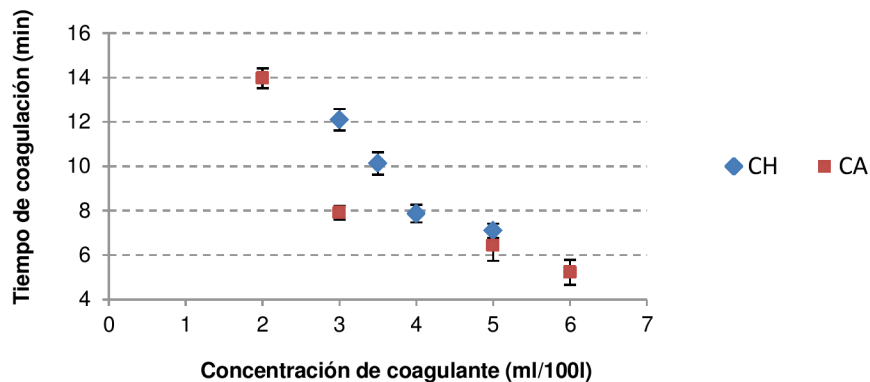


Figura 2.3. Tiempo de coagulación en función de la concentración de coagulante evaluada. Los valores corresponden al promedio \pm la desviación estándar de las 3 repeticiones efectuadas.

Como se observa en la figura, concentraciones de 4 ml de CH/100 litros de leche y de 3 ml de CA/ 100 litros de leche produjeron un tiempo de coagulación igual de 8 min. Por lo tanto esa fue la dosis de cada coagulante que se utilizó para la elaboración de los quesos de las diferentes experiencias.

3.2 Composición química, pH y recuentos microbiológicos

La composición química de todos los quesos a los 50 días de maduración fue similar (Tabla 2.2). El tiempo de maduración influyó significativamente en el pH de los quesos (tanto los elaborados con diferentes coagulantes como los elaborados utilizando diferentes temperaturas de cocción). Se observó que los quesos de 90 días de maduración tuvieron un valor de pH significativamente mayor que en los otros tiempos analizados. Los valores promedio obtenidos fueron 5,20, 5,23 y 5,34 para los 6, 50 y 90 días de maduración, respectivamente.

Tabla 2.2. Composición química y pH de los quesos de los diferentes tratamientos (media \pm desviación estándar). Los valores de pH se presentan a los diferentes días de maduración

Quesos	Grasa en BS (%)	Proteínas en BS (%)	Humedad (%)	pH-6	pH-50	pH-90
CA - 50°C	39,45 \pm 1,92	54,17 \pm 0,12	37,43 \pm 0,93	5,15 \pm 0,05	5,20 \pm 0,14	5,29 \pm 0,13
CA - 56°C	39,53 \pm 1,96	54,35 \pm 1,76	36,81 \pm 0,42	5,23 \pm 0,04	5,28 \pm 0,04	5,41 \pm 0,08
CH - 50°C	38,90 \pm 1,06	53,83 \pm 0,06	38,94 \pm 0,49	5,21 \pm 0,01	5,24 \pm 0,01	5,31 \pm 0,05
CH - 56°C	37,73 \pm 1,55	54,95 \pm 0,92	39,23 \pm 0,30	5,23 \pm 0,01	5,21 \pm 0,07	5,36 \pm 0,06

BS: base seca

En relación a los recuentos de flora láctica, se alcanzó un máximo de 10^8 UFC /g a los 3 días para todos los quesos, valor que decreció en un orden logarítmico durante la maduración. Los recuentos pueden ser atribuidos mayoritariamente al fermento, ya que alcanzaron valores similares en todos los quesos.

3.3 Actividad de enzima coagulante residual y de plasmina

En las Tablas 2.3 y 2.4 se presentan la significancia de los efectos evaluados y sus interacciones, y la actividad coagulante residual de los quesos respectivamente.

Tabla 2.3 Significancia de los efectos tiempo de maduración (F1), tipo de coagulante (F2) y temperatura de cocción (F3) de los quesos y sus interacciones sobre los resultados de actividad coagulante residual

Variables	Significancia					
	F1	F2	F3	F1xF2	F1xF3	F2XF3
Actividad coagulante	*	NS	*	NS	NS	NS

*Indica efecto significativo ($P \leq 0.05$). NS: indica diferencia no significativa.

Tabla 2.4. Actividad coagulante residual de todos los quesos (valor promedio \pm desviación estándar de las cuatro réplicas de elaboración; nmol producto $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$) durante el tiempo de maduración. Los valores resaltados muestran que la actividad coagulante residual al final de la maduración fue mayor que en los quesos jóvenes

	Tiempo de maduración (días)	Quesos			
		CA		CH	
		50°C	56°C	50°C	56°C
Actividad coagulante residual (nmol producto $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$)	6	183,8 \pm 46,8	63,2 \pm 28,3	124,2 \pm 15,8	56,8 \pm 39,3
	50	269,8 \pm 64,1	132,1 \pm 34,4	194,0 \pm 74,6	169,9 \pm 30,6
	90	321,6 \pm 48,2	276,1 \pm 30,4	326,4 \pm 66,8	237,3 \pm 37,6

Los quesos que se trataron a 50°C tuvieron una actividad coagulante significativamente mayor que los quesos escaldados a 56°C durante todo el tiempo de maduración. Además se observó que la actividad coagulante residual se incrementó significativamente durante el tiempo de maduración para todos los quesos, lo que sugiere una reactivación de la enzima luego del tratamiento térmico. En efecto, se observa que la actividad de la enzima coagulante residual al inicio de la maduración, fue mucho menor que al final de la maduración (Tabla 2.4). Si bien no existió interacción significativa entre el tiempo de maduración y la temperatura, numéricamente se observa que este efecto fue mucho más evidente en aquellos quesos que se trataron a 56°C y consecuentemente, las diferencias atribuibles a la temperatura de cocción fueron menores a medida que el tiempo de maduración avanzó.

Respecto al tipo de coagulante utilizado, las diferencias entre la actividad residual de CH y CA no fueron estadísticamente significativas (Tabla 2.3), independientemente del tiempo de maduración y la temperatura de cocción. Estos resultados indican que los experimentos de selección de la dosis de coagulante además de permitir obtener tiempos de coagulación equivalentes, fueron adecuados para obtener una actividad similar de los coagulantes durante la maduración de los quesos.

La actividad de la plasmina y de plasminógeno en los quesos de 90 días de maduración no fue afectada por la temperatura de cocción. Los valores promedio para

todos los quesos fueron $4,65 \pm 1,13$ nmoles AMC $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ y $5,28 \pm 0,68$ nmoles AMC $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ para plasmina y plasminógeno respectivamente.

3.4 Seguimiento de la proteólisis

Nitrógeno soluble (NS)

En la Tabla 2.5 se observa la significancia de los efectos evaluados y sus interacciones para todas las fracciones solubles. Los resultados de las fracciones NS obtenidos (valor promedio \pm desviación estándar de las cuatro réplicas de elaboración) de todos los quesos a lo largo de la maduración se observan en la Tabla 2.6.

Tabla 2.5 Significancia de los efectos tiempo de maduración (F1), tipo de coagulante (F2) y temperatura de cocción (F3) de los quesos y sus interacciones sobre los resultados de las fracciones NS

Variables	Significancia					
	F1	F2	F3	F1xF2	F1xF3	F2XF3
NS-pH 4,6	*	*	*	NS	NS	NS
NS-TCA	*	*	*	NS	*	*
NS-PTA	*	*	*	NS	NS	NS

Tabla 2.6. Fracciones NS de todos los quesos (valor promedio \pm desviación estándar de las cuatro réplicas de elaboración) durante el tiempo de maduración

NS	Tiempo de maduración (días)	Quesos			
		CA		CH	
		50°C	56°C	50°C	56°C
NS-pH 4,6/NT (%)	6	5,0 \pm 0,6	3,1 \pm 1,5	5,0 \pm 0,2	4,7 \pm 0,1
	50	7,7 \pm 0,4	6,1 \pm 0,9	9,2 \pm 0,8	6,6 \pm 0,2
	90	8,9 \pm 0,2	7,8 \pm 1,9	10,5 \pm 0,7	10,2 \pm 1,7
NS-TCA/NT (%)	6	2,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,1	3,0 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1
	50	6,7 \pm 0,3	2,7 \pm 0,8	7,0 \pm 0,5	5,2 \pm 0,6
	90	7,7 \pm 0,1	4,9 \pm 1,1	8,7 \pm 0,3	6,4 \pm 0,1
NS-PTA/NT (%)	6	1,4 \pm 0,1	0,8 \pm 0,4	1,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
	50	3,2 \pm 1,0	1,7 \pm 0,3	3,3 \pm 0,4	2,2 \pm 0,1
	90	4,5 \pm 0,7	2,5 \pm 0,7	5,6 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1

El tiempo de maduración influyó significativamente en todas las fracciones NS (Tabla 2.5). A medida que el transcurrió el tiempo de maduración, el contenido de NS

de las diferentes fracciones se incrementó significativamente (Tabla 2.6). Por otra parte, el tipo de coagulante utilizado tuvo influencia significativa en las fracciones NS. En este sentido, los quesos elaborados con el coagulante CA, mostraron valores significativamente más bajos que los quesos elaborados con el coagulante CH para las dos temperaturas de cocción evaluadas durante todo el período de maduración. Para las fracciones NS-TCA, se observó interacción significativa entre los factores tipo de coagulante y temperatura de cocción (Tabla 2.5). Abriendo la interacción, se verificó que la diferencia entre los quesos CA y CH en la fracción NS-TCA fue sólo significativa en aquellos quesos cuya cuajada fue escaldada a 56°C. Por otro lado, se observaron claras diferencias entre los valores de todas las fracciones solubles en función de la temperatura de cocción utilizada en cada tratamiento, a través de todo el período de maduración (Tabla 2.5). Esas diferencias fueron observadas para los dos coagulantes ensayados. Los quesos tratados a 56°C tuvieron menores valores de todas las fracciones solubles que aquellos que se llevaron hasta 50°C (Tabla 2.6). Para la fracción NS-TCA, la temperatura de cocción también tuvo interacción significativa con el tiempo de maduración (Tabla 2.5). Esto se debió a que si bien las fracciones NS-TCA se incrementaron durante la maduración para las dos temperaturas de cocción, el cambio fue menor a los 56°C que a los 50°C (Figura 2.4). A los 6 días de maduración, los niveles de NS-TCA fueron similares para las dos temperaturas de cocción, pero la diferencia se incrementa durante la maduración.

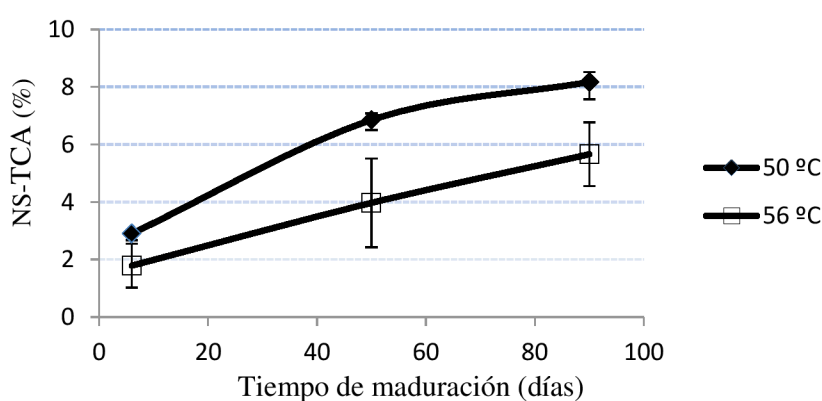


Figura 2.4. Evolución de NS-TCA en función del tiempo de maduración, expresado como porcentaje del N total. Para cada tiempo de maduración, los datos representan el valor promedio para la misma temperatura de cocción, independientemente del tipo de coagulante.

Resulta interesante destacar que las diferencias en la proteólisis que son atribuidas a la temperatura de cocción, fueron mayores en los quesos elaborados con coagulante de camello. En este sentido, se observó que el incremento en las fracciones NS de los quesos CA-50°C comparados con los quesos CA-56°C fueron mayores que las diferencias entre los quesos CH a las dos temperaturas (Tabla 2.6).

Electroforesis

En la Figura 2.5 se muestra una fotografía de los perfiles electroforéticos de los quesos de la primer elaboración en los diferentes tiempos de maduración evaluados. Los perfiles electroforéticos de las otras elaboraciones fueron similares y no se presentan. Al igual que lo observado para las fracciones NS, los quesos CA mostraron menores niveles de proteólisis que los quesos CH a las dos temperaturas de cocción evaluadas. A los 6 días de maduración, en los quesos CH se observa una débil banda de caseína α_{s1} -I (f24-199), la cual no fue observada en los quesos CA. Del mismo modo, se encontró una banda más débil de caseína α_{s1} intacta en los quesos CH.

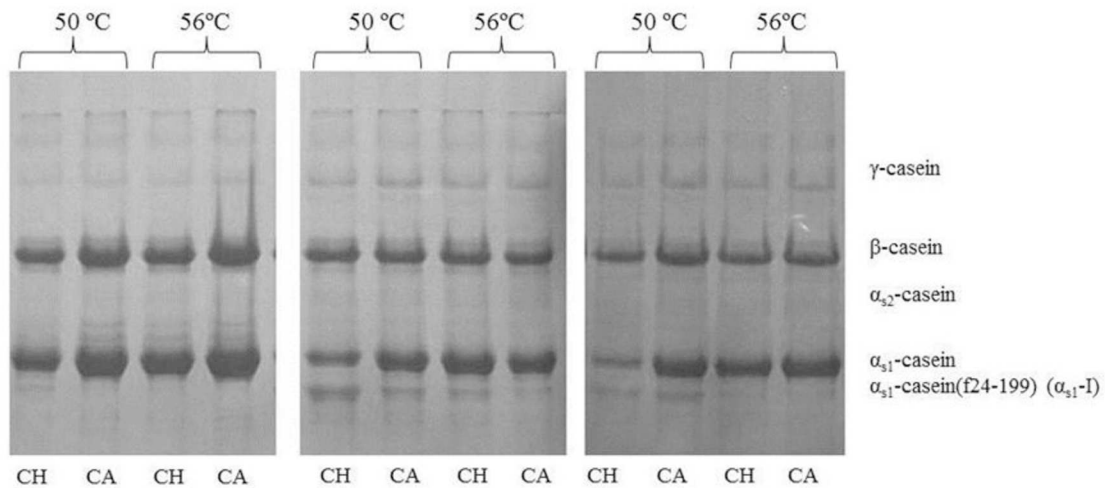


Figura 2.5. Perfiles electroforéticos de los quesos a 1, 50 y 90 días correspondientes a la primera elaboración

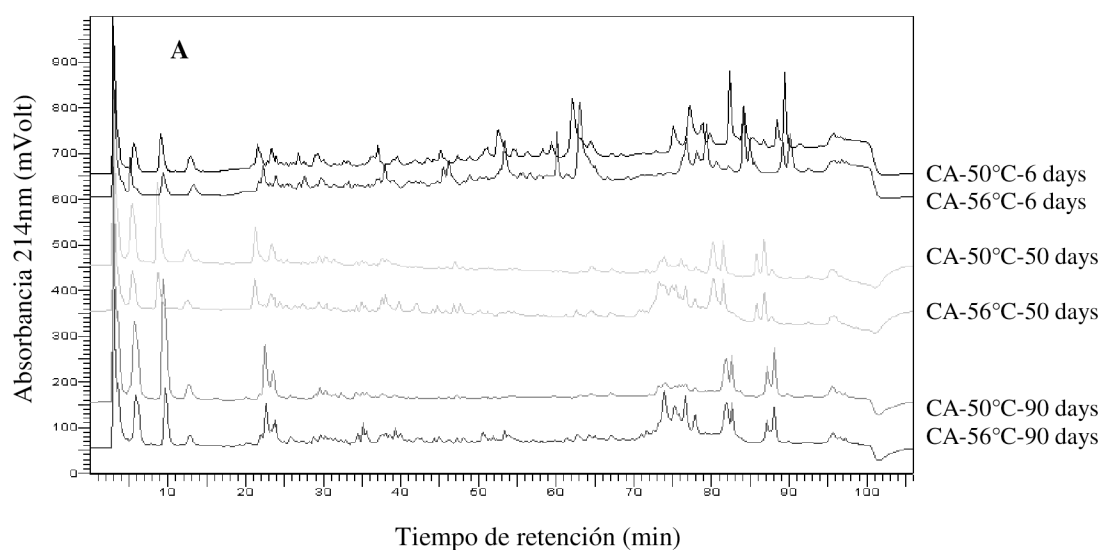
En cuanto a la influencia de la temperatura de cocción, la fracción de caseína α_{s1} -I se detectó en los quesos CH tratados a 50°C desde el inicio de la maduración, mientras que en los quesos en los que la temperatura de cocción fue de 56°C, ésta fue observada recién luego de los 50 días. Se observó además que esta fracción presentó a

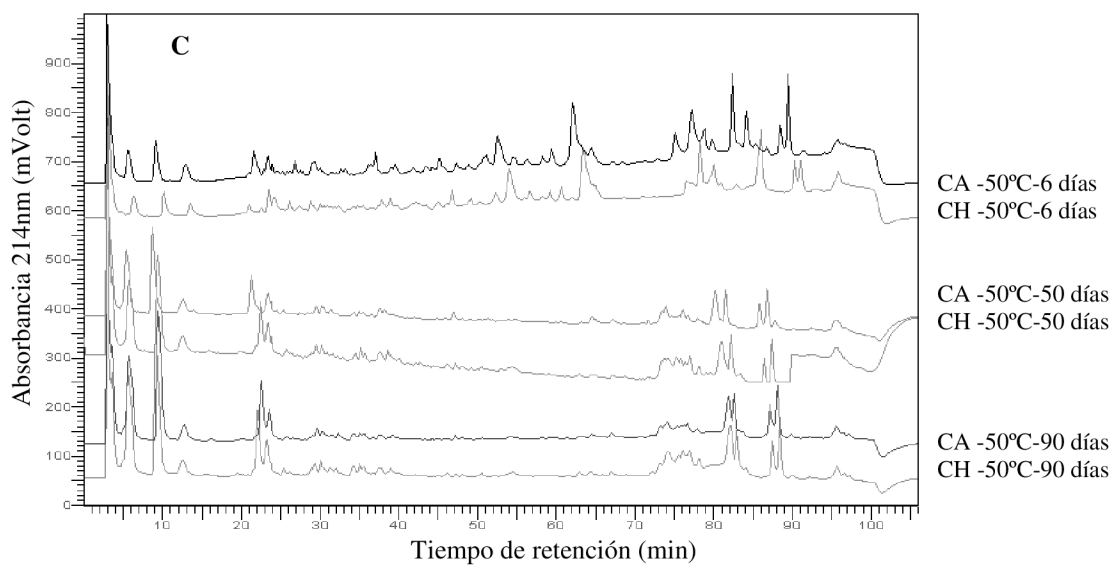
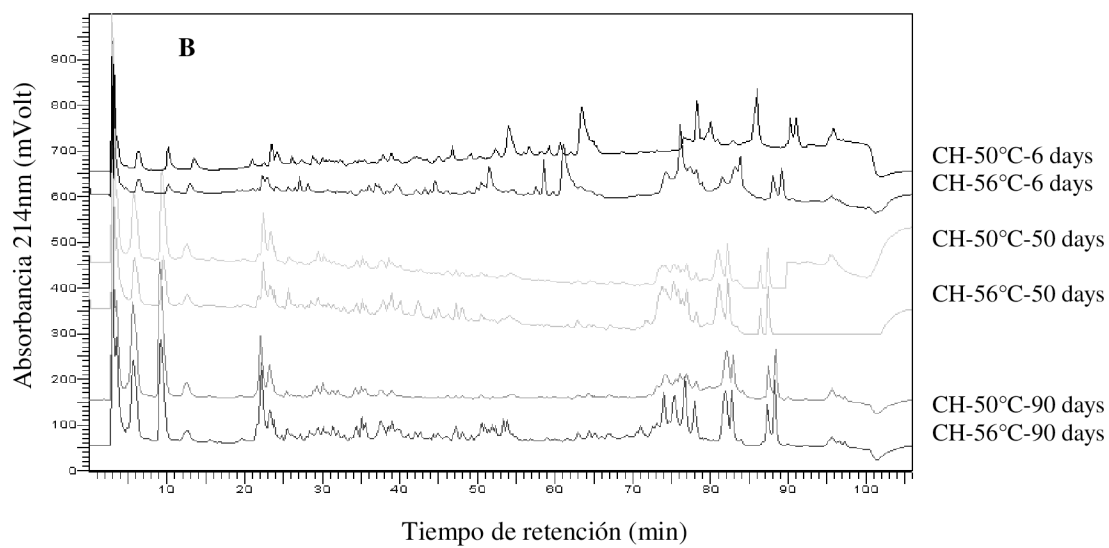
los 50 y 90 días de maduración una intensidad mayor en los quesos llevados hasta menor temperatura.

Las fracciones de caseína γ se incrementaron durante la maduración, pero no se observaron diferencias entre los quesos debida a la temperatura de cocción o al tipo de coagulante. Tampoco se observó efecto de los diferentes tratamientos en las bandas correspondientes a las caseínas β .

Péptidos solubles en agua por HPLC

Durante la maduración, se observaron cambios en los perfiles peptídicos de los quesos, los cuáles fueron más evidentes en aquellos que se trataron a 50°C (Figura 2.6). Comparando los perfiles electroforéticos de los quesos cuyo tratamiento térmico se efectuó a 50 y 56°C, se observó en los primeros una marcada disminución de los péptidos hidrofóbicos, los cuáles se encuentran ubicados desde la mitad hacia la parte final del cromatograma (a un tiempo de elución mayor a 40 min), y un mayor aumento de péptidos hidrofílicos, ubicados al inicio del cromatograma. Los perfiles fueron similares al comparar los dos tipos de coagulantes ensayados a 50°C. Sin embargo, al comparar los quesos tratados a 56°C, se observó una menor proteólisis en los quesos CA, evidenciado por una menor altura de picos correspondientes a compuestos hidrofílicos al inicio del cromatograma.





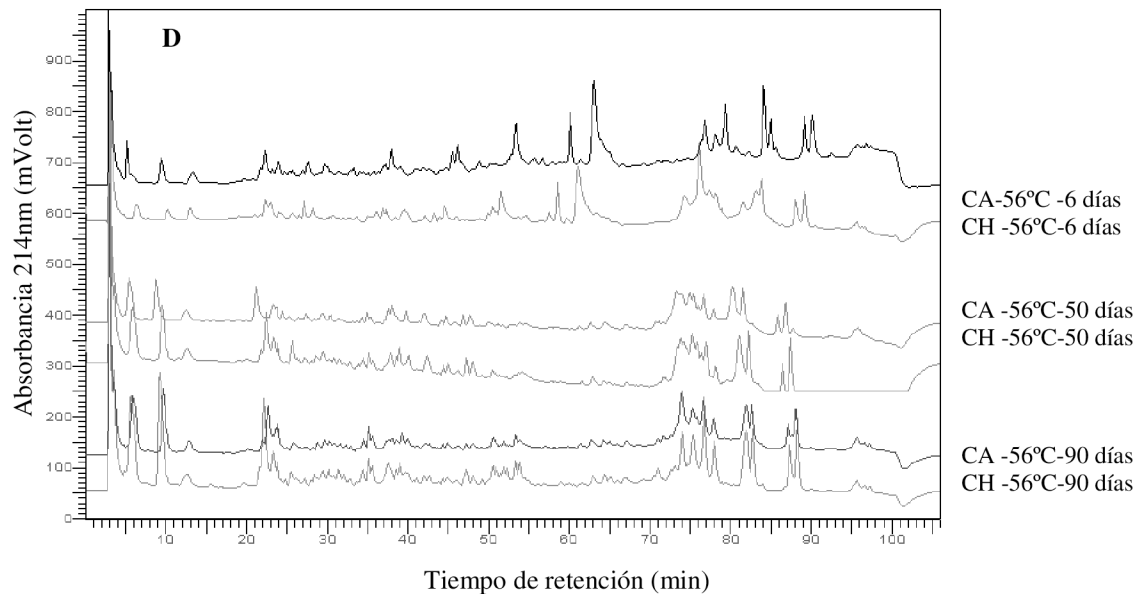


Figura 2.6. Perfiles peptídicos de los quesos a 6, 50 y 90 días de maduración. A) Quesos CA 50 y 56°C, B) Quesos CH a 50 y 56°C, C) Quesos CA y CH a 50°C y D) Quesos CA y CH a 56°C

4. Discusión

La proteólisis depende en gran parte de la presencia de agentes proteolíticos presentes en la matriz del queso y de su actividad en las condiciones ambientales del alimento, que a su vez derivan de la tecnología de elaboración utilizada. En este capítulo se evaluó si la disminución de la temperatura de cocción del queso Reggiano puede ser utilizada como una estrategia para incrementar la proteólisis y por lo tanto, acelerar la maduración de este tipo de queso. Esto fue ensayado en presencia de dos enzimas coagulantes obtenidas por fermentación que se utilizan en Argentina: quimosina bovina y de camello.

Durante la maduración de los quesos, la actividad de coagulante retenido en la cuajada depende de varios factores, tales como el pH de drenado del suero, la temperatura de cocción, la humedad del queso y el tipo de coagulante (Bansal y col., 2007; Bansal y col., 2009b; Vélez y col., 2011). Por lo tanto, la actividad coagulante residual varía ampliamente entre los diferentes tipos de queso (Holmes y col., 1977; Grappin y col., 1985; Bansal y col., 2009b). En este trabajo, no se observaron cambios

en el contenido de humedad de los quesos a pesar de que fueron elaborados con diferentes temperaturas. Esto se debió a que como se mencionó en la sección 2.3 de este capítulo, se controló el trabajo en tina para obtener una humedad similar en todos los quesos, de modo de obtener matrices similares, y poder comparar la cantidad de coagulante residual y la proteólisis entre todos los quesos.

Algunos trabajos realizados en quesos duros de pasta cocida, demuestran que por lo general, contienen una actividad coagulante residual muy baja (Rampilli y col., 1998). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la inactivación del coagulante no fue completa y que además, durante la maduración se verificó una reactivación de esta enzima. La reactivación fue más importante cuando los quesos fueron tratados a mayor temperatura. Estudios previos realizados en queso Reggianito hallaron una tendencia similar, aunque incluían temperaturas de cocción muy elevadas, de hasta 60°C (Hynes y col., 2004a). Otras investigaciones demostraron además que la inactivación de la quimosina que ocurre durante la elaboración de queso Cheddar y aún en quesos Suizos, en los cuáles la temperatura de cocción es más elevada, era reversible (Hayes y col., 2002). En el presente trabajo, comparando la cantidad de enzima coagulante residual a los noventa días de maduración con la del inicio de este período, se observó que la misma fue del doble cuando los quesos se trataron a 50°C, mientras que el incremento fue de 4 veces cuando la temperatura de cocción fue de 56°C. Esto produjo que al final de la maduración, las diferencias encontradas inicialmente en la actividad coagulante residual tiendan a disminuir, presentando todos los quesos valores similares.

La actividad coagulante residual de los quesos fue similar para los dos coagulantes ensayados, para ambas temperaturas de cocción. Sin embargo, ciertos indicadores de proteólisis tales como los perfiles peptídicos y las fracciones nitrogenadas, indicaron menor proteólisis en los quesos elaborados con quimosina de camello cuando se aplicó una temperatura de cocción más elevada. Estos resultados sugieren que la quimosina de camello fue más sensible a la temperatura de cocción de 56°C. Vallejo y col. (2012) encontraron resultados diferentes, ya que reportaron que la quimosina de camello fue más termoestable que la bovina entre los 50 y 60°C. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos estudios de termoestabilidad fueron realizados *in vitro*, y no se consideraron los posibles efectos de la matriz del queso sobre esta propiedad.

La temperatura de cocción puede afectar la actividad de plasmina (Somers y Kelly, 2002; Ismail y Nielsen, 2010), sin embargo, en los quesos ensayados en este estudio no existieron diferencias. Lo mismo fue encontrado en estudios previos realizados en minicuajadas modelo de queso Reggiano (Vélez y col., 2011). En los trabajos en los cuales se observaron diferencias en la actividad de plasmina, las mismas fueron significativas cuando los quesos se cocinaron a temperaturas muy diferentes, como por ejemplo 48 y 55°C (Somers y Kelly, 2002). También las diferencias mencionadas por Ismail y Nielsen (2010) son debido a que se comparan diferentes variedades de quesos que son elaborados con distintas temperaturas de cocción. Estos investigadores mencionan que en los quesos Suizos, cuya cuajada se escalfa a temperaturas mayores a 50°C, los niveles de plasmina son mayores al compararlos con Cheddar, en los cuales la temperatura de semi-cocción no supera los 37°C.

La proteína más susceptible al ataque del coagulante durante la maduración del queso es la α_{s1} -caseína, siendo el principal sitio de ataque el enlace Phe₂₃-Phe₂₄, con la consiguiente producción de los péptidos α_{s1} (f1-23) y α_{s1} -I (f24-199) (Carles y Ribadeau-Dumas, 1985). El primer péptido, más pequeño y soluble en agua, se degrada rápidamente por acción de las enzimas del fermento, y no se detecta en la electroforesis. El segundo péptido, α_{s1} -I (f24-199), es insoluble en agua y puede ser visualizado en las corridas electroforéticas (Fox, 2003, McSweeney, 2004). Los resultados de los perfiles electroforéticos concuerdan con los obtenidos para la actividad coagulante residual. Los quesos de 50°C, que mostraron mayor actividad coagulante residual, también mostraron una mayor degradación de la caseína α_{s1} con una consiguiente mayor producción del péptido α_{s1} -I (f24-199). Resultados similares fueron obtenidos por Sheehan y col. (2007), quienes observaron que el incremento en la temperatura de cocción durante la elaboración de quesos semiduros redujo la degradación de la α_{s1} -caseína, en el orden de 53 < 50 < 47°C. La hidrólisis de la caseína α_{s1} , para dar las fracciones α_{s1} (f1-23) y α_{s1} (f24-199) es catalizada por la quimosina en quesos de pasta blanda y semiduros, no cocidos, en etapas tempranas de la maduración, debido a la actividad relativamente alta de la enzima coagulante en estos tipos de quesos (de Jong, 1978). En quesos duros y de pasta cocida, el péptido α_{s1} (f24-199) aparece en etapas tardías de la maduración, en general después de los 45 días (Hynes y col., 2004a). Esto puede deberse a que la hidrólisis de la caseína α_{s1} tiene lugar luego de cierto grado de reactivación de la quimosina residual, cuando las condiciones medioambientales adversas que tienen lugar

durante la elaboración del queso (etapa de cocción) ya han sido superadas (Hynes y col., 2004a).

La fracción de NS-pH 4,6 refleja principalmente la acción de la quimosina residual y plasmina y, en menor medida, la acción de las proteasas de pared del fermento primario, y la información que brinda es prácticamente la misma que la electroforesis (Sousa y col., 2001). Por otro lado, tanto la fracción de NS-TCA y NS-PTA, que contienen fundamentalmente péptidos de medianos a pequeños, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados menores (Ardö, 1999) son el resultado principalmente de la actividad de enzimas microbianas, aunque el coagulante también puede aportar péptidos a estas fracciones. En todos los quesos que se trataron a 50°C, se observó un incremento en todas las fracciones NS. La mayor producción de péptidos grandes e intermedios (fracciones solubles a pH 4,6 y en ácido tricloroacético) en los quesos con una cocción a menor temperatura sería resultado de la mayor actividad coagulante residual detectada en estos quesos. Asimismo, la acción del coagulante sobre las caseínas genera péptidos que pueden ser hidrolizados por las proteasas y peptidasas microbianas produciendo péptidos más pequeños, aminoácidos libres y compuestos de aroma y sabor (Gobetti y DiCagno, 2003; Upadhyay y col., 2004). Los valores más elevados de NS-PTA durante la maduración, podría deberse a este efecto indirecto del coagulante, ya que un pool muy rico de péptidos de tamaño intermedio estaría disponible favoreciendo la proteólisis y peptidólisis por el cultivo del fermento (Sousa y col., 2001; Gobetti y DiCagno, 2003; Upadhyay y col., 2004). Si bien en este trabajo existe relación entre el incremento de la actividad coagulante residual y la producción de los péptidos generados por esta enzima, no se debe descartar que existen antecedentes que sugieren que otras enzimas, como la catepsina D (Hayes y col., 2001) y enzimas de la pared celular de ciertas cepas de *Lactobacillus helveticus* (Delacroix Buchet y Fournier, 1992; Sadat-Mekmene y col. 2013) pueden contribuir a la producción del péptido α_{s1} -I en quesos elaborados con temperaturas de cocción elevadas.

Comparando el tipo de coagulante ensayado, se pudo observar que los quesos elaborados con quimosina de camello, presentaron menor proteólisis durante la maduración, lo cual fue verificado por menores niveles de ciertos índices de proteólisis en los mismos. Una tendencia similar fue obtenida por Bansal y col. (2009a) en quesos Cheddar elaborados con estas mismas enzimas coagulantes, al comprobar que la

utilización del coagulante de camello condujo a menores niveles de proteólisis en comparación con la quimosina bovina. No obstante, estos autores encontraron diferencias cuantitativas bien marcadas en los perfiles peptídicos de los quesos analizados, atribuyendo tales diferencias tanto a que la cantidad de coagulante de camello utilizada fue menor, por su mayor poder coagulante, como a su actividad proteolítica no específica menos intensa. En efecto, estudios previos de caracterización de la enzima coagulante de camello (Kappeler y col., 2006), informaron una mayor especificidad de la misma y una actividad proteolítica no específica menor en comparación con la quimosina bovina (relación coagulación/proteólisis más elevada). Bansal y col. también encontraron hidrólisis de la caseína β en los quesos elaborados con quimosina bovina, lo cual no fue verificado en quesos elaborados con quimosina de camello. En los quesos del presente ensayo, no se identificó la fracción β (f1-189/192) en ninguno de los quesos analizados. Los cambios atribuibles al tipo de quimosina en este trabajo, fueron detectados principalmente en las fracciones NS y en los perfiles peptídicos.

En quesos Cheddar con contenido de grasa reducido, el uso de quimosina de camello condujo a menor proteólisis y menor sabor amargo, comparando los quesos con los elaborados utilizando quimosina bovina. Este último efecto se atribuyó a la disminución de péptidos hidrofóbicos a partir de la caseína β (Govindasamy-Lucey y col., 2010; Børsting y col., 2012). Møller y col. (2012) también verificaron menor actividad proteolítica de la quimosina de camello *in vitro* sobre las caseínas α_{s1} y β en comparación con la quimosina bovina. Møller y col. (2013) encontraron que quesos Cheddar reducidos en sal elaborados con quimosina bovina tuvieron menores cantidades de caseína α_{s1} intacta que aquellos elaborados con quimosina de camello, especialmente durante etapas tempranas de la maduración. En quesos Mozzarella de baja humedad parcialmente descremado, Moynihan y col. (2014) también encontraron menores niveles de proteólisis en los quesos elaborados con quimosina de camello que en los elaborados con quimosina bovina, lo cual es considerado beneficioso por los autores, ya que alargaría la vida útil de estos quesos. Al igual que en el presente estudio, Moynihan y col. utilizaron dosis equivalentes de ambos coagulantes, tomando como criterio el tiempo de coagulación de la leche luego de la adición del coagulante.

Las investigaciones realizadas hasta el momento sobre el uso de quimosina de camello, indica que los defectos en la proteólisis atribuibles al uso de la quimosina

bovina, especialmente en quesos reducidos en grasa o parcialmente descremados pueden evitarse o minimizarse reemplazando esta quimosina por la de camello. Sin embargo, en el presente estudio, no se encontraron defectos o cambios negativos asociados a la proteólisis debido a la quimosina bovina, y su sustitución por la quimosina de camello no cambió significativamente el patrón de la proteólisis primaria del queso. En efecto, no se detectó ningún cambio en la zona de picos hidrofóbicos del cromatograma (picos de más de 40 min de retención) cuando se compararon los dos coagulante ensayados.

Las investigaciones sobre la proteólisis de quesos mediada por la quimosina de camello son novedosas y pueden presentar resultados disímiles, especialmente cuando se comparan diferentes variedades de queso.

5. Conclusiones

La utilización de temperaturas de cocción más baja condujo a aceleración de la proteólisis del queso Reggianito, debido a un incremento en la actividad coagulante residual.

La actividad coagulante residual se incrementó durante la maduración, y mostró una tendencia a igualarse en todos los quesos a los 90 días. Sin embargo, la actividad coagulante residual, al igual que la proteólisis fue siempre mayor en los quesos que se trataron a una menor temperatura de cocción, para todos los índices de proteólisis evaluados

En cuanto a la comparación entre la quimosina de camello y la bovina, los resultados del presente estudio confirmaron que la quimosina de camello es menos proteolítica que la bovina, aunque las diferencias encontradas no fueron tan marcadas como las informadas por otros autores. Los patrones de proteólisis fueron similares para ambas enzimas, especialmente los observados por electroforesis, pero en los quesos elaborados con quimosina bovina, la peptidólisis fue cuantitativamente más intensa a tiempos similares de maduración, para las dos temperaturas de cocción estudiadas. No se detectaron evidencias de productos defectuosos o proteólisis alterada, como péptidos hidrofóbicos derivados de la caseína β , en ninguno de los quesos evaluados.

Capítulo 3

*EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ALTAS
PRESIONES HIDROSTÁTICAS (APH) SOBRE LA
COMPOSICIÓN, LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y LA
PROTEÓLISIS DE QUESO REGGIANITO*

1. Introducción

El Tratamiento de Altas Presiones Hidrostáticas (APH) se plantea como una estrategia innovadora que puede ser utilizada con el objetivo principal de disminuir el período de maduración de los quesos, que alcanza largos periodos en variedades de quesos duros y semiduros, y durante el cual se producen complejas transformaciones bioquímicas sobre las proteínas, las grasas y los glúcidos que dan lugar a la textura, flavour y funcionalidad características de las diferentes variedades (O'Reilly y col., 2001; Trujillo y col., 2002; San Martín Gonzalez y col., 2007).

El interés en estudiar el efecto del tratamiento con APH sobre quesos, se inició en parte por los prometedores resultados presentados en la patente de Yokohama y col., (1992), en la cual se evidenció que quesos Cheddar que fueron expuestos a presiones de 50 MPa durante 3 días a 25°C, presentaron una concentración de aminoácidos libres y un flavour comparable a quesos comerciales con 6 meses de maduración. A partir de este estudio, comenzaron a realizarse otras investigaciones, en quesos Cheddar (O'Reilly y col., 2000, O'Reilly y col., 2001), Gouda (Messens y col., 1999), y queso duro de cabra (Saldo y col., 2001), utilizando tratamientos similares a los aplicados por Yokohama y col. (1992). Estos trabajos en su mayoría concluyeron que la aplicación de las combinaciones presión - tiempo estudiadas tuvieron relativamente poco efecto sobre la maduración de los quesos. Esto en parte fue atribuido a que en el trabajo de Yokohama y col., además del tratamiento con APH, utilizaron en el experimento una dosis de cultivo láctico iniciador aproximadamente diez veces mayor que las frecuentemente utilizadas para la elaboración de queso Cheddar, lo que seguramente influyó en la aceleración de la maduración observada.

Comenzaron entonces a plantearse otros estudios, en diferentes variedades de queso, variando las combinaciones presión-tiempo, evaluando el impacto en diferentes aspectos relacionados a la maduración (Martinez-Rodriguez y col., 2012). La mayoría de los estudios se han realizado en quesos Cheddar (O'Reilly y col 2002; O'Reilly y col., 2003; Wick y col., 2004; Rynne y col., 2008; Ozturk y col., 2013a y b). También se llevaron a cabo investigaciones en otra variedad de queso duro no cocido (Yang y col., 2014), en queso Mozzarella (Sheehan y col., 2002), en quesos Edam (Iwaczak y Winiewska, 2005), en quesos Gouda (Liu y col., 2011), en quesos frescos (Okpala y

col., 2011), en quesos de cabra (Saldo y col., 2002), en quesos de oveja (Garde y col., 2007; Juan y col., 2008; Moschopoulou y col., 2010), y en quesos madurados por hongos (Calzada y col., 2014; Voigt y col., 2010). Sin embargo, en quesos duros de pasta cocida, tales como los quesos italianos Parmigiano-Reggiano o el Grana Padano, el queso suizo Sbrinz y el queso Reggianito argentino, los cuales muestran los períodos de maduración más largos, entre 6 meses y 2 años, no se ha realizado hasta el presente ningún estudio de altas presiones. La posibilidad de disminuir el tiempo de maduración de estos quesos por medio de la tecnología de APH, tendría el beneficio económico de bajar los altos costos que insume mantener almacenados grandes volúmenes de producto durante períodos de tiempo prolongados.

El objetivo del presente capítulo consistió en evaluar el efecto del tratamiento con APH sobre la proteólisis del queso Reggianito, en pos de determinar si es favorable a una aceleración de la maduración. Asimismo, se valoró la influencia de la aplicación de APH sobre la composición global del queso y sobre las bacterias lácticas tanto del fermento como las no aportadas por el cultivo.

2. Materiales y Métodos

2.1 Diseño experimental

Para la realización del estudio se utilizó un diseño factorial completo 2^2 , siendo los factores el nivel de presión (100 y 400 MPa) y el tiempo de mantenimiento de la presión (5 y 10 min). Esto dio lugar a 4 tratamientos: T1 (100 MPa-5 min), T2 (100 MPa-10 min), T3 (400 MPa-5 min) y T4 (400 MPa-10 min). Además, se incluyó un tratamiento control (C, quesos no tratados con APH) (Tabla 3.1). Los quesos tratados con APH y los controles se maduraron en cámara (con control de temperatura y humedad) a 12°C durante 1, 45 y 90 días post tratamiento con APH. Se realizaron 4 repeticiones del ensayo completo, es decir 4 procesos completos: elaboración + tratamiento con APH/control + periodo de maduración.

Tabla 3.1. Tratamientos evaluados. Presión y tiempos de presurización aplicados en cada tratamiento. C: control; T1 a T4: tratamientos 1 a 4 respectivamente

Tratamiento	Presión (MPa)	Tiempo (min)
C	0,1	0
T1	100	5
T2	100	10
T3	400	5
T4	400	10

2.2 Elaboración de los quesos

Se realizaron 4 elaboraciones de quesos, utilizando la tecnología descrita y validada en la sección 2.2 del capítulo 1. Para cada elaboración se utilizaron 180 litros de leche cruda proveniente del tambo experimental de la EEA Rafaela, cuya composición y pH promedio fueron: grasa $3,62 \pm 0,06$ %; proteínas $3,5 \pm 0,07$ %, sólidos totales $12,68 \pm 0,06$ % y pH $6,81 \pm 0,06$). El tiempo de coagulación promedio \pm la desviación estándar correspondiente a las 4 elaboraciones fue de $7,18 \pm 0,66$ min. Luego de la etapa de pre-prensado, los quesos se formaron en moldes cilíndricos miniatura, de material plástico, de 5,5 cm de diámetro por 10 cm de alto, de manera de obtener quesos de un tamaño adecuado para su tratamiento en el cilindro del equipo APH. Luego de moldeados, los quesos fueron prensados en simultáneo durante 20 horas en prensa horizontal y posteriormente se salaron en salmuera saturada a 12°C durante 6 horas. El peso promedio de los quesos a la salida de salmuera fue de 250 g. Antes del tratamiento con APH, se envasaron al vacío en bolsas de película Cryovac BB2800CB (permeabilidades: O₂ 30 cm³ m⁻² 24hs⁻¹ bar⁻¹; CO₂ 150 cm³ m⁻² 24 h⁻¹ bar⁻¹; vapor de agua 20 g 24 h⁻¹ m⁻², Sealed Air Co., Buenos Aires, Argentina), utilizando una envasadora de doble campana RapiVac Modelo Maximax 800 G. Se obtuvieron 40 miniquesos por elaboración, los cuales se dividieron al azar de la siguiente manera: 8 controles, y 8 para cada tratamiento (T1 a T4).

2.3 Tratamiento con Altas Presiones Hidrostáticas (APH) y maduración de los quesos

Los quesos fueron sometidos al tratamiento con APH a las 24 h posteriores a cada elaboración, según el diseño descrito en 2.1, teniendo en cuenta un estudio de O'Reilly y col. (2000) en el cual se demuestra que el tratamiento fue más eficiente en términos de aceleración de la proteólisis cuando se aplica en quesos jóvenes. El tratamiento se realizó utilizando el equipo Stansted Fluid Power (cilindro de 2 l, presión máxima 900 MPa, modelo Iso-Lab System FPG9400:922, Stansted, Reino Unido), cuya descripción se detalla en la sección 5.4.3 de la Introducción. El fluido de compresión utilizado consistió en una mezcla de alcohol propilenglicol y agua destilada en proporción 30:70. Se trabajó a una velocidad de presurización de 300 MPa min⁻¹ y una temperatura inicial del cilindro de 20°C. Los quesos envasados al vacío se introdujeron en el canasto del sistema APH, a razón de 4 quesos por corrida (Figura 3.1). Cada tratamiento se repitió dos veces, por lo tanto se obtuvieron en total 8 quesos iguales por tratamiento, provenientes de la misma unidad experimental (elaboración). Luego del tratamiento, se retiraron del canasto y se les quitó el envase. Posteriormente, los quesos tratados con APH y los quesos control fueron madurados en cámara (con control de temperatura y humedad) a 12°C por un período máximo de 90 días. Para evitar una pérdida de humedad excesiva en los quesos y lograr que los mismos tengan una humedad similar a los quesos producidos a nivel industrial, se procedió a envasarlos al vacío a los 10 días posteriores al inicio del almacenamiento, utilizando una envasadora al vacío de mesada RapiVac modelo Minimax 430 y el mismo tipo de bolsas que se empleó para envasar los quesos antes del tratamiento con APH.

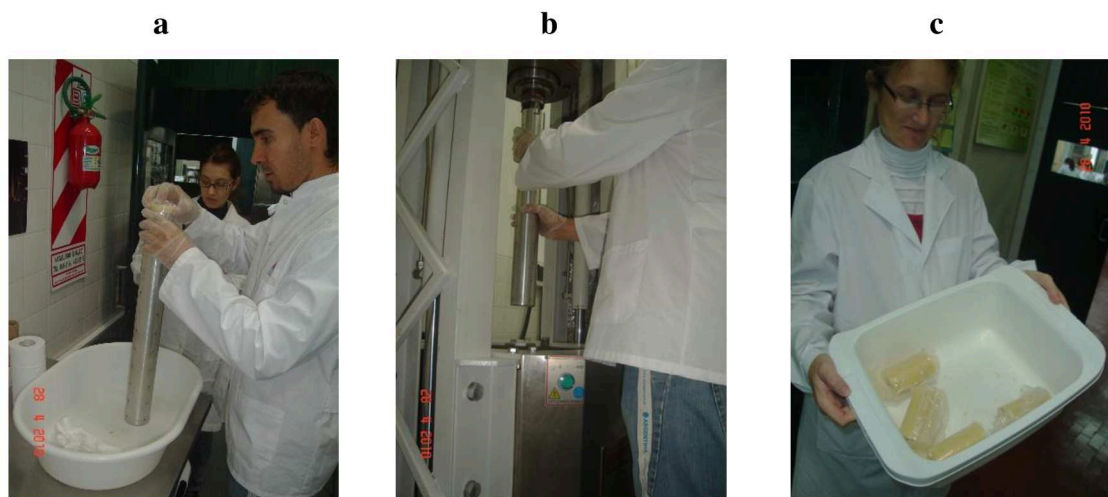


Figura 3.1. a- Introducción de los quesos envasados al vacío en el canasto del sistema APH. b- Carga del canasto en el cilindro de alta presión. c- Quesos luego del tratamiento con APH

2.4 Análisis de los quesos

Todas las determinaciones analíticas descritas a continuación se realizaron por duplicado los días 1, 45 y 90 post tratamiento con APH. Los 8 quesos disponibles por elaboración para cada tratamiento (incluyendo el control) se dividieron según se muestra en la Figura 3.2.

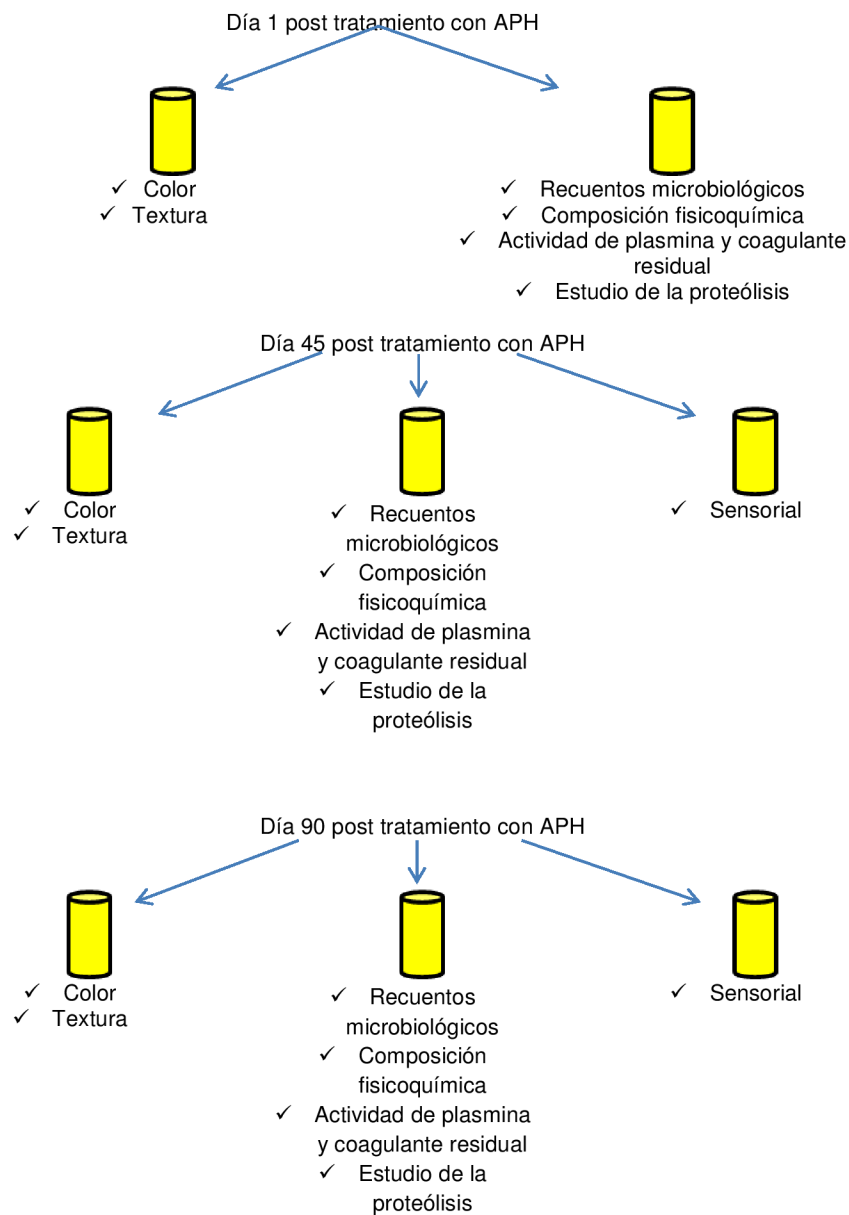


Figura 3.2. Distribución de los quesos por tiempo de maduración y análisis realizado

Para cada tiempo de análisis, el miniqueso destinado para los análisis descritos en el presente capítulo, en primer lugar se muestreó en condiciones asépticas para los análisis microbiológicos. Posteriormente, se procedió a triturarlo utilizando una minipimer. Las determinaciones de pH, composición fisicoquímica y los recuentos

microbiológicos se realizaron inmediatamente luego del muestreo, mientras que para las demás determinaciones las muestras trituradas se colocaron en colectores adecuados y se almacenaron a -18°C hasta el momento del análisis.

2.4.1 Composición química y pH

Las proteínas totales, grasa, materia seca y pH fueron analizados de acuerdo a los métodos de referencia descriptos en el capítulo 1.

2.4.2 Recuentos microbiológicos

Para el recuento de microorganismos en los quesos, la muestra tomada en condiciones de asepsia (10 g) fue emulsionada con 90 ml de citrato de sodio estéril (2% p/v) en un recipiente mezclador estéril. Se realizaron diluciones decimales en agua de peptona de caseína al 0,1% y alícuotas de 0,1 ml de las diluciones apropiadas fueron sembradas en superficie en diferentes medios.

Para el recuento de la flora láctica total se utilizó APC-leche, y se incubó a 37°C durante 48 h (Candioti y col., 2002).

Para el recuento de lactobacilos a 30 y 45°C la siembra se realizó en MRS, y las placas se incubaron en condiciones de micro anaerobiosis, a 30 y 45°C respectivamente durante 48 hs. La temperatura de incubación de 45°C fue seleccionada para promover el crecimiento de la flora del fermento primario, consistente en lactobacilos termófilos, fundamentalmente *Lactobacillus helveticus* (Reinheimer y col., 1996, Corsetti y col., 1998). Por otro lado, la temperatura de incubación de 30°C fue seleccionada para obtener los recuentos de los lactobacilos mesófilos (Bude Ugarte y col., 2006; Corsetti y col., 1998).

2.4.3 Actividad coagulante residual y de plasmina

La actividad de las enzimas coagulante residual y plasmina fue cuantificada de acuerdo a los métodos descriptos en el capítulo 2.

2.4.4 Seguimiento de la proteólisis:

El seguimiento de la proteólisis se realizó siguiendo la metodología detallada en el capítulo 2. Se determinaron:

Fracciones nitrogenadas (NS-pH 4,6 y NS-TCA)

Electroforesis

Péptidos solubles en agua por HPLC

Perfil de aminoácidos libres y aminoácidos libres totales

Los aminoácidos constituyen los productos finales del proceso de proteólisis, pero, a su vez, pueden sufrir transformaciones posteriores que dan origen a una gran variedad de compuestos determinantes del sabor y aroma. De esta manera, el contenido de aminoácidos libres en el queso es el resultado del balance entre su producción y su degradación por diversos sistemas enzimáticos (Sousa y col., 2001).

La determinación de la concentración individual de 18 aminoácidos y de la cantidad de aminoácidos libres totales se realizó en el Área de Investigación Bioquímica y Nutrición del Instituto Tecnología de Alimentos del CIA-INTA Castelar, en la cual se dispone de equipamiento adecuado para tal fin. Los aminoácidos libres totales e individuales fueron evaluados en el sobrenadante del NS- TCA. Se tomaron 10 ml del mismo y se ajustó el pH a 2,2 con el buffer de carga del equipo (loading buffer, citrato de sodio pH 2,2) e hidróxido de sodio (solución acuosa 3,5 N). Posteriormente, se realizó un filtrado de esta muestra utilizando una membrana de teflón de 0,2 µm (DISMIC®-13JP_ADVANTEC. Disposable Syringe Filter Unit. PTFE-Hydrophobic, Dublin, Estados Unidos). Luego del filtrado y antes del análisis cromatográfico en viales individuales para cada muestra, se colocó un volumen conocido de L-norleucina como estándar interno del análisis (relación muestra: L-norleucina: buffer de carga 1:1:8). Paralelamente, se preparó un blanco de reactivos (L-norleucina: buffer de carga 1:9) y una solución estándar de 18 aminoácidos (18 AA, Sigma-Aldrich®, Buenos Aires, Argentina), (estándar: L-norleucina: buffer de carga 1:1:8). El estándar contenía los siguientes aminoácidos: ácido aspártico (Asp), serina (Ser), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), cisteína (Cys), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), lisina (Lys), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp).

La concentración final de L-norleucina y de los aminoácidos en la solución estándar fue de 5 nmol/20µl, con excepción de la cisteína, que fue de 2,5 nmol/20µl, debido a que el estándar comercial no tiene Cisteína (Cys) sino que tiene Cistina que es un dímero de dos cisteínas unido por sus grupos funcionales tiol a través de un puente disulfuro.

El perfil de aminoácidos (AA) fue determinado mediante el uso de un analizador automático (Biochrom30 GE®-Healthcare Life Sciences, Buenos Aires), cuyo principio de separación se basa en la cromatografía de intercambio catiónico, y posterior reacción con ninhidrina. La identificación y cuantificación de los AA separados se llevó a cabo por comparación con el perfil generado por la solución de estándar de aminoácidos y la L-norleucina como estándar interno, como se mencionó previamente. Los aminoácidos de las muestras fueron separados a través del cromatógrafo equipado con columna PEEK de intercambio catiónico (Ultropac 8, BioEsanco, Buenos Aires, Argentina). Para la elución de la columna se utilizaron soluciones tamponadas de citrato, generando un gradiente de pH desde 2,2 a 4,25. Se trabajó a temperatura controlada, con una temperatura de horno de columna de 37°C. Una vez realizada la separación, los AA reaccionaron con ninhidrina y los productos de la derivatización se detectaron por espectrofotometría en el espectro visible (570nm). La temperatura del reactor post columna se mantuvo en 135°C. La cantidad de compuestos coloreados producidos es directamente proporcional a la cantidad de cada aminoácido presente en el eluyente. Se construyó una curva de calibrado utilizando el estándar 18AA-Sigma-Aldrich®. Para la cuantificación, las áreas de los picos, relativizadas con respecto al área del estándar interno, fueron correlacionadas con las concentraciones acorde a la curva de calibración. Los resultados fueron expresados en mg de aminoácido/ 100 gramos de queso seco.

2.5 Análisis estadístico

Los resultados de composición química, pH, recuentos microbiológicos, actividad coagulante residual y de plasmina, fracciones nitrogenadas y aminoácidos libres fueron analizados utilizando un diseño factorial para medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED, SAS Ver. 9.2, SAS Institute, Inc., Cary, Estados Unidos). El tiempo de maduración y los diferentes tratamientos aplicados, incluyendo el control, fueron seleccionados como factores principales para el análisis. En el caso en que la interacción resultó significativa ($P \leq 0.05$), se procedió a la "apertura" de la misma. Esto consiste en probar las hipótesis correspondientes a los efectos simples de uno de los factores para cada uno de los niveles del otro factor, considerando como término de error el correspondiente al modelo completo. Posteriormente, para cada efecto simple que resultó significativo se aplicó una prueba de comparaciones múltiples (Prueba de LSD) para detectar grupos de niveles homogéneos ($\alpha = 0,05$).

Los perfiles peptídicos fueron analizados a través de métodos multivariantes, incluyendo una metodología denominada lógica difusa (“fuzzy approach”) para la pre-reducción de los datos obtenidos por HPLC. La metodología “fuzzy” se diseñó para proveer una herramienta matemática para llevar cualquier teoría específica de la forma discreta a la forma continua (Piraino y col., 2004). El objetivo de este método es pre-procesar objetivamente los perfiles cromatográficos, para obtener un nuevo set de datos más reducido, evitando la selección visual y subjetiva de los picos del cromatograma. Los datos de entrada (input) en este pre-procesamiento fueron las áreas de los picos y los tiempos de retención. Los datos de salida (output) fueron clases de tiempo de retención, dentro de las cuales las áreas de los picos se acumulaban, afectándose por un coeficiente proporcional a la distancia al centro de la clase (Piraino y col., 2004).

El nuevo set de datos fue entonces analizado por análisis de componentes principales (PCA), usando la aplicación SPSS ® (SPSS Inc., Chicago, IL) (Pripp y col., 2000 a,b).

Los componentes principales también consisten en una reducción de dimensionalidad, pero en este caso se trata de la obtención de nuevas variables, ortogonales entre sí, representadas por ecuaciones lineales del tipo:

$$PC1= a_1x_1+b_1x_2+\dots+k_1x_i$$

$$PC2= a_2x_1+b_2x_2+\dots+k_2x_i$$

.....

$$PCn= a_nx_1+b_nx_2+\dots+k_nx_i$$

En nuestro caso, los valores de x fueron las áreas de las clases de tiempo de retención de cada cromatograma pre-reducido, mientras que los valores a, b, \dots, k , multiplicados por $\lambda^{1/2}$ definen los factores de peso (“loadings”), valores que caracterizan la influencia de cada variable en un dado PC. El valor λ se denomina autovalor (“eigenvalue”) y está relacionado a la varianza explicada por cada PC. La suma algebraica de cada componente principal para una muestra, es llamada el score o puntaje de la muestra para ese componente principal (PC1, PC2, ...PCn). (Massart y col., 1988).

Teóricamente, es posible hallar un número de PCs igual al número de variables. Sin embargo, si el análisis es exitoso, se logra explicar la mayoría de la varianza considerando sólo unos pocos PCs obtenidos en primer término. Existen varios criterios

para determinar el número de dichos PCs. En nuestro caso, se retuvieron para el estudio aquellos PCs con autovalor \geq autovalor promedio (Massart y col., 1988).

3. Resultados

3.1 Composición química y pH de los quesos

En la Tabla 3.2 se presentan la composición química y el pH de los quesos correspondientes a los diferentes tratamientos y tiempos de maduración (tiempos 1, 45 y 90 días post tratamiento APH).

Tabla 3.2. Composición química y pH de los quesos (media \pm desviación estándar) y significancia de los factores principales y de sus interacciones.

Variables	Significancia			Tratamientos (F1)				Tiempo de maduración (F2)			
	F1	F2	F1xF2	C	T1	T2	T3	T4	1	45	90
pH	NS	*	NS	5,22 \pm 0,08	5,25 \pm 0,07	5,26 \pm 0,07	5,27 \pm 0,06	5,28 \pm 0,05	5,21 \pm 0,05 ^b	5,28 \pm 0,08 ^a	5,29 \pm 0,04 ^a
Grasa en BS (%)	NS	NS	NS	43,00 \pm 2,94	43,20 \pm 2,15	43,31 \pm 2,85	43,74 \pm 2,52	43,5 \pm 2,44	43,58 \pm 2,78	43,92 \pm 2,02	42,55 \pm 2,6
Humedad (%)	NS	*	NS	35,17 \pm 2,04	35,21 \pm 2,26	35,41 \pm 2,33	35,66 \pm 1,98	35,64 \pm 2,13	38,22 \pm 0,54 ^a	34,31 \pm 0,47 ^b	33,71 \pm 0,60 ^c
Proteínas en BS (%)	NS	NS	NS	50,51 \pm 1,57	50,35 \pm 1,91	50,87 \pm 2,16	50,91 \pm 1,66	50,5 \pm 1,69	51,17 \pm 1,66	50,92 \pm 1,46	49,8 \pm 1,91

*Indica efecto significativo ($P \leq 0,05$). NS: indica diferencia no significativa.

^{a,b,c} Los promedios dentro de la misma fila con letras diferentes resultaron estadísticamente diferentes

BS: base seca

Puede observarse que la aplicación de APH no provocó diferencias en la composición de los quesos en relación al tratamiento control ni entre los tratamientos APH entre sí. El tiempo de maduración tampoco influyó significativamente en el contenido de grasa y proteínas en base seca, pero sí tuvo un efecto en la humedad y el pH. A medida que el tiempo de maduración aumentó, los valores de humedad disminuyeron como consecuencia de la evaporación durante el almacenamiento en cámara de maduración, principalmente durante los primeros días y previamente al envasado al vacío. El pH de los quesos de 45 y 90 días de maduración fue significativamente mayor que el correspondiente a los quesos de 1 día de maduración.

3.2 Recuentos microbiológicos

En la Figura 3.3 se observa la evolución de los lactobacilos termófilos para los quesos sometidos a diferentes tratamientos, en función del tiempo de maduración.

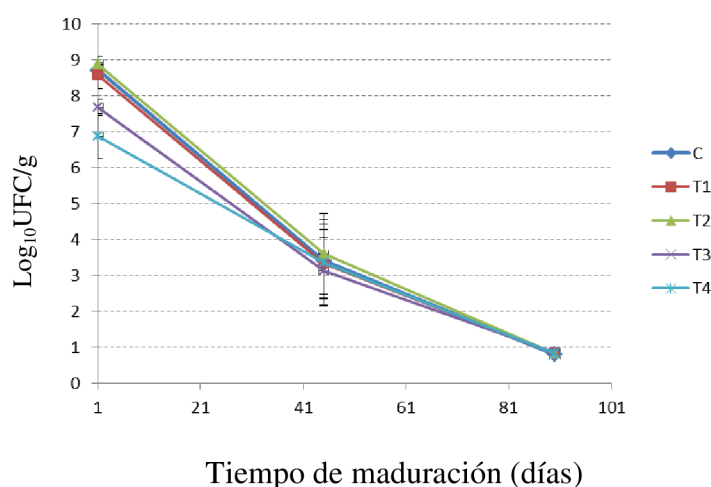


Figura 3.3. Evolución de los lactobacilos enumerados en MRS a 45°C expresados en Log₁₀UFC/g en función del tiempo de maduración. La primera determinación se realizó a día 1 post tratamiento con APH.

La evolución de los lactobacilos termófilos en los quesos tratados con distintas condiciones de APH evidenció interacción entre el tratamiento con APH aplicado y el tiempo de maduración. Abriendo la interacción, se puede observar que las diferencias entre tratamientos fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) solamente a tiempo 1, presentando los tratamientos T3 y T4 valores inferiores al control y a T1 y T2. Los

recuentos expresados en \log_{10} UFC/g fueron $8,72 \pm 0,14$, $8,59 \pm 0,36$, $8,89 \pm 0,21$, $7,70 \pm 0,23$ y $6,89 \pm 0,62$ para C, T1, T2, T3 y T4 respectivamente. A los 45 y 90 días de maduración, no existió diferencia significativa entre los tratamientos con APH aplicados a los quesos. Los valores promedio fueron $3,36 \pm 0,95$ y $0,83 \pm 0,02$ para los quesos de 45 y 90 días de maduración respectivamente. Tanto para el queso control como para los quesos tratados con APH, los recuentos disminuyeron a medida que avanzaba el tiempo de maduración de los quesos (Figura 3.3).

En la Figura 3.4 se presenta la evolución de los lactobacilos mesófilos enumerados a 30 °C. De la enumeración de colonias luego de la incubación en MRS a 30 °C, se detectó que existía una interacción estadísticamente significativa entre los tratamientos con APH aplicados y el tiempo de maduración. Abriendo la interacción, se observó que en cada tiempo de maduración evaluado, el comportamiento fue diferente y existía efecto del tratamiento. A tiempo 1, los valores hallados expresados en $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$ fueron $8,04 \pm 0,46$, $8,13 \pm 0,24$, $8,36 \pm 0,48$, $7,82 \pm 0,65$ y $7,65 \pm 0,24$ para C, T1, T2, T3 y T4 respectivamente. A ese tiempo de maduración, T3 y T4 presentaron valores significativamente inferiores al C, mientras que los valores de los tratamientos T1 y T2 no se diferenciaron significativamente del control. El comportamiento se revirtió a los 45 y 90 días de maduración, encontrándose recuentos levemente más elevados en los tratamientos T3 y T4 (Figura 3.4). A los 45 días, los recuentos fueron $6,79 \pm 0,23$, $6,78 \pm 0,29$, $6,66 \pm 0,34$, $7,19 \pm 0,32$ y $7,30 \pm 0,23$ para C, T1, T2, T3 y T4 respectivamente, y a los 90 días los recuentos estuvieron en los siguientes valores: $6,29 \pm 0,47$, $6,69 \pm 0,21$, $6,72 \pm 0,19$, $7,01 \pm 0,21$ y $6,91 \pm 0,06$ para C, T1, T2, T3 y T4 respectivamente. Para todos los tratamientos, se observó que a medida que transcurría el tiempo de maduración, los recuentos disminuían (Figura 3.4).

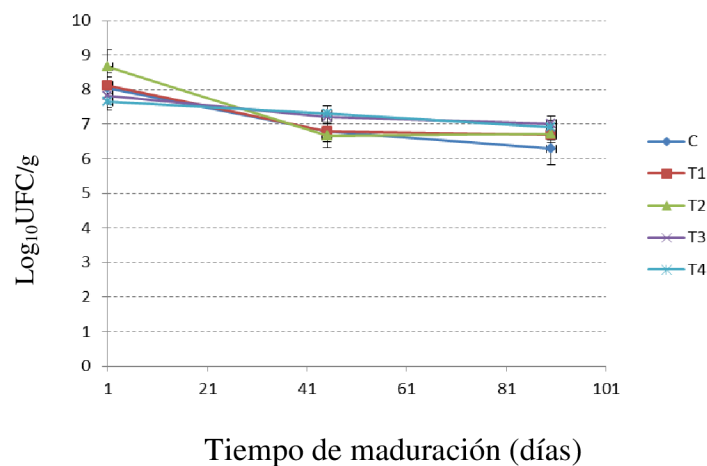


Figura 3.4. Evolución de los lactobacilos enumerados en MRS a 30°C, expresados en Log₁₀UFC/g en función del tiempo de maduración. La primera determinación se realizó a día 1 post tratamiento con APH.

Es muy probable que las bacterias lácticas del fermento - *L. helveticus* - cuya temperatura óptima de desarrollo es de 45°C también hayan sido capaces de crecer a 30°C, ya que la temperatura de incubación no es un factor que por sí sólo pueda seleccionar a un grupo de microorganismos, especialmente para un mismo medio de cultivo. Al final de la maduración, a medida que los microorganismos del fermento disminuyen, es de esperar que las NSLAB sean preponderantes en este recuento. Haciendo la diferencia entre los recuentos encontrados en MRS a 30°C y a 45°C, entonces, es factible estimar el desarrollo de las NSLAB a lo largo de la maduración (Figura 3.5).

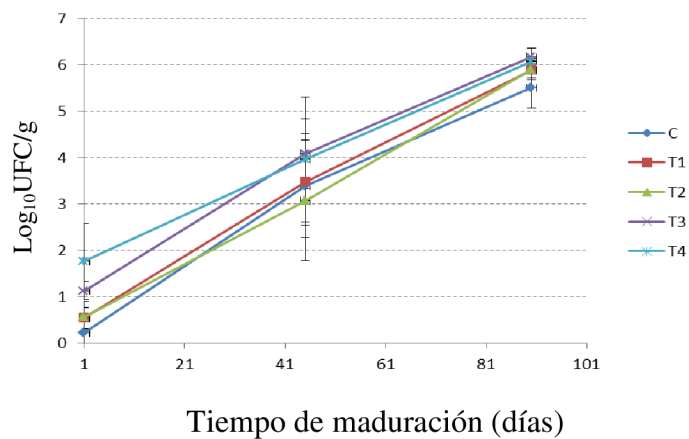


Figura 3.5. Diferencia entre el recuento en MRS a 30°C – el recuento en MRS a 45°C expresados en Log₁₀UFC/g en función del tiempo de maduración. La primera determinación se realizó a día 1 post tratamiento con APH.

El tratamiento con APH no influyó significativamente ($p > 0,05$) sobre el recuento de bacterias lácticas totales, enumeradas en APC leche a 37°C. Por el contrario, el tiempo de maduración fue una variable de influencia. Los recuentos resultaron significativamente mayores a día 1, en el cual se encontraron valores máximos del orden de 10^9 UFC/g, comparado con 45 y 90 días de maduración, donde los recuentos disminuyeron a valores entre 10^5 a 10^6 UFC/g (Figura 3.6).

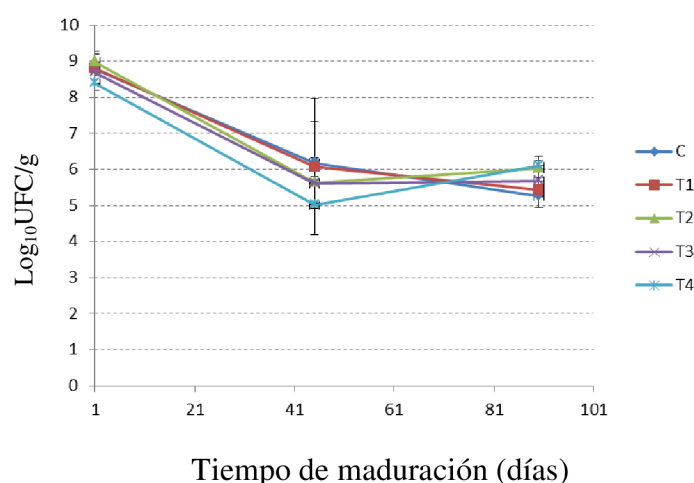


Figura 3.6. Evolución de la flora láctica total (APC leche a 37°C) expresados en Log₁₀UFC/g en función del tiempo de maduración. La primera determinación se realizó a día 1 post tratamiento con APH.

3.3 Actividad de plasmina

El tiempo de maduración de los quesos no influyó significativamente ($p>0,05$) en la actividad de plasmina en ninguno de los tratamientos estudiados, ya que independientemente de este, dicha actividad se mantuvo constante durante los 90 días de maduración (Tabla 3.3). Con respecto al efecto de los tratamientos, los quesos del tratamiento T4 mostraron una actividad de plasmina significativamente mayor que la de los quesos correspondientes a los otros tratamientos. A su vez, los quesos del tratamiento T3 presentaron una actividad de plasmina significativamente mayor que los quesos C y T1 (Tabla 3.3).

En cambio, la actividad de plasminógeno fue afectada por el tiempo de maduración, ya que los quesos de 1 día de maduración tuvieron una actividad de plasminógeno significativamente mayor que los quesos madurados durante 45 y 90 días. Ninguno de los tratamientos con APH aplicado afectó a la actividad de plasminógeno (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Actividad de plasmina, plasminógeno y coagulante residual de los quesos (media \pm desviación estándar) y significancia de los factores principales y de sus interacciones.

Variables	Significancia			Tratamientos (F1)				Tiempo de maduración (F2)			
	F1	F2	F1xF2	C	T1	T2	T3	T4	1	45	90
Actividad de Plasmina (nmoles AMC min ⁻¹ g ⁻¹)	*	NS	NS	4,57 \pm 2,12 ^c	6,28 \pm 1,7 ^c	6,63 \pm 2,09 ^{bc}	9,39 2,42 ^b	12,28 \pm 2,51 ^a	9,13 \pm 3,57	6,74 \pm 2,86	7,62 \pm 3,68
Actividad de Plasminogeno (nmoles AMC min ⁻¹ g ⁻¹)	NS	*	NS	5,11 \pm 3,36	5,55 \pm 2,74	6,03 \pm 2,72	6,68 \pm 1,47	6,27 \pm 2,78	8,62 \pm 2,07 ^a	5,26 \pm 1,46 ^b	3,90 \pm 1,25 ^b
Actividad coagulante residual (nmol producto h ⁻¹ g ⁻¹)	NS	*	NS	184,81 \pm 27,93	198,22 \pm 34,21	200,46 \pm 47,30	209,59 \pm 51,75	225,85 \pm 67,02	165,90 \pm 17,70 ^c	243,19 \pm 44,87 ^a	202,27 \pm 38,72 ^b

*Indica efecto significativo ($P \leq 0.05$). NS: indica diferencia no significativa.

^{a,b,c} Los promedios dentro de la misma fila con letras diferentes resultaron estadísticamente diferentes

3.4 Actividad coagulante residual

La actividad de coagulante residual no resultó afectada de manera significativa ($p>0,05$) por el tratamiento con APH. Sin embargo, a los 45 días de maduración, se observó una tendencia hacia una actividad de coagulante incrementada en los quesos de los tratamientos T2, T3 y T4 comparada con los quesos C y T1 (Figura 3.7). Por otra parte, el tiempo de maduración influyó significativamente en la actividad coagulante residual. Al inicio de la maduración, la actividad coagulante fue significativamente menor que a los 45 y 90 días de maduración (Tabla 3.3).

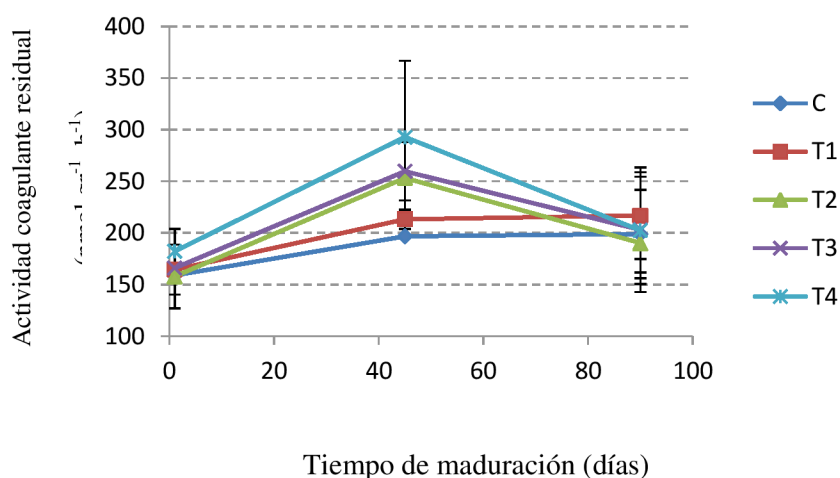


Figura 3.7. Evolución de la actividad coagulante residual en función del tiempo de maduración

3.5 Seguimiento de la Proteólisis

Nitrógeno soluble.

El contenido de nitrógeno en las diferentes fracciones solubles se incrementó significativamente a lo largo de la maduración (Tabla 3.4). El tratamiento con APH aplicado también influyó sobre las fracciones NS. Con respecto al NS-pH4.6, solamente el tratamiento T1 no se diferenció del C. Para el resto de los tratamientos, se observó una tendencia de que a medida que aumentaba la presión hidrostática aplicada y el tiempo de presurización, los valores de NS se incrementaron. El tratamiento T4 resultó significativamente diferente a los tratamientos C, T1 y T2. En cuanto al NS-TCA, se encontró una diferencia significativa entre el control y todos los quesos tratados con APH. A su vez, los valores fueron significativamente menores en los quesos tratados a 100 MPa con respecto a los quesos tratados a 400 MPa, con independencia del tiempo de tratamiento.

Tabla 3.4. Nitrógeno soluble (NS-pH 4,6 y NS-TCA) de los quesos (media \pm desviación estándar) y significancia de los factores principales y de sus interacciones.

Variables	Significancia			Tratamientos (F1)				Tiempo de maduración (F2)			
	F1	F2	F1xF2	C	T1	T2	T3	T4	1	45	90
NS- pH4,6/NT (%)	*	*	NS	8,7 \pm 3,94 ^c	8,93 \pm 3,73 ^c	9,09 \pm 4,03 ^{bc}	9,68 \pm 3,97 ^{ab}	10,34 \pm 4,6 ^a	4,51 \pm 0,51 ^c	9,71 \pm 1,27 ^b	13,82 \pm 1,12 ^a
NS- TCA/NT (%)	*	*	NS	6,29 \pm 3,72 ^c	7,61 \pm 4,13 ^b	7,16 \pm 3,78 ^b	8,98 \pm 4,08 ^a	9,10 \pm 4,47 ^a	3,38 \pm 1,56 ^c	7,72 \pm 1,59 ^b	12,38 \pm 1,96 ^a

*Indica efecto significativo ($P \leq 0,05$). NS: indica diferencia no significativa.

^{a,b,c} Los promedios dentro de la misma fila con letras diferentes resultaron estadísticamente diferentes

En la gráfica de las fracciones NS en función del tiempo (Figura 3.8) se observó que las muestras tratadas a 400 MPa alcanzaron iguales niveles que los controles en menor tiempo. Las muestras controles alcanzaron a los 90 días de maduración un valor máximo de $13,08 \pm 0,87$ para NS-pH4,6 y $10,53 \pm 0,65$ para NS-TCA. Ese mismo valor de NS-pH 4,6 fue alcanzado en las muestras T4 en aproximadamente 65 días de maduración. En cuanto al NS-TCA, el mismo valor hallado por los controles a los 90 días de maduración fue logrado a los 60 días de maduración tanto en las muestras T3 como en las T4.

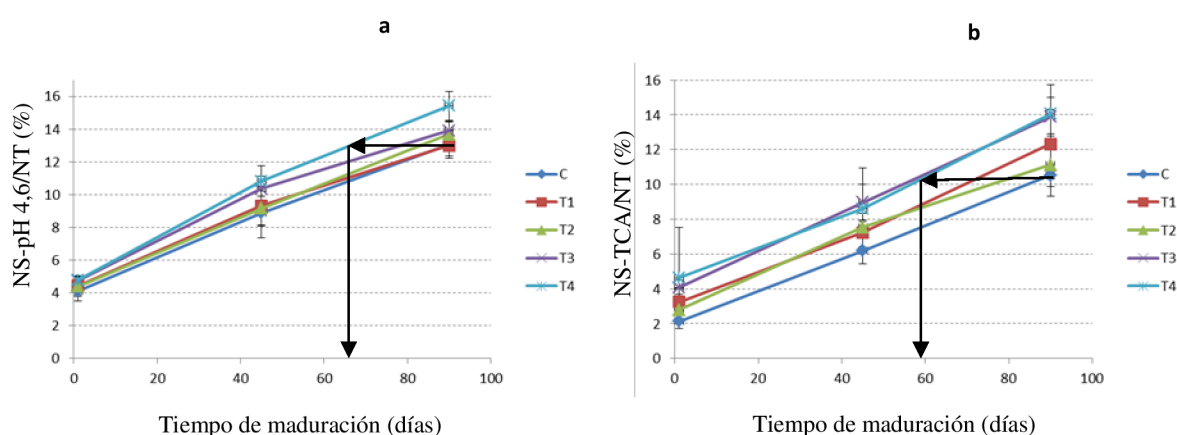


Figura 3.8. Evolución del NS-pH 4,6 (a) y del NS-TCA (b) expresados en relación al NT en función del tiempo de maduración. Las flechas señalan el tiempo al cual las muestras tratadas con APH alcanzaron los mismos valores de ambas fracciones solubles que los quesos controles.

Electroforesis

En la Figura 3.9 se muestra una fotografía de los perfiles electroforéticos de los quesos controles y tratados con APH, correspondientes a las elaboraciones 1 y 2. Los perfiles electroforéticos de las elaboraciones 3 y 4 fueron similares y no se presentan. Al inicio de la maduración (día 1) todos los perfiles electroforéticos fueron similares.

A los 45 días de maduración, se detectó una mayor intensidad en la fracción α_{s1} -I en las muestras tratadas a 400 MPa comparadas con los controles y las muestras tratadas a 100 MPa. Esto se correlaciona con lo observado para las fracciones NS. A los 90 días de maduración, la intensidad de la fracción α_{s1} -I fue similar para todas las muestras.

Con respecto a los productos de degradación de las caseínas β , también a los 45 días de maduración se observó una mayor intensidad de las fracciones de caseínas γ en los quesos tratados a 400 MPa.

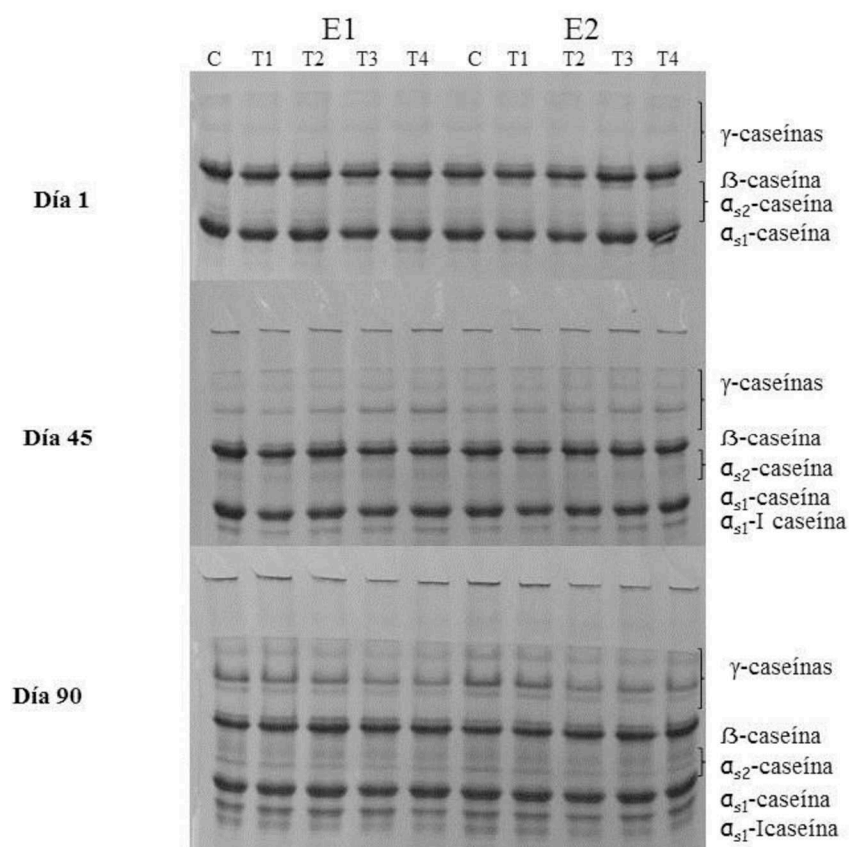


Figura 3.9. Perfiles electroforéticos de los quesos a 1, 45 y 90 días de maduración de las elaboraciones 1 (E1) y 2 (E2)

Péptidos solubles en agua por HPLC

En la figura 3.10 se presentan los perfiles peptídicos de los quesos a 1, 45 y 90 días de maduración de la elaboración 1 (E1). Los perfiles peptídicos del resto de las elaboraciones fueron similares y no se presentan. Analizando visualmente los cromatogramas, fue posible observar que los perfiles peptídicos de todos los quesos mostraron algunos cambios durante la maduración, siendo el cambio más evidente el incremento de los picos iniciales, que corresponden a aminoácidos libres y péptidos hidrofílicos. Estos cambios son el resultado de la evolución natural de la proteólisis durante la maduración de quesos. Por otro lado, algunas variaciones fueron detectadas por comparación visual entre los perfiles peptídicos de todos los quesos con diferente tratamiento, sobre todo al final de la maduración (Figura 3.10).

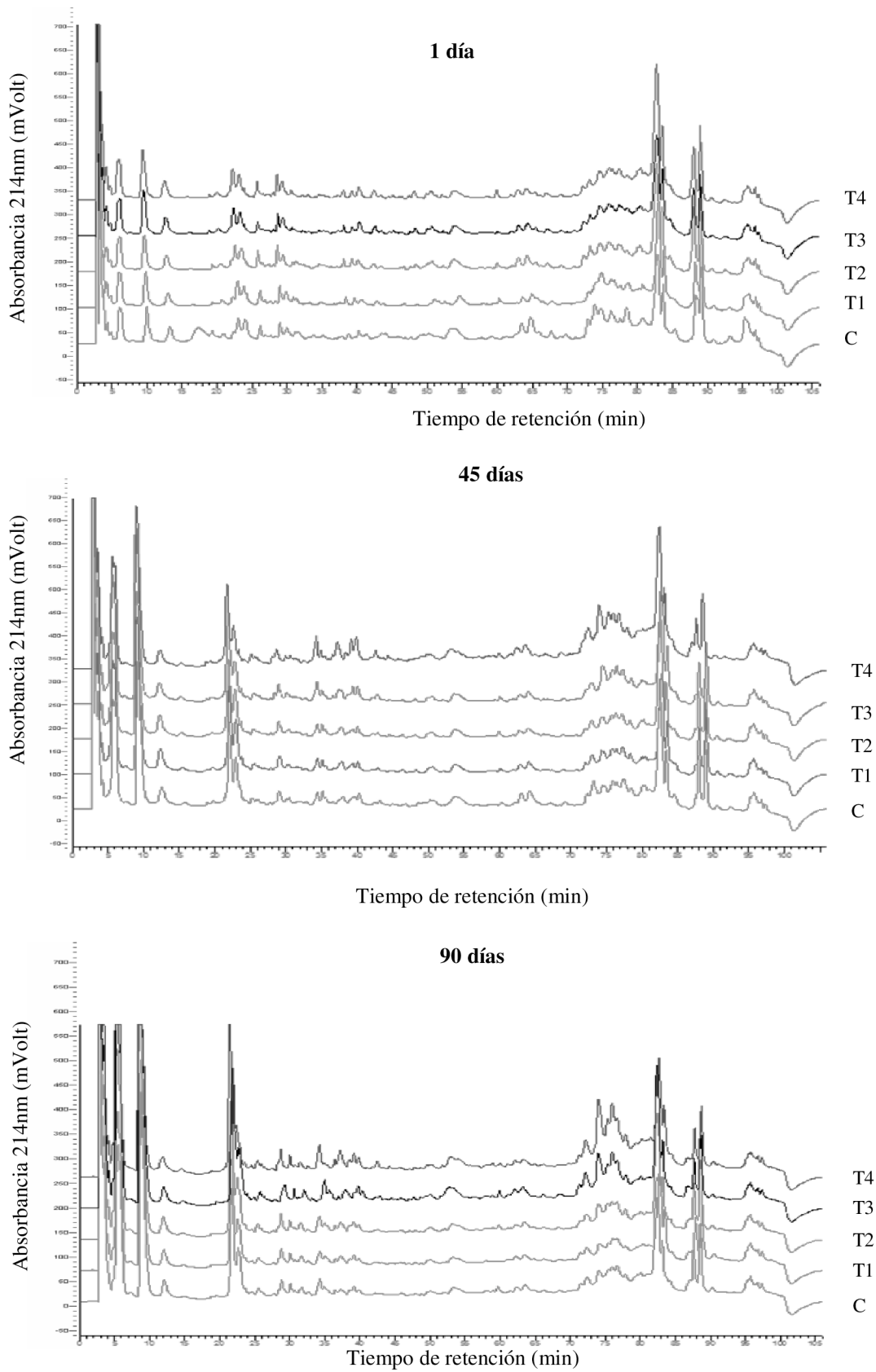


Figura 3.10. Perfiles peptídicos de los quesos a 1, 45 y 90 días de maduración de la elaboración 1 (E1)

Los datos de los perfiles peptídicos fueron clasificados en 19 clases de tiempo de retención mediante la aplicación de la pre-reducción de variables con la metodología fuzzy propuesta por Piraino y col. (2004). Las áreas de las clases de tiempo de retención, numeradas correlativamente de c1 a c19, fueron consideradas como variables de entrada para el análisis de componentes principales (CP), con estandarización a una media de cero y sus variancias originales (matriz de covariancia). Dos CP con un autovalor mayor que el autovalor promedio fueron extraídos, los cuales explicaron el 96,2% de la variancia total. Los gráficos de scores y loading para CP1 vs. CP2 se presentan en las Figuras 3.11 y 3.12.

En el gráfico de scores, los quesos se separaron a lo largo del CP1 en función del tiempo de maduración, correspondiendo mayores valores de score a las muestras con mayor maduración. De esta manera, la principal fuente de variación entre las muestras analizadas fue el tiempo de maduración, variancia que fue explicada por el primer CP (90,7%). Por otro lado, si bien las muestras de quesos controles y tratados presentaron valores similares de scores sobre el CP1 al inicio de la maduración, se puede observar una cierta separación entre dichas muestras a los 45 y 90 días. En efecto, las muestras con el tratamiento más intenso: T3 y T4, presentaron mayores valores de scores sobre el CP1 en relación al resto de muestras del mismo tiempo de maduración. Estos resultados indican una aceleración de la maduración en los quesos debido al tratamiento aplicado de 400 MPa. Las variables con una influencia positiva en este eje, y por lo tanto que están más relacionadas al tiempo de maduración fueron: c1, c2, c3, c5 y c8, que corresponden a clases iniciales, con tiempo de retención menor de 40 min (aminoácidos libres y péptidos hidrofílicos), y también c18, cuyo tiempo de retención es 74,85 min. Por otro lado, también se observó una diferenciación de las muestras con los tratamientos más intensos sobre el CP2, que explica un menor porcentaje de variancia (5,5%). En general, las muestras T3 y T4, tanto a 45 como a 90 días de maduración, mostraron mayores valores de scores sobre este eje que el resto de las muestras del mismo tiempo de maduración. Las variables que mostraron mayor peso sobre este eje y por lo tanto se incrementaron en las muestras con mayor tratamiento fueron las c18, c19, c13 y c9, que corresponden en general a péptidos que eluyeron en la mitad y en el final del cromatograma (péptidos hidrofóbicos). Estos resultados revelan que el tratamiento aplicado, más allá de su efecto en la aceleración de la maduración incrementando el nivel de péptidos que aumentan normalmente durante la proteólisis en

los quesos estudiados, produjo una diferenciación en dicho proceso debido al incremento de algunos otros péptidos característicos.

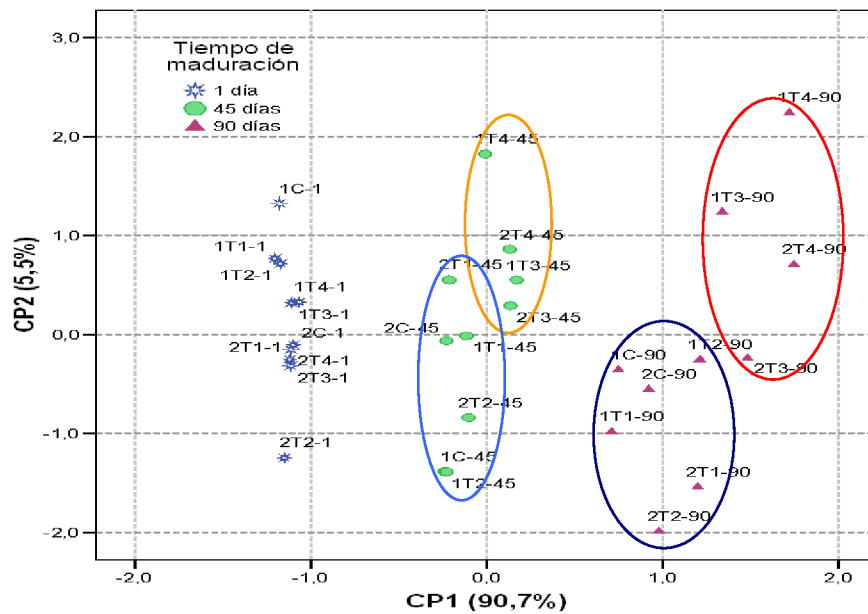


Figura 3.11. Análisis de componentes principales de los perfiles peptídicos. Gráfico de scores de las muestras para CP1 vs. CP2. Los óvalos naranja y rojo engloban las muestras de quesos tratados a 400 MPa (T3 y T4), de 45 y 90 días respectivamente. Los óvalos celeste y azul engloban las muestras de quesos controles y tratados a 100 MPa (C, T1 y T2), de 45 y 90 días respectivamente.

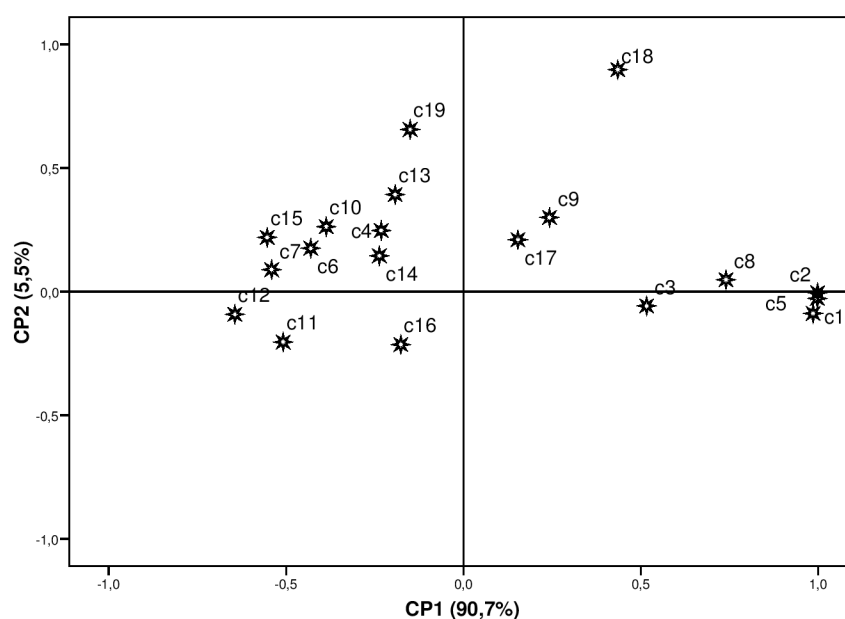


Figura 3.12. Análisis de componentes principales de los perfiles peptídicos. Gráfico de loading de las variables para CP1 vs. CP2. Las clases de tiempo de retención (c) fueron numeradas en orden correlativo y tuvieron los siguientes tiempos de retención: c1: 4,30 min, c2: 8,45 min, c3: 12,60 min, c4: 16,75 min, c5: 20,90 min, c6: 25,05 min, c7: 29,20 min, c8: 33,35 min, c9: 37,50 min, c10: 41,65 min, c11: 45,80 min, c12: 49,95 min, c13: 54,10 min, c14: 58,25 min, c15: 62,4 min, c16: 66,55 min, c17: 70,70 min, c18: 74,85 min, c19: 79,00 min

Perfil de aminoácidos libres y aminoácidos libres totales.

En la Tabla 3.5 se presentan los resultados de aminoácidos libres totales e individuales de todas las experiencias. A medida que avanzaba la maduración, los aminoácidos libres totales aumentaron. Analizando los aminoácidos individuales, se observó que los niveles se incrementaron para todos los aminoácidos, obteniéndose valores superiores a los 90 días de maduración para todos ellos, a excepción de Ala, His y Trp, que aumentaron a los 45 días y luego se mantuvieron constantes hasta los 90 días de maduración. La evolución de los aminoácidos individuales en función del tiempo de maduración se pueden observar en la Figura 3.13. En cuanto al efecto del tratamiento con APH, no se hallaron diferencias significativas en los niveles de aminoácidos libres totales e individuales, a excepción de Asp. Para éste aminoácido, se observó que los tratamientos T3 y T4 tuvieron valores significativamente mayores que el control.

Tabla 3.5. Concentraciones individuales de aminoácidos (AA) libres y aminoácidos libres totales (expresados como suma) en los quesos Reggianito (valor medio \pm desviación estándar) y significancia de los factores principales y de sus interacciones.

AA (mg/100 g queso)	Significancia			Tratamientos					Días de maduración		
	F1	F2	F1xF2	C	T1	T2	T3	T4	1	45	90
Asp	*	*	NS	81,7 \pm 86,8 ^c	100,7 \pm 95,5 ^{abc}	96,0 \pm 94,9 ^{bc}	123,7 \pm 109,6 ^{ab}	126,4 \pm 109,4 ^a	6,7 \pm 4,2 ^c	88,2 \pm 37,3 ^b	222,1 \pm 29,0 ^a
Thr	NS	*	NS	29,9 \pm 27,5	39,9 \pm 30,7	38,7 \pm 30,7	47,5 \pm 38,4	47,4 \pm 34,8	4,7 \pm 2,5 ^c	45,5 \pm 21,2 ^b	71,9 \pm 9,7 ^a
Ser	NS	*	NS	78,6 \pm 67,6	107,2 \pm 81,8	99,5 \pm 79,2	126,0 \pm 102,2	120,2 \pm 88,5	10,1 \pm 7,1 ^c	124,6 \pm 52,5 ^b	184,2 \pm 24,6 ^a
Glu	NS	*	NS	233,0 \pm 181,7	296,9 \pm 214,9	292,9 \pm 214,6	316,3 \pm 219,6	333,7 \pm 194,8	61,3 \pm 32,6 ^c	335,3 \pm 124,1 ^b	487,6 \pm 32,9 ^a
Gly	NS	*	NS	33,4 \pm 30,2	43,6 \pm 33,8	40,5 \pm 32,7	49,7 \pm 40,4	49,4 \pm 36,4	3,7 \pm 2,2 ^c	50,9 \pm 21,3 ^b	75,4 \pm 10,0 ^a
Ala	NS	*	NS	74,4 \pm 51,1	96,2 \pm 62,7	89,7 \pm 57,2	91,3 \pm 64,2	90,7 \pm 49,7	22,8 \pm 10,2 ^b	113,4 \pm 40,7 ^a	129,2 \pm 13,9 ^a
Cys	NS	*	NS	2,5 \pm 2,4	3,0 \pm 2,7	3,0 \pm 2,8	3,1 \pm 2,7	3,1 \pm 2,7	0,02 \pm 0,01 ^c	3,0 \pm 1,1 ^b	5,8 \pm 0,4 ^a
Val	NS	*	NS	113,5 \pm 93,8	145,8 \pm 107,0	140,9 \pm 105,2	163,7 \pm 123,2	169,3 \pm 110,2	25,0 \pm 13,0 ^c	167,0 \pm 68,0 ^b	247,9 \pm 28,0 ^a
Met	NS	*	NS	40,9 \pm 34,6	54,4 \pm 39,9	50,7 \pm 37,9	63,9 \pm 50,8	64,7 \pm 44,8	7,9 \pm 4,1 ^c	65,2 \pm 28,8 ^b	91,7 \pm 15,2 ^a
Ile	NS	*	NS	81,6 \pm 74,4	107,2 \pm 85,3	101,7 \pm 83,8	124,5 \pm 101,2	125,5 \pm 92,8	10,5 \pm 6,2 ^c	118,4 \pm 50,6 ^b	195,4 \pm 23,8 ^a
Leu	NS	*	NS	131,1 \pm 105,7	172,3 \pm 126,0	167,5 \pm 124,1	191,5 \pm 141,5	198,9 \pm 125,7	29,1 \pm 16,6 ^c	202,6 \pm 79,1 ^b	285,1 \pm 29,4 ^a
Tyr	NS	*	NS	45,7 \pm 39,1	61,9 \pm 46,5	57,3 \pm 44,2	70,9 \pm 56,8	70,6 \pm 49,7	8,3 \pm 4,0 ^c	69,9 \pm 30,4 ^b	105,6 \pm 16,3 ^a
Phe	NS	*	NS	75,1 \pm 64,8	100,2 \pm 76,3	94,4 \pm 73,7	119,5 \pm 96,4	121,2 \pm 86,5	12,0 \pm 6,9 ^c	118,5 \pm 52,4 ^b	175,7 \pm 27,4 ^a
His	NS	*	NS	73,2 \pm 59,9	97,4 \pm 70,2	92,2 \pm 67,1	109,2 \pm 87,6	110,7 \pm 75,2	15,0 \pm 8,0 ^b	119,7 \pm 52,1 ^a	154,9 \pm 26,3 ^a
Trp	NS	*	NS	2,8 \pm 2,1	3,7 \pm 2,4	2,8 \pm 2,0	3,8 \pm 2,3	4,7 \pm 2,3	2,2 \pm 1,3 ^b	3,0 \pm 2,3 ^a	5,6 \pm 1,2 ^a
Lys	NS	*	NS	173,4 \pm 131,7	224,8 \pm 157,1	217,5 \pm 153,0	244,8 \pm 173,7	257,7 \pm 153,3	47,4 \pm 24,1 ^c	261,3 \pm 99,0 ^b	362,2 \pm 33,7 ^a
Arg	NS	*	NS	93,4 \pm 68,0	126,7 \pm 86,0	117,9 \pm 79,9	142,0 \pm 105,0	146,8 \pm 86,8	27,4 \pm 14,4 ^c	152,4 \pm 61,6 ^b	196,3 \pm 25,9 ^a
Pro	NS	*	NS	122,5 \pm 96,0	161,0 \pm 115,6	156,7 \pm 115,2	178,3 \pm 127,7	185,1 \pm 109,4	32,1 \pm 20,6 ^c	185,3 \pm 71,6 ^b	264,8 \pm 24,4 ^a
Total	NS	*	NS	1512,2 \pm 1225,6	1971,2 \pm 1434,4	1891,1 \pm 1400,1	2210,8 \pm 1662,2	2268,6 \pm 1462,4	334,4 \pm 178,5 ^c	2268,3 \pm 900,6 ^b	3309,6 \pm 351,5 ^a

*Indica efecto significativo ($P \leq 0.05$). NS: indica diferencia no significativa.

^{a,b,c} Los valores promedio dentro de la misma fila con letras diferentes resultaron estadísticamente diferentes

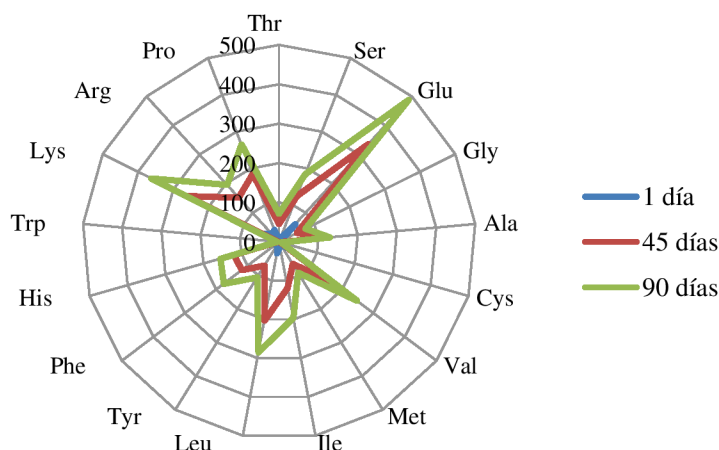


Figura 3.13. Evolución del perfil de aminoácidos libres individuales con el tiempo de maduración. Se excluye de la Figura al ácido aspártico (Asp), debido a que presentó diferencias entre tratamientos. Los valores se expresan en mg/100 g de queso.

Graficando los aminoácidos libres totales en función del tiempo de maduración (Figura 3.14) se observa que, al igual que lo obtenido para las fracciones NS, para las muestras de los tratamientos T3 y T4 en aproximadamente 60 días de maduración se obtuvieron niveles de aminoácidos libres totales similares a los exhibidos por las muestras controles a los 90 días de maduración.

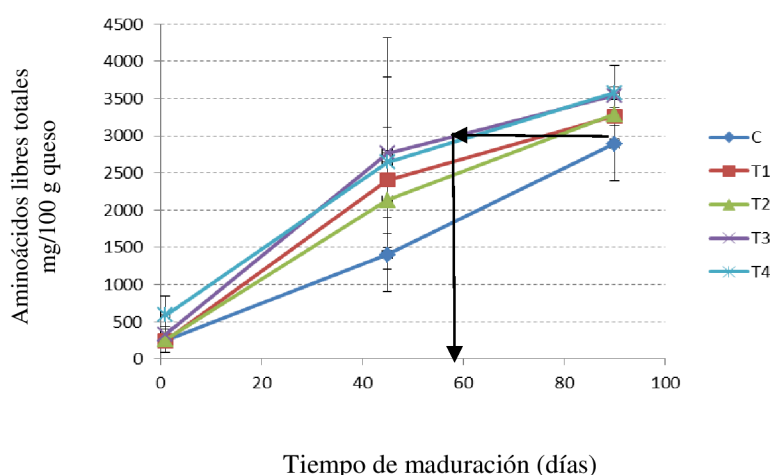


Figura 3.14. Evolución de los aminoácidos libres totales en función del tiempo de maduración. Las flechas señalan el tiempo al cual las muestras tratadas con APH alcanzaron los mismos valores de aminoácidos libres totales que los quesos controles.

4- Discusión

En este capítulo, se evaluó el impacto de la aplicación del tratamiento con APH y el tiempo de maduración sobre la composición, los recuentos microbiológicos, la actividad de enzimas proteolíticas que intervienen en la maduración y la proteólisis primaria y secundaria de queso Reggianito.

La composición química de los quesos a lo largo de la maduración, no resultó significativamente afectada por el tratamiento con APH. En quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min, y en quesos semiduros madurados en salmuera tratados a 50, 100 200 y 400 MPa por 5 y 15 min se observaron resultados similares (Rynne y col., 2008; Koca y col., 2011). En el estudio de Koca y col. (2011) sin embargo, la humedad de los quesos tratados a mayor presión fue mayor al final de la maduración. Otros trabajos han informado el mismo efecto en quesos de cabra a los cuales se les aplicó una presión de 400 MPa durante 5 min (Saldo y col., 2000) y en quesos de oveja tratados a 400 y 500 MPa durante 10 min (Juan y col., 2007). Estos autores atribuyeron este mayor contenido de humedad al final de la maduración en los quesos tratados con APH a que el tratamiento podría conducir a la formación de una red de proteínas diferente, que interactúa mejor el agua, por lo que el contenido de agua retenida por la matriz proteica es mayor, a pesar de partir del mismo contenido de humedad inicial que los quesos controles. Esto llevaría a pensar que a lo largo de la maduración, las pérdidas de humedad serían mayores en los quesos controles. En este estudio, si bien al final de la maduración los quesos T3 y T4 tuvieron un mayor contenido de humedad que el resto, la diferencia no resultó estadísticamente significativa. Es probable que en nuestra investigación, las diferencias de humedad entre tratamientos no se hayan acentuado, porque como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, a partir del día 10 todos los quesos se envasaron al vacío debido a su pequeño tamaño y para evitar pérdidas excesivas de humedad.

El contenido de grasa y proteínas en base seca no fue afectado por el tratamiento con APH. Capellas y col. (2001), Saldo y col. (2002), Juan y col. (2004, 2008), Rynne y col. (2008) y Moschopoulou y col. (2010) obtuvieron resultados acordes en varios tipos de quesos tratados bajo diferentes condiciones de presión y tiempo de presurización.

En lo que respecta al pH, varios autores encontraron diferencias atribuibles al tratamiento con APH. En este sentido, Rynne y col. (2008) informaron que quesos Cheddar tratados a 400 MPa 10 min tuvieron un pH superior a los controles, a lo largo de todo el periodo de maduración. En este mismo tipo de queso, se observó un efecto lineal positivo de la presión sobre el pH, al

variar la presión entre 50 y 400 MPa durante 5 y 20 min (Ozturk y col., 2013). Este mismo efecto fue informado para queso Mozzarella (Sheehan y col., 2005) y queso de cabra (Saldo y col., 2002) tratados a 400 MPa durante 5 min. El aumento del pH en los quesos tratados con APH ha sido asociado a varios factores, entre los que se incluye: 1- un incremento en la disociación de los grupos ionizables (por ejemplo grupos carboxilos) de los sistemas proteicos, lo cual cambia la concentración de hidrogeniones libres, y por lo tanto el pH; 2- la inactivación de las bacterias del starter antes de que se complete la acidificación (Sheehan y col., 2005; Rynne y col., 2008.). En quesos Gouda tratados a 300 MPa durante 6 min, se observó un aumento de pH el cual revirtió luego de 14 días de maduración, tiempo en el cual el valor de pH de las muestras presurizadas se igualó al de los quesos controles (Messens y col., 1998). Este efecto reversible fue asociado a una liberación temporaria de fosfato de calcio coloidal a la fase acuosa del queso (Messens y col., 1998). En la presente tesis, se halló que el pH se incrementó con el tiempo de maduración tanto en los quesos tratados como en los controles, pero no se encontraron cambios atribuibles a la aplicación de APH. El aumento del pH durante la maduración de quesos duros se ha observado en trabajos previos y probablemente sea consecuencia de la combinación del proceso de proteólisis y la evolución de los equilibrios salinos que ocurren durante el almacenamiento (Lawrence y col., 1987).

Tanto en los quesos controles como en los tratados con APH, el recuento de bacterias termófilas disminuyó a lo largo del período de maduración estudiado. En primer lugar, se observó una drástica disminución a los 45 días, de hasta 10^3 , alcanzando al final de la maduración valores no detectables. Como ya se ha mencionado en el punto 3.2, el recuento a 45°C representa fundamentalmente en fermento iniciador de *Lactobacillus helveticus*. Los recuentos al inicio y al final de la maduración son comparables a lo observado en queso Reggiano por otros autores (Candioti y col., 2002; Ceruti y col., 2014). También en quesos duros italianos de pasta cocida, como el Parmigiano Reggiano o el Grana Padano, los cuales son elaborados utilizando fermentos naturales compuestos principalmente por este mismo cultivo, se ha reportado una disminución similar de los recuentos del fermento (Giraffa y col., 1997; Coppola y col., 2000). La disminución de los recuentos es consecuencia en gran medida a la actividad autolítica de la mayoría de las cepas de *Lactobacillus helveticus* (Sadat-Mekmene y col., 2013; Gatti y col., 2014). La lisis de las células bacterianas es un evento clave para la liberación de las enzimas citoplasmáticas dentro de la matriz del queso, las cuales van a contribuir principalmente en el desarrollo de la proteólisis de los quesos. Algunas cepas de *Lactobacillus helveticus* utilizadas en la elaboración de quesos

suizos, mostraron lisis celular y liberación de sus enzimas intracelulares ya a los 2 días de maduración (Sadat-Mekmene y col., 2013). En cuanto al efecto del tratamiento con APH, en este trabajo de tesis observamos que inmediatamente luego su aplicación, los recuentos de lactobacilos termófilos fueron inferiores en los quesos tratados a 400 MPa. Se informaron resultados similares en quesos Cheddar al aplicar tratamientos con APH utilizando presiones a partir de 400 MPa (Wick y col. 2004; Rynne y col., 2008; Ozturk y col., 2013 a y b), en quesos madurados por hongos (Voigt y col., 2010; Calzada y col., 2014), en quesos de cabra (Saldo y col., 2000), y en quesos de oveja (Juan y col., 2004; Moschopoulou y col., 2010). A diferencia del fermento empleado en la presente tesis, que consiste en cepas de *Lactobacillus helveticus*, en los quesos Cheddar, de cabra y de oveja se utilizaron fermentos compuestos predominantemente por cepas de lactococos. El efecto del tratamiento con APH sobre los microorganismos depende de las condiciones de proceso (nivel de presión aplicada, tiempo de presurización, temperatura), de las características del alimento (composición, pH y actividad de agua) y del tipo de microorganismo (género, especie y cepa) (Cheftel y col., 1995; Huppertz y col., 2006b). En sistemas alimenticios reales, otros factores juegan un rol importante, ya que las bacterias pueden recuperarse luego del tratamiento con APH, lo que frecuentemente es atribuido a un efecto protector por parte de la matriz alimentaria (Wick y col., 2004). En este sentido, en quesos Cheddar con diferentes concentraciones de sal (Ozturk y col., 2013b) se observó que a medida que la concentración de sal aumentaba, el efecto sobre las cepas del fermento disminuía, lo que sugería un efecto baroprotector de la sal presente en los quesos sobre las bacterias. La disminución en los recuentos debido al tratamiento con APH, puede indicar inhibición del crecimiento de los microorganismos, por daño en la pared celular, o la autólisis del fermento (Malone y col., 2002; O'Reilly y col., 2002). El daño en la pared celular puede ser sub-letal, y por lo tanto, los microorganismos pueden recuperarse y multiplicarse luego de la presurización (Wick y col., 2004; Moschopoulou y col., 2010). Sin embargo, cuando el balance entre el daño ocasionado en la pared celular por el tratamiento con APH y la síntesis de nuevos componentes de la pared no es el adecuado, ocurre la autólisis de los microorganismos y la consiguiente liberación de las peptidasas intracelulares en la matriz del queso, teniendo esto un efecto positivo en la aceleración de la maduración (Wick y col., 2004). Juan y col. (2008) verificaron autólisis de las cepas del fermento debido al tratamiento con APH, lo que se confirmó por la presencia de una mayor actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en los quesos tratados por APH a presiones de 300 MPa. Malone y col. (2002) mostraron que el tratamiento con APH causó inactivación, daño físico y lisis en cepas

de lactococos, y que la lisis fue dependiente de la cepa y de la presión utilizada. En la presente tesis no se realizaron indagaciones sobre marcadores de lisis de *Lactobacillus helveticus* tales como enzimas intracelulares. Sin embargo, sí se emprendió una pormenorizada descripción de la peptidólisis, que también constituye un indicador de la actividad de peptidasas intracelulares de bacterias lácticas en quesos. En efecto, la disminución de los recuentos a 45°C correlaciona con el incremento en la proteólisis observada en los quesos tratados a 400 MPa, como se discutirá más adelante.

Los lactobacilos mesófilos son una componente importante de las bacterias no fermento, también denominadas NSLAB por sus siglas en inglés (Non Starter Lactic Acid Bacteria). Los lactobacilos mesófilos incluyen tanto especies heterofermentantes facultativas (por ejemplo *Lb. casei* y *Lb. plantarum*) como heterofermentantes obligatorias (por ejemplo *Lb. fermentum* y *Lb. brevis*) (Crow y col., 1995). Las más frecuentemente encontradas en quesos son *Lb. casei* / *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* y *Lb. curvatus* (Cogan y Beresford, 2002; Bude Ugarte y col., 2006). El grupo, que además de los lactobacilos mesófilos puede incluir pediococos, enterococos y *Leuconostoc* sp. (Beresford, 2003), crece espontáneamente durante la maduración y por lo tanto, son componentes habituales de la microflora de los quesos, pudiendo provenir de la leche de elaboración, de ingredientes usados en la elaboración de los mismos o del ambiente de la quesería (Settanni y Moschetti, 2010). Durante la maduración de los quesos, la componente NSLAB en el ecosistema alimentario comienza a prevalecer al tiempo que el número de bacterias lácticas del starter disminuye (Sousa y col., 2001; Gatti y col., 2014), lo que también se verificó en el presente trabajo. Los valores de lactobacilos mesófilos encontrados al final de la maduración, fueron similares a los encontrados en otros estudios realizados en queso Reggiano (Cerutti y col., 2014). La disminución al inicio de la maduración en el número de lactobacilos mesófilos debido al tratamiento con APH a 400 MPa también fue encontrada en otras variedades de queso cuando se aplicaron presiones similares (Novella-Rodriguez y col., 2002, Wick y col., 2004; Juan y col., 2007; Rynne y col., 2008; Moschopoulou y col., 2010).

Tanto en los quesos controles como en los tratados con APH, el recuento de bacterias lácticas totales disminuyó a lo largo del período de maduración estudiado. Los recuentos al inicio y al final de la maduración son comparables a lo observado en queso Reggiano por otros autores (Candiotti y col., 2002; Hynes y col., 2003; Perotti y col., 2005). En el presente trabajo de tesis, el tratamiento con APH no mostró efecto sobre el número de bacterias lácticas totales, probablemente porque este recuento resultó demasiado inespecífico como indicador, a diferencia

de los recuentos en MRS a 30 y 45°C. En una investigación sobre queso de oveja, se encontró que la aplicación de una presión de 200 MPa no afectaba el recuento de la flora láctica total, pero presiones de 500 MPa disminuían significativamente los recuentos, entre 2 a 4 ciclos logarítmicos (Moschopoulou y col., 2010). En otro estudio también en queso de oveja (Juan y col., 2007a), se evidenció una reducción de 1 unidad logarítmica en los quesos tratados a 100 y 300 MPa, de 2 unidades logarítmicas cuando se empleó una presión de 400 MPa, mientras que al aplicar una presión de 500 MPa la reducción fue de 5 unidades logarítmicas en los quesos tratados comparados con los controles. Como ya se ha mencionado, el efecto del tratamiento sobre los microorganismos, es una combinación de la presión empleada, el tiempo de presurización, el tipo de queso y los microorganismos presentes.

La plasmina y el coagulante residual son enzimas proteolíticas que se encuentran normalmente activas en los quesos. Ambas intervienen de forma activa en la proteólisis primaria. Incrementar sus actividades, puede conducir a una proteólisis más rápida o de mayor avance en los productos finales y una forma de acelerar la maduración puede consistir en el aumento de tales actividades (Farkye y Fox, 1992; Fox y col., 2000; Aparo y col., 2004; Hynes y col., 2004a). Se ha informado que la aplicación de un tratamiento APH en etapas tempranas de la maduración, puede afectar los parámetros de maduración de los quesos, a través de la modulación de las reacciones enzimáticas (Miyakawa y col., 1994; Messens y col., 1999; O'Reilly y col., 2000). En este trabajo, se comprobó que la actividad de la plasmina se incrementó en quesos con aplicación de APH de 400 MPa. Esta activación no se había informado previamente en quesos. En trabajos previos realizados en quesos Cheddar, cuando las muestras se sometieron a tratamientos similares, la actividad de la enzima no fue afectada por el tratamiento con APH (O'Reilly y col., 2002; Huppertz y col., 2004; Rynne y col., 2008). Existe evidencia de que la aplicación de presiones hidrostáticas de bajas a moderadas (entre 100 a 400 MPa) pueden incrementar la actividad de enzimas (Anese y col., 1995; Cano y col., 1997), mientras que presiones superiores pueden inactivarlas (Gomes y Ledward, 1996; Goodner y col., 1998; Huppertz y col., 2004). El rango en el cuál la presurización puede pasar de mostrar efectos positivos a negativos en la actividad neta de una enzima, depende no sólo de las características de la molécula enzimática y de la matriz alimentaria en la que se encuentra, sino también de los otros componentes del sistema enzimático de interés. La plasmina presenta un complejo sistema de precursores e inhibidores en la matriz leche, muchos de los cuales pasan al queso en diversa medida según la tecnología casearia aplicada, y también está asociada al precursor inactivo plasminógeno. Por ello, resulta difícil

comparar el efecto de un determinado tratamiento APH entre distintos tipos de queso. En cuanto a la actividad de la enzima coagulante residual, ésta no se vio afectada por el tratamiento con APH, lo que coincide con lo informado en trabajos previos (Messens y col., 1999; O'Reilly y col., 2002; Huppertz y col., 2004; Rynne y col., 2008). Huppertz y col. evaluaron la actividad coagulante residual a diferentes presiones en quesos Cheddar, y encontraron que el tratamiento con APH produjo inactivación de esta enzima a presiones mayores a 400 MPa.

Como ya se mencionó en el capítulo 2, se conoce que la caseína α_{s1} es la proteína de la matriz del queso más susceptible a la acción de la enzima coagulante residual durante la maduración de los quesos, y el primer sitio de acción es la unión Phe₂₃-Phe₂₄ para posteriormente producir los péptidos α_{s1} (f1-23) y α_{s1} -I (f24-199) (Carles y Ribadeau-Dumas, 1985). En lo que respecta a la plasmina, se sabe que los sustratos preferenciales de esta enzima son las caseínas β y la α_{s2} , originándose a partir de la proteólisis de la primera los fragmentos C-terminales denominados caseínas γ_1 , γ_2 y γ_3 (Rampilli y Raja, 1998). Generalmente el aumento de la concentración de γ caseínas es considerado como un índice de acción de esta enzima (Grufferty y Fox, 1988; Fernández, 2004).

En este trabajo, en general, los indicadores de proteólisis evaluados demostraron que esta transformación bioquímica principal de la maduración fue afectada por el tratamiento con APH. El efecto resultó más notorio cuando el nivel de presión aplicada fue 400 MPa, ya que se verificó en indicadores no específicos como la fracción soluble a pH 4,6, y se correspondió con los resultados de la electroforesis, con una mayor intensidad en la fracción α_{s1} -I y en las fracciones de γ -caseínas, especialmente a los 45 días de maduración. La mayor intensidad de γ -caseínas se correspondió con la mayor actividad de la plasmina en los quesos en los que se aplicó esa presión. Messens y col (1998) también encontraron un aumento en la hidrólisis de las caseínas β , aun cuando no hallaron modificaciones en la actividad de la plasmina en quesos Gouda tratados a 300 MPa. Estos autores atribuyeron las diferencias a un cambio conformacional de la estructura de las caseínas como consecuencia de la presión, lo que llevaría a una mayor exposición de los sitios de acción de la plasmina sobre la caseína β favoreciendo su hidrólisis. Saldo y col. (2002) también encontraron una mayor concentración de los productos de la hidrólisis de la caseína β por plasmina en quesos de cabra tratados a 400 MPa 5 min, sin hallar diferencias en la concentración de plasmina con respecto al control; en este caso los autores lo explicaron por el mayor pH de los quesos tratados con APH. En lo que respecta a la fracción α_{s1} -I, su incremento no se correlacionó con una mayor actividad de la enzima coagulante residual, ya que no existieron diferencias significativas entre

tratamientos. Sin embargo, a los 45 días de maduración se presentan valores numéricamente mayores para la actividad coagulante residual en los quesos en los cuáles se aplicó mayor presión. En función de lo informado por otros autores, la influencia del tratamiento con APH sobre la proteólisis puede deberse tanto a una mayor actividad de la enzima – no verificada en este caso – como a una mayor susceptibilidad del sustrato luego de la presurización (O'Reilly y col., 2003).

El aumento de la proteólisis primaria por efecto del tratamiento con APH también fue observado por otros autores en diferentes variedades de queso. En tal sentido, Rynne y col. (2008) encontraron un comportamiento similar al observado en la presente tesis en quesos Cheddar tratados a 400 MPa 10 min. Observaron una mayor hidrólisis de la caseína α_{s1} a los 21 días de maduración y mayores niveles de NS pH 4,6 a lo largo de toda la maduración en los quesos tratados con respecto a los controles. También en otros trabajos, a presiones próximas a 400 MPa, se ha observado un incremento en la velocidad de la proteólisis primaria en queso cabra (Saldo y col., 2000), queso de oveja (Garde y col. 2007; Juan y col., 2007), queso Gouda (Messens y col., 2001). En queso Mozzarella expuesto a una presión de 400 MPa por 5 min, la proteólisis primaria evaluada a través del NS-pH 4,6 no mostró cambios atribuibles al tratamiento con APH (Sheehan y col., 2005). Igual falta de efecto sobre las fracciones NS solubles se observó en queso Cheddar reducido en materia grasa, en el cual la presión y el tiempo de presurización se variaron entre 48 y 402 MPa y 2,5 y 19,5 min respectivamente (Ozturk y col., 2013). Cabe mencionar que en este estudio, la aplicación del tratamiento con APH se realizó a los quesos luego de una semana de elaborados, lo que evidencia que el tiempo post elaboración es un factor de relevancia. En quesos Edam tratados a presiones de 200 y 400 MPa a las 4, 6 y 8 semanas posteriores a la elaboración, se observó una disminución inicial de la fracción NS-pH 4,6 luego del tratamiento con APH con respecto a los controles. Sin embargo, al final de la maduración los niveles de NS de todos los quesos se igualaron (Iwaczac y Winiewska, 2005). Estos resultados evidencian que las características fisicoquímicas y las condiciones ambientales particulares de las diferentes variedades de quesos estudiadas, así como el tiempo luego de la elaboración en el cual se aplica el tratamiento con APH, tienen un fuerte impacto sobre el efecto del tratamiento con APH sobre la proteólisis.

También los perfiles peptídicos de las muestras tratadas a mayor presión se diferenciaron del resto, lo que evidenció una mayor proteólisis secundaria en los quesos T3 y T4. Si bien se detectó también una tendencia a presentar mayores cantidades de aminoácidos libres totales con el aumento de la presión, en general, los valores individuales de aminoácidos no mostraron efecto del

tratamiento, a excepción del ácido aspártico, cuya concentración fue significativamente más elevada en los quesos tratados a 400 MPa. Esta ausencia o muy pequeño efecto del tratamiento con APH sobre los niveles de aminoácidos libres también fue observado por otros autores en quesos Cheddar (O'Reilly y col., 2002; Rynne y col., 2008), Mozzarella (Sheehan y col., 2005) y Gouda (Messens y col., 1999). En queso de oveja, se observó también ausencia de efecto tratamiento para quesos tratados a presiones mayores a 400 MPa, pero los quesos tratados a menor presión (200 y 300 MPa) presentaron mayores niveles de aminoácidos libres que los controles (Juan y col., 2007). También a esas presiones, por HPLC observaron menores niveles de péptidos hidrofóbicos y mayores niveles de péptidos hidrofílicos, asociando esto a una mayor actividad peptidolítica (Juan y col., 2007; Juan y col. 2008).

5- Conclusiones

La composición química y el pH de los quesos no mostraron cambios significativos iniciales ni a lo largo de la maduración debidos al tratamiento con APH. Los recuentos iniciales de lactobacilos termófilos, en cambio, fueron afectados por los tratamientos más intensos.

La aplicación de APH a 400 MPa durante 10 min al inicio de la maduración de queso Reggianito se correspondió con un incremento en la actividad de plasmina.

El mismo tratamiento favoreció un incremento general de la proteólisis y peptidólisis, evidenciado por un aumento de las fracciones NS a lo largo de toda la maduración, en un aumento de la velocidad de hidrólisis de las caseínas, por cambios cuantitativos en los péptidos solubles y por el incremento de los niveles de aminoácidos libres totales. El tratamiento de 400 MPa 10 min condujo a índices de proteólisis similares a los del queso control de 90 días de maduración en sólo 60 días.

La aplicación de los tratamientos a menores presiones, independientemente del tiempo de presurización seleccionado, no produjo cambios relevantes en ninguno de los parámetros evaluados.

Capítulo 4

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS (APH) SOBRE PROPIEDADES TEXTURALES, PARÁMETROS CROMÁTICOS Y CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE QUESO REGGIANITO

1. Introducción

Las características sensoriales de los quesos determinan su calidad y son decisivas a la hora de su aceptación por parte de los consumidores. Se trata de propiedades que se perciben por los sentidos humanos, fundamentalmente durante la ingesta del alimento, y pueden ser reunidas en categorías: características de apariencia, características de textura y características de aroma y sabor (Fox y col., 2000).

Algunas propiedades de los alimentos relacionadas con su calidad, pueden ser evaluadas tanto mediante análisis sensorial o como por métodos instrumentales. La textura, por ejemplo, puede ser evaluada mediante análisis sensorial a través de la medida de la firmeza, dureza, grana, cohesividad, elasticidad, gomosidad, masticabilidad. La evaluación de textura por métodos instrumentales se basa generalmente en los ensayos de fuerza de compresión que están diseñados para simular la compresión de queso entre los molares durante la masticación (Fox y col., 2000). Los métodos instrumentales más comúnmente utilizados para la determinación de textura, son el ensayo de compresión uniaxial, por medio del cual se pueden determinar parámetros como deformación y esfuerzo a la fractura y trabajo en la fractura, y el análisis de perfil de textura (TPA, por sus siglas en inglés texture profile analysis), por medio del cual se evalúan parámetros como fuerza, dureza, elasticidad, masticabilidad, gomosidad, adhesividad, cohesividad (Gunasekaram y Ak, 2003). También el color de los quesos puede ser evaluado por métodos instrumentales y por análisis sensorial. El método instrumental más comúnmente utilizado, es el que se basa en la determinación de los parámetros cromáticos L^* , a^* y b^* (Calvo, 1997).

Durante la maduración de los quesos, los cambios bioquímicos que ocurren, darán lugar a modificaciones en las características sensoriales de los quesos. Las características físicas de los quesos, tales como textura y color, están influenciadas por la composición inicial de los quesos, el proceso de elaboración, y la maduración (Lucey y col., 2003).

Teniendo en cuenta que el tratamiento con APH produce modificaciones en la composición y en la bioquímica de maduración de los quesos, es de esperar que también las características sensoriales sean modificadas. El efecto de la aplicación de APH sobre la textura y el color de quesos, se ha estudiado tanto por métodos instrumentales como sensoriales, en algunas variedades de quesos. En relación a la textura, se han realizado investigaciones en quesos Cheddar (Wick y col., 2004; Rynne y col., 2008, Ozturk y col., 2013 a y b), en queso semiduro de oveja (Garde y col., 2007; Juan y col., 2007b; Juan y col., 2008), en queso Gouda (Messens y col., 2000; Liu y col., 2011), en queso Mozzarella (Sheehan y col., 2005), en una variedad de queso Turco semiduro madurado en salmuera (Koca y col., 2011), en queso de

cabra (Saldo y col., 2001), en quesos Brie (Calzada y col., 2014) y queso blando de Escocia (Okpala y col., 2010). En cuanto a los parámetros cromáticos, han sido objeto de estudio quesos Cheddar (Rynne y col., 2008), quesos semiduros madurados en salmuera (Koca y col., 2011), queso Mozzarella (Sheehan y col., 2005), quesos semiduros de oveja (Juan y col., 2008). El impacto del tratamiento con APH sobre el análisis sensorial de los quesos mediante panel entrenado, considerando los atributos diferenciales para cada tipo de queso, fue evaluado en queso Cheddar (Rynne y col., 2008; Ozturk y col., 2013 a y b), en una variedad de queso duro no cocido (Yang y col., 2014), en queso Brie (Calzada y col., 2014), en quesos de oveja (Garde y col., 2007; Juan y col., 2008); en queso de cabra (Delgado y col., 2013)

Según la información publicada por diferentes autores, el efecto del tratamiento con APH sobre textura, parámetros cromáticos y características sensoriales depende del tipo de queso, de las condiciones de presión y tiempo aplicadas y del momento luego de la elaboración del queso en el cual se aplica el tratamiento. Se considera que las diferencias en dichas condiciones son la causa de que el tratamiento con APH lleve en algunos casos a una aceleración de la maduración del queso, mientras que en otros, muestre el efecto contrario (Yang y col., 2014; Rynne y col., 2008)

En el caso de quesos Reggianito, no existen investigaciones previas sobre el efecto de la tecnología APH en la textura, los parámetros cromáticos y el perfil sensorial. Tampoco se presenta literatura acerca de otras variedades de queso duro de pasta cocida, tales como los quesos italianos del tipo grana, o los quesos del tipo “parmesano genérico”.

El objetivo del presente capítulo consistió en determinar el efecto del tratamiento con APH sobre la textura, los parámetros cromáticos y las características sensoriales del queso Reggianito.

2. Materiales y Métodos

2.1 Diseño experimental, elaboración de los quesos, tratamiento con APH y maduración de los quesos

Los quesos que se utilizaron para el análisis de textura, parámetros cromáticos y análisis sensorial, fueron elaborados de acuerdo al diseño experimental descrito en la sección 2.1 del capítulo 3. El proceso de elaboración, el tratamiento con APH y la maduración de los mismos se describió en las secciones 2.2 y 2.3 del mencionado capítulo.

2.2 Análisis de los quesos

Los análisis de textura y parámetros cromáticos descritos a continuación, se realizaron los días 1, 45 y 90 post tratamiento con APH. El análisis sensorial se realizó a los 45 y 90 días de maduración. De los 8 quesos disponibles por elaboración para cada tratamiento (incluyendo el control), 5 fueron destinados a los mencionados análisis, como se muestra en la Figura 3.2 del capítulo 3.

2.2.1 Textura

La textura de los quesos fue analizada a través de ensayos de Compresión Uniaxial y Análisis de Perfil de Textura (TPA). Los análisis se realizaron en el Área de Procesamiento de Alimentos del Instituto Tecnología de Alimentos del CIA-INTA Castelar, utilizando un Analizador de Textura marca Stable Micro Systems modelo TA.XTplus (Surrey, Reino Unido).

2.2.1.1 Preparación de las muestras

Para la toma de muestra, cada queso (diámetro: 50 mm y largo: 80 mm) se cortó por la mitad en forma perpendicular a su eje principal. Una vez realizado el corte, quedaron dos mitades de 40 mm de longitud cada una. En cada mitad se seleccionó la cara externa, la cual posee la cáscara, colocándola como base, de modo que la cara interior quedó ubicada hacia arriba. Posteriormente, de cada mitad se extrajeron 5 muestras (cilindros), las cuales se tomaron sobre una circunferencia ubicada aproximadamente a la mitad del radio correspondiente al queso, como se presenta en la Figura 4.1.

Los cilindros se tomaron en la dirección en que se aplicó presión al queso en la etapa de prensado, según lo establece la Norma ISO/TS 17996 IDF/RM 205 (2006). El sentido de corte (introducción del sacabocado) fue desde la parte interior hacia la cáscara (Figura 4.1). Luego de obtener el cilindro de 40 mm de longitud se procedió a reducirlo a la longitud correspondiente al ensayo. Según la Norma ISO/TS 17996 IDF/RM 205, la longitud del cilindro debe encontrarse en el rango 12.5 a 25 mm y la relación de longitud a diámetro del cilindro (h/d) debe estar en el rango 1.1 a 1.5. En virtud de ello, considerando que el sacabocado presenta un diámetro interior (\emptyset) de 11.5 mm, y tomando la relación $h/d = 1,5$, la longitud de los cilindros fue de 16 mm. Una vez

obtenidos los cilindros se acondicionaron en cámara de refrigeración a $14 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 1 h, dentro de una bolsa troquelada de polietileno. De los 10 cilindros obtenidos, 5 se destinaron al ensayo de compresión uniaxial y 5 al ensayo de TPA

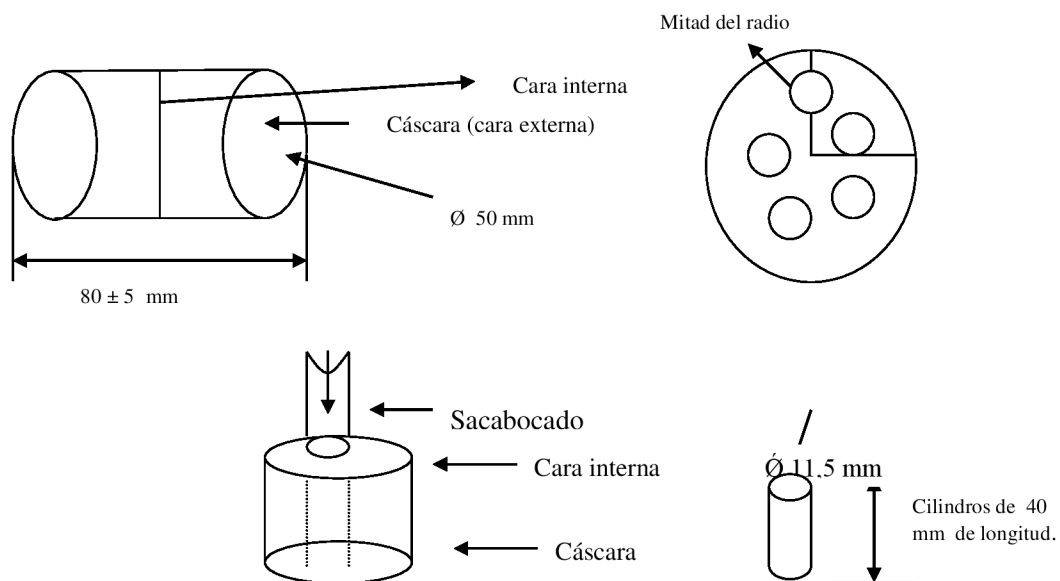


Figura 4.1. Toma de muestras para los ensayos de compresión uniaxial y análisis de perfil de textura (TPA).

2.2.1.2 Ensayos de Compresión Uniaxial

El ensayo de compresión uniaxial es la prueba más utilizada para determinar las propiedades mecánicas de los alimentos, incluyendo el queso (Gunasekaram y Ak, 2003).

La determinación consiste en comprimir una muestra cilíndrica de dimensiones definidas a una velocidad constante con una sonda de compresión a una deformación relativa suficiente para determinar el punto de fractura aparente. La deformación que se aplica es superior al punto de fractura. La fuerza, la cual es la resistencia de la muestra de queso durante la compresión, es medida con una celda de carga (ISO/TS 17996 IDF/RM 205, 2006).

Para el ensayo, se utilizó un analizador de textura Stable Micro Systems modelo TA.XTplus (Surrey, Reino Unido) con una celda de carga de 50 kg, una sonda cilíndrica de Ø 35 mm (Stable Micro System Cod. SMS P/35) y una plataforma plana (Heay duty platafom Stable Micro System Cod HDP/90) (Figura. 4.2). La velocidad pre-test que se utilizó fue de 1,5 mm/seg, la velocidad de deformación constante fue de 0,80 mm/seg, y la velocidad post-test fue de 10 mm/seg, y la compresión fue del 80%.

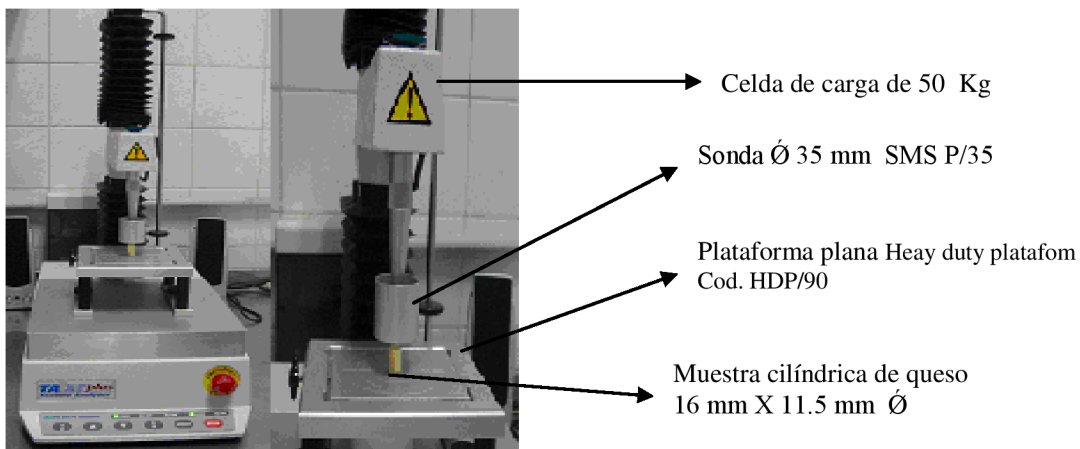


Figura 4.2. Analizador de textura Stable Micro Systems modelo TA.XTplus utilizado para los ensayos de compresión uniaxial

Los datos obtenidos (curva fuerza vs deformación) fueron transformados a los parámetros normalizados deformación y esfuerzo, obteniéndose las curvas en función de estos parámetros. Para la normalización de las curvas se calcularon el esfuerzo corregido (σ_c , corrected stress) y la deformación de Hencky (ϵ_H , Hencky strain). Los parámetros se calcularon aplicando las ecuaciones siguientes:

Deformación de Hencky (ϵ_H):

$$\epsilon_H = \ln \left(1 + \frac{\Delta H_b}{H_0} \right)$$

Siendo H_0 la altura inicial de la muestra, y $\Delta H_b = H_0 - H_b$, la variación de la altura de la muestra. Es importante destacar que la deformación de Hencky es un parámetro adimensional.

Esfuerzo corregido (σ_c):

El esfuerzo corregido se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\sigma_c = \sigma_u \left(1 + \frac{\Delta H_b}{H_0}\right)$$

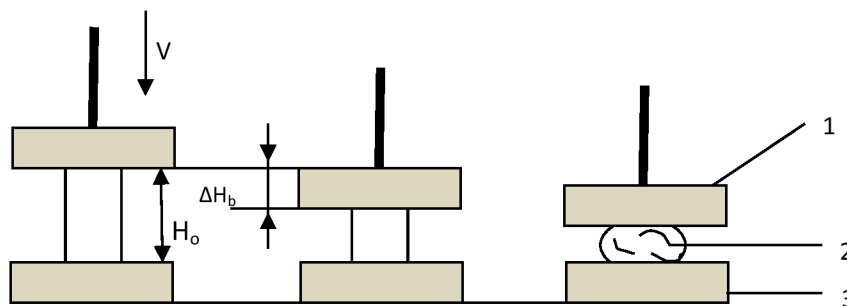
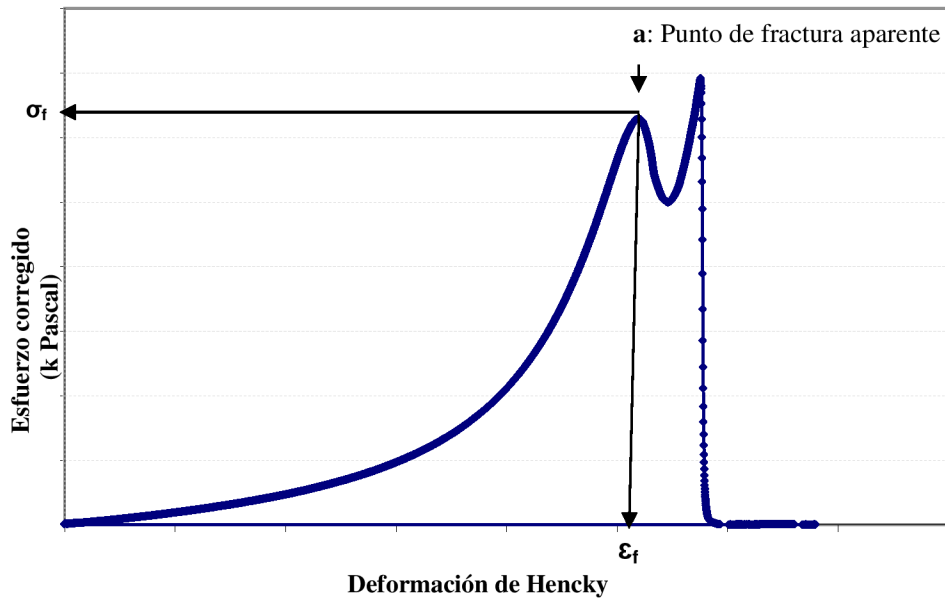
Donde σ_u es el esfuerzo no corregido, el cual es el cociente fuerza por unidad de área en la cual la fuerza es aplicada:

$$\sigma_u = \frac{F}{A_0}$$

Siendo A_0 el área inicial de la sección transversal de la muestra de queso, H_0 la altura inicial de la muestra, y $\Delta H_b = H_0 - H_b$, la variación de la altura de la muestra. La unidad del esfuerzo es kilopascals ($\text{kPa} = \text{N/m}^2 \times 10^3$)

Una vez que se obtuvieron las curvas esfuerzo corregido vs. deformación de Hencky (σ_c vs. ϵ_H) se determinaron esos parámetros para el punto de fractura aparente. El máximo local observado en la curva de compresión se define como “punto de fractura aparente” (punto **a** en Figura 4.3). En este caso no se trata de la fractura masiva sino de la aparición de microfracturas en el material. Los valores de esfuerzo corregido y deformación de Hencky correspondientes al punto de fractura aparente son también cantidades “aparentes” y se denominan “esfuerzo a la fractura” y “deformación a la fractura”, representándose por las letras σ_f y ϵ_f , respectivamente.

En la Figura 4.3 se esquematiza una curva de compresión, y se identifican los parámetros evaluados.



V es la velocidad de desplazamiento constante; H_o es la altura inicial del cilindro; ΔH_b es la variación de altura del cilindro

1= sonda de compresión, 2= muestra y 3= base fija

Figura 4.3. Esquema de una curva de compresión uniaxial a velocidad de deformación constante. Identificación de los parámetros evaluados (adaptado de Norma ISO/TS 17996 IDF/RM 205, 2006)

Los parámetros presentados (deformación y esfuerzo a la fractura) se obtuvieron utilizando el software Texture Exponent 32 disponible en la computadora asociada al analizador de textura Stable Micro Systems. Los valores informados de los parámetros corresponden al promedio de los resultados de las 4 elaboraciones y a su vez, en cada elaboración, el valor de los parámetros correspondió al promedio de los 5 cilindros evaluados por cada queso.

2.2.1.3 Análisis del Perfil de Textura (TPA)

Este ensayo consiste en someter al cilindro de queso (obtenido según se describe en 2.2.1.1) a un doble ciclo de compresión a desplazamiento constante. El objetivo de este ensayo es simular el proceso de masticación humana. El TPA es esencialmente un ensayo de compresión uniaxial, pero en dos etapas de compresión, que puede estar separados por un tiempo de espera opcional (Gunasekaram y Ak, 2003). En la Figura 4.4 se presenta una curva de TPA obtenida a partir del analizador de textura marca Stable Micro System modelo TA.XTplus

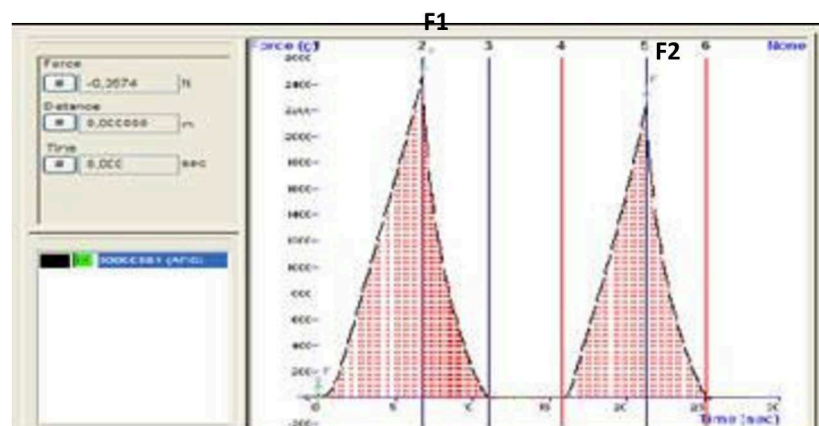


Figura 4.4. Curva TPA obtenida a partir del analizador de textura marca Stable Micro System modelo TA.XTplus

Los parámetros que se evaluaron fueron: dureza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad. La dureza se define como el valor de fuerza correspondiente al máximo del primer ciclo de compresión (F1) y tiene unidades de fuerza (N). El parámetro elasticidad se vincula a la altura que el alimento recupera durante el tiempo que transcurre entre el final de la primera mordida y el comienzo de la segunda y se calcula como el tiempo transcurrido durante la segunda compresión en relación al transcurrido durante la primera, por lo que no posee unidades. Con respecto al parámetro cohesividad, Szczesniak (1963) lo definió como la fuerza de las uniones internas que dan estructura al producto. La cohesividad se calcula como la relación entre el área de fuerza positiva obtenida durante la segunda compresión y el área de fuerza positiva obtenida durante la primera compresión. Este parámetro es una relación entre áreas por lo que no posee unidades. La masticabilidad se define como el producto de la dureza x cohesividad x elasticidad (posee unidades de fuerza).

Para el ensayo, al igual que para el de compresión uniaxial, se utilizó una celda de carga de 50 Kg, una sonda de Ø 35 mm (Stable Micro Systems, Cod. SMS P/35) y una plataforma plana (Heavy duty platform Stable Micro Systems, Cod HDP/90) (Fig. 4.2). La velocidad pre-test fue de 3 mm/seg, la velocidad de deformación constante fue de 0,80 mm/seg, y la velocidad post-test fue de 3mm/seg, la compresión fue del 25%.

Los valores informados de los parámetros corresponden al promedio de los resultados de las 4 elaboraciones y a su vez, en cada elaboración, el valor de los parámetros correspondió al promedio de los 5 cilindros evaluados por cada queso.

2.2.2 Evaluación de los parámetros cromáticos

El sistema utilizado para la determinación de los parámetros cromáticos fue el CIELab, según el cual se determinan los parámetros L^* , a^* y b^* . El parámetro L^* corresponde a la claridad ó luminosidad ($L^*= 0$: negro, $L^* = 100$ blanco). El parámetro a^* varía entre el verde ($-a^*$, -60) y el rojo ($+a^*$, +60), mientras que el parámetro b^* varía entre el azul ($-b^*$, -60) y el amarillo ($+b^*$, +60) (Calvo, 1997).

Los parámetros cromáticos $L^*-a^*-b^*$ se determinaron utilizando un espectrofotómetro portátil marca Minolta modelo CR-400, con un iluminante D65 y un ángulo de observador de 2°. La determinación se realizó sobre una de las caras internas de los quesos (Figura 4.1) antes de proceder a la obtención de los cilindros de queso

para los ensayos de textura. Las determinaciones se realizaron en el centro del queso y en 4 puntos ubicados a 0,5 cm del borde y a 90° entre sí. Se promediaron los valores de los parámetros medidos en las 5 posiciones

2.2.3 Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó en el Área de Análisis Físicos y Sensoriales del Instituto Tecnología de Alimentos del CIA-INTA Castelar. Este Instituto tiene amplia experiencia en el análisis sensorial de productos cárnicos, y hace algunos años ha comenzado a trabajar en otras matrices alimentarias, entre ellos productos lácteos. Para este ensayo, el panel de evaluadores se entrenó especialmente para el análisis sensorial de queso Reggianito.

Los quesos fueron evaluados a los 45 y 90 días de maduración. Como indicadores del proceso de maduración de los quesos, se utilizaron atributos relacionados a la apariencia (intensidad de color amarillo), textura (fracturabilidad, granulosidad, arenosidad), y al aroma y sabor (intensidad de gusto salado, intensidad de sabor picante, astringencia, olor característico y flavour típico).

Para el análisis se utilizó una prueba de ordenamiento por intensidades (Meilgaard y col., 2007). Para ello, un grupo de 15 evaluadores entrenados recibió 5 muestras de queso en orden aleatorio y se les solicitó que las ordenaran según la intensidad de los atributos escogidos. La prueba se llevó a cabo en 5 sesiones independientes, en cada una de las cuales se evaluaron 2 atributos por sesión durante las primeras 4 sesiones y el atributo restante la última sesión. La evaluación de no más de dos atributos por sesión se recomienda para este tipo de queso, debido al flavour muy intenso que presenta, y además el elevado número de atributos a evaluar, lo que puede ocasionar una saturación de los receptores químicos y efectos de arrastre, dando lugar a una errónea interpretación de los resultados (Hough y col., 1994). Las muestras se presentaron en recipientes de plástico descartables. Se trabajó con muestras de 1 cm de espesor y codificadas con un número de 3 dígitos al azar. Los evaluadores trabajaron en forma individual en cabinas separadas y según los lineamientos de la norma IRAM 20002.

2.3 Análisis estadístico

Los resultados de textura y parámetros cromáticos fueron analizados según la metodología descrita en el capítulo 3. El tiempo de maduración y los diferentes tratamientos aplicados, incluyendo el control, fueron seleccionados como factores principales para el análisis. Se utilizó un diseño factorial para medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED, SAS Ver. 9.2, SAS Institute, Inc., Cary, Estados Unidos). En el caso en que la interacción resultó significativa ($P \leq 0,05$), se procedió a la "apertura" de la misma. Esto consiste en probar las hipótesis correspondientes a los efectos simples de uno de los factores para cada uno de los niveles del otro factor, considerando como término de error el correspondiente al modelo completo. Posteriormente, para cada efecto simple que resultó significativo se aplicó una prueba de comparaciones múltiples (Prueba de LSD) para detectar grupos de niveles homogéneos ($\alpha = 0,05$)

Los resultados de los análisis sensoriales fueron analizados estadísticamente aplicando el test de Friedman. En los casos en los que el valor F fue mayor que el correspondiente valor tabular se calcularon las diferencias mínimas significativas (LSD).

3- Resultados

3.1 Ensayos de Textura

3.1.1 Compresión Uniaxial

Deformación a la fractura (ϵ_f)

A medida que transcurrió el tiempo de maduración, los valores de ϵ_f disminuyeron para todas las muestras analizadas (Figura 4.5). En relación al análisis estadístico, se observó que existió interacción tratamiento-tiempo de maduración (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Significancia de los efectos tratamiento y tiempo de maduración de los quesos y sus interacciones sobre los resultados de Compresión Uniaxial

Compresión Uniaxial	Significancia		
	Tratamientos (F1)	Tiempo de maduración (F2)	Interacción (F1xF2)
ϵ_f	*	*	*
σ_f	*	*	*

*Indica efecto significativo ($P \leq 0,05$). NS: indica diferencia no significativa.

ϵ_f : Deformación a la fractura

σ_f : Esfuerzo a la fractura

La interacción existente se debió a que el comportamiento fue diferente según el tiempo de maduración estudiado. En efecto, las diferencias debidas al tratamiento fueron estadísticamente significativas solamente al inicio de la maduración (día 1 post tratamiento con APH). Las muestras que fueron tratadas con APH, se diferenciaron significativamente del control, presentando estas últimas los valores más bajos de ϵ_f . A su vez, las muestras tratadas con APH también fueron estadísticamente diferentes entre sí, siendo los valores de las muestras de los tratamientos T1 y T2 inferiores a los observados en las muestras T3 y T4 (Figura 4.5). En los otros tiempos de maduración, no hubo diferencias significativas entre los valores de ϵ_f de los quesos controles y tratados con APH.

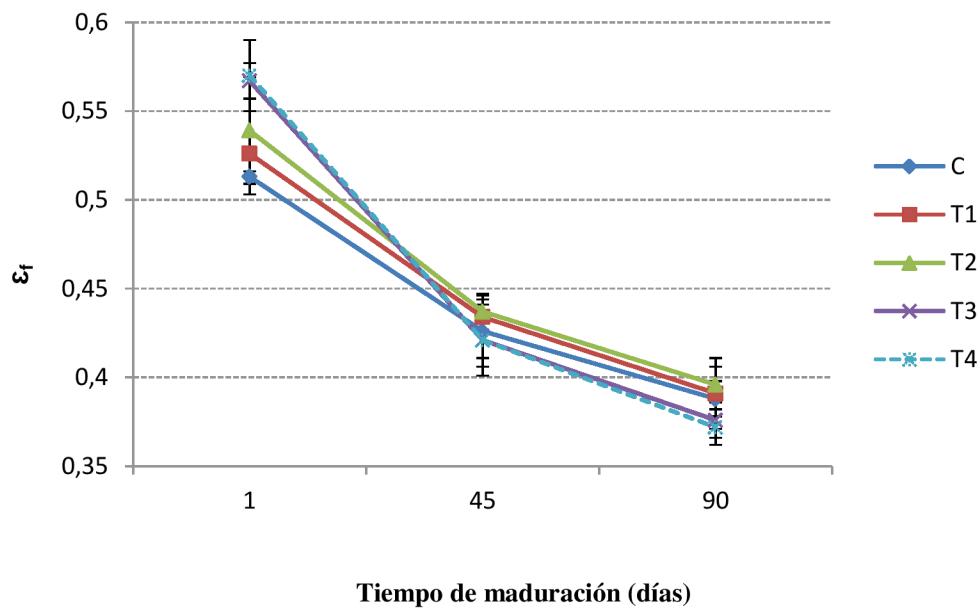


Figura 4.5. Evolución de la deformación a la fractura (ϵ_f) durante el tiempo de maduración de los quesos control y tratados. Cada punto representa un valor promedio de las 4 réplicas de elaboración. La primera determinación de todas las muestras, correspondió al día 1 post tratamiento con APH

Esfuerzo a la fractura (σ_f)

Al igual que lo observado para ϵ_f , resultó significativa la interacción tratamiento-tiempo de maduración (Tabla 4.1). El comportamiento a 1 día de maduración fue diferente a lo observado para los otros tiempos. A 1 día de maduración post tratamiento con APH, los quesos tratados a 400 MPa tuvieron valores significativamente superiores al resto (Figura 4.6). A su vez, no existió diferencia estadísticamente significativa entre los quesos controles y los tratados a 100 MPa. A 45 y 90 días de maduración, no hubo diferencias significativas entre los valores de σ_f de los quesos controles y tratados con APH.

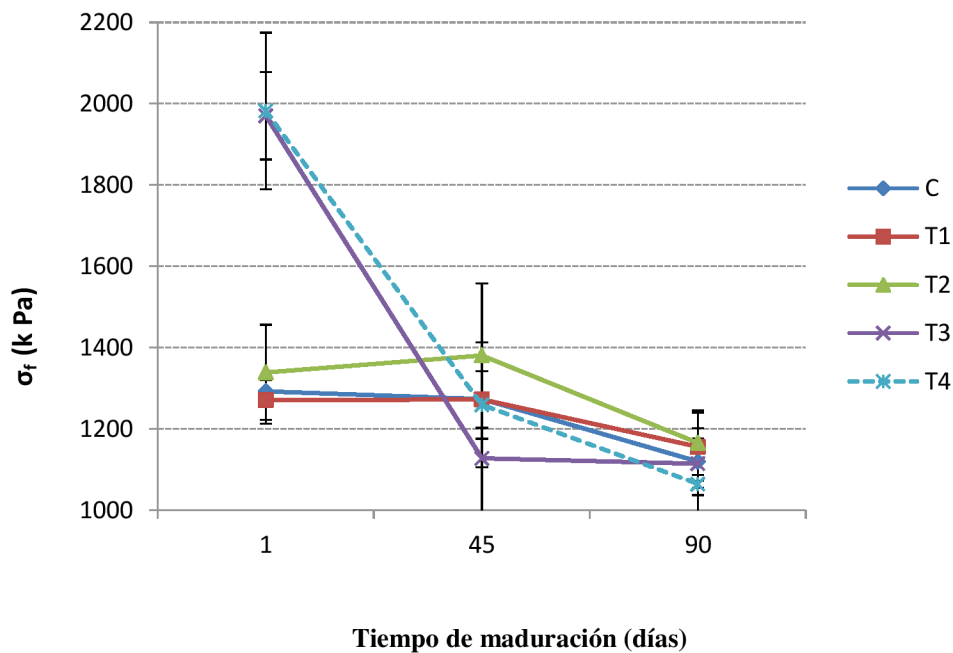


Figura 4.6. Evolución del esfuerzo a la fractura (σ_f) durante el tiempo de maduración de los quesos control y tratados con APH. Cada punto representa un valor promedio de las 4 réplicas de elaboración. La primera determinación de todas las muestras, corresponde al día 1 post tratamiento con APH

3.1.2 Análisis de Perfil de Textura (TPA)

En la Tabla 4.2 se presentan los resultados del análisis estadístico de los parámetros TPA correspondientes a los quesos de los diferentes tratamientos, a los distintos tiempos de maduración (tiempo 1, 45 y 90 días post tratamiento APH).

Tabla 4.2. Significancia de los efectos tratamiento y tiempo de maduración de los quesos y sus interacciones sobre los parámetros del análisis del perfil de textura y valores (promedio \pm desviación estándar de los análisis de las cuatro réplicas de elaboración) en función del tratamiento y del tiempo de maduración.

Variables	Significancia			Tratamientos (F1)					Tiempo de maduración (F2)		
	F1	F2	F1x F2	C	T1	T2	T3	T4	1	45	90
Dureza	NS	*	NS	31,73 \pm 18,20	30,12 \pm 16,70	31,12 \pm 16,39	31,32 \pm 18,24	32,26 \pm 20,01	8,35 \pm 1,38 ^c	39,56 \pm 6,51 ^b	46,03 \pm 5,99 ^a
Elasticidad	*	*	NS	0,859 \pm 0,009 ^a	0,861 \pm 0,010 ^a	0,861 \pm 0,009 ^a	0,853 \pm 0,010 ^b	0,843 \pm 0,012 ^c	0,856 \pm 0,012 ^a	0,861 \pm 0,014 ^a	0,849 \pm 0,006 ^b
Cohesividad	*	*	NS	0,782 \pm 0,028 ^a	0,785 \pm 0,026 ^a	0,785 \pm 0,027 ^a	0,771 \pm 0,027 ^b	0,767 \pm 0,022 ^b	0,806 \pm 0,012 ^a	0,778 \pm 0,012 ^b	0,749 \pm 0,011 ^c
Masticabilidad	NS	*	NS	21,07 \pm 11,44	20,08 \pm 10,50	20,68 \pm 10,46	20,27 \pm 11,48	20,65 \pm 12,59	5,93 \pm 1,01 ^c	26,45 \pm 3,88 ^b	29,27 \pm 3,66 ^a

*Indica efecto significativo ($P \leq 0.05$). NS: indica diferencia no significativa.

^{a,b,c} Los promedios dentro de la misma fila con letras diferentes resultaron estadísticamente diferentes

El tiempo de maduración influyó significativamente sobre todos los parámetros de textura determinados mediante TPA. Se observó que con el avance de la maduración, los parámetros dureza y masticabilidad de los quesos aumentaron, el parámetro elasticidad no varió significativamente a tiempo 1 y 45, pero a los 90 días se encontró un valor significativamente menor que en los otros tiempos evaluados, mientras que la disminución del parámetro cohesividad fue significativa durante el tiempo de maduración evaluado. Se detectó efecto del tratamiento sobre los parámetros elasticidad y cohesividad. En todos los tiempos analizados, la elasticidad y la cohesividad de los dos tratamientos a 400 MPa fueron menores a las observadas en los quesos tratados a 100 MPa y a los controles. A su vez, la elasticidad de los quesos tratados a 400 MPa se diferenció estadísticamente, presentando los quesos tratados durante mayor tiempo (10 min) el menor valor.

3.2 Parámetros cromáticos

En la Tabla 4.3 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros cromáticos. Ninguno de los tres parámetros (L^* , a^* , b^*) resultó afectado por el tratamiento con APH. A su vez, el tiempo de maduración influyó significativamente sobre los mismos. En tal sentido, se observó que los valores de L^* y a^* al inicio de la maduración fueron significativamente mayores que a los 45 y 90 días. Por el contrario, los valores de b^* aumentaron con el tiempo de maduración, presentando al día 1 valores significativamente menores que a 45 y 90 días. Para ninguno de los parámetros evaluados, se observó diferencia significativa entre los 45 y 90 días de maduración.

Tabla 4.3. Significancia de los efectos tratamiento y tiempo de maduración de los quesos y sus interacciones sobre los resultados de los parámetros cromáticos, y valores (promedio \pm desviación estándar de las cuatro réplicas de elaboración) en función del tratamiento y del tiempo de maduración.

Variables	Significancia			Tratamientos (F1)				Tiempo de maduración (F2)			
	F1	F2	F1xF2	C	T1	T2	T3	T4	1	45	90
L*	NS	*	NS	78,99 \pm 11,99	78,58 \pm 10,69	79,03 \pm 10,90	79,21 \pm 7,75	78,47 \pm 6,60	90,66 \pm 6,78 ^a	73,68 \pm 2,55 ^b	72,23 \pm 2,19 ^b
a*	NS	*	NS	-2,46 \pm 2,33	-2,59 \pm 2,26	-2,55 \pm 2,27	-2,84 \pm 2,13	-2,98 \pm 2,03	-0,64 \pm 1,81 ^b	-4,24 \pm 1,91 ^a	-3,17 \pm 0,40 ^a
b*	NS	*	NS	21,08 \pm 3,09	21,60 \pm 2,44	21,49 \pm 2,65	21,9 \pm 2,20	22,04 \pm 2,28	19,90 \pm 1,66 ^b	22,73 \pm 2,90 ^a	22,24 \pm 1,79 ^a

*Indica efecto significativo ($P \leq 0.05$). NS: indica diferencia no significativa.

^{a,b,c} Los promedios dentro de la misma fila con letras diferentes resultaron estadísticamente diferentes

3.3 Análisis sensorial

En la Tabla 4.4 se presenta la suma de los ordenamientos de intensidades para cada atributo evaluado en el análisis sensorial de los quesos controles y tratados con APH, madurados durante 45 ó 90 días.

Tabla 4.4. Suma de los ordenamientos de intensidades para cada atributo evaluado en el análisis sensorial de los quesos controles y tratados con APH, madurados 45 o 90 días.

Atributo	C	T1	T2	T3	T4
45 días de maduración					
Apariencia					
Intensidad de Color Amarillo	43	57	43	39	43
Textura					
Fracturabilidad	50 ^a	45 ^{ab}	51 ^a	32 ^b	51 ^a
Granulosidad	41	31	37	45	26
Arenosidad	50	41	51	32	51
Aroma y sabor					
Intensidad de sabor picante	51	38	45	55	36
Astringencia	37	36	25	45	37
Olor característico	44 ^{abc}	50 ^{ab}	61 ^a	32 ^c	38 ^{bc}
Intensidad de gusto salado	41 ^b	38 ^b	35 ^b	59 ^a	52 ^{ab}
Flavour típico	39 ^b	40 ^b	39 ^b	47 ^{ab}	62 ^a
90 días de maduración					
Apariencia					
Intensidad de Color Amarillo	52 ^a	50 ^a	53 ^a	25 ^b	30 ^b
Textura					
Fracturabilidad	37	37	42	38	41
Granulosidad	41	54	41	47	42
Arenosidad	38	37	27	42	51
Aroma y sabor					
Intensidad de sabor picante	24	32	44	41	54
Astringencia	47	47	36	48	47
Olor característico	47 ^{ab}	50 ^a	40 ^{ac}	32 ^{bc}	26 ^c
Intensidad de gusto salado	37 ^{bc}	33 ^c	34 ^c	54 ^a	52 ^{ab}
Flavour típico	35	33	34	44	49

^{a,b,c} Los promedios dentro de la misma fila con letras diferentes resultaron estadísticamente diferentes

($P \leq 0,05$)

A los 45 días de maduración, se observó diferencias significativas en el atributo de textura fracturabilidad, presentando la muestra T3 una intensidad inferior a las restantes muestras. En cuanto a los atributos de aroma y sabor, se encontraron diferencias significativas en los atributos olor característico, intensidad de gusto salado y flavour típico. Las muestras de queso que fueron sometidas a la mayor presión (T3 y T4), presentaron flavour típico y gusto salado más intensos, y un olor característico menos intenso que el resto de las muestras.

A los 90 días de maduración, no se observaron diferencias significativas en atributos de textura. Si se hallaron diferencias significativas en el atributo de apariencia intensidad de color amarillo, presentando las muestras T3 y T4 menores valores que el resto. Además, estas muestras mostraron intensidades significativamente más bajas para el atributo olor característico y más elevadas para gusto salado.

4. Discusión

En este capítulo, se estudió el efecto del tratamiento APH sobre propiedades texturales, parámetros cromáticos y características sensoriales del queso Reggianito y la evolución de las mismas a través el tiempo de maduración.

Para todos los quesos evaluados, se observó una disminución de la deformación y del esfuerzo a la fractura en función del tiempo de maduración. El esfuerzo a la fractura, puede ser utilizado como un índice de fracturabilidad (bajos valores indican una mayor fracturabilidad), y la deformación a la fractura describe la deformabilidad de los quesos (mayores valores numéricos indican que los quesos se pueden deformar más antes de que se produzca la fractura) (Juan y col., 2008). Por lo tanto, con el avance de la maduración, los quesos se volvieron más fracturables y menos deformables. Lo mismo ha sido verificado por otros investigadores en queso Cheddar (Fenelon y Guinee, 2000, Creamer y Olson, 1982, Rynne y col., 2008, Pollard y col., 2003, Wick y col., 2004). También en queso Reggianito se ha observado una disminución en la deformación a la fractura con el aumento del tiempo de maduración (Bertola y col., 1995). En otros estudios realizados en quesos

Port-Salut Argentino y en queso Tybo Argentino, estos investigadores demostraron que durante la maduración se observó una disminución en la fuerza necesaria para la ruptura de los quesos (Bertola y col., 1991; Bertola y col., 1992). Los autores atribuyeron esta disminución observada en ambos parámetros al incremento de la proteólisis durante la maduración, durante la cual se produce un aumento en las fracciones NS, y una reducción de los niveles de caseínas intactas con el avance de la maduración, lo que también ha sido verificado en el presente trabajo (capítulo 3).

En cuanto al efecto del tratamiento con APH aplicado en esta tesis, tuvo una influencia significativa en los dos parámetros medidos, que resultaron mayores valores para los quesos tratados a 400 MPa al inicio de la maduración. El efecto fue reversible, ya que a los otros tiempos de maduración, no se conservó este efecto del tratamiento. En quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min (Rynne y col., 2008), y en quesos de oveja tratados a 300 MPa durante 10 min (Juan y col., 2008), se observó el mismo incremento en éstos parámetros en los quesos tratados con APH. Sin embargo, sólo en los quesos Cheddar, el efecto se mantuvo a lo largo de toda la maduración. Los autores lo atribuyeron a que el tratamiento con APH también produjo un aumento del pH, lo que podría ocasionar un aumento en el calcio coloidal y una disminución del grado de hidratación de las proteínas, incrementando la agregación entre las caseínas. Esto haría que la matriz del queso se vuelva más elástica, y por lo tanto más resistente a la deformación. En nuestro estudio, como se presentó en el capítulo 3, no se evidenciaron modificaciones en el pH debido al tratamiento con APH. En los quesos de oveja, al igual que en nuestro estudio, el incremento en el esfuerzo a la fractura se verificó solamente al inicio de la maduración, igualándose al control a medida que el tiempo de maduración avanzó y haciéndose menor al control a los 90 días (Juan y col., 2008). Esto fue explicado por los investigadores como una consecuencia de la mayor proteólisis que se observó en los quesos tratados con APH a los 90 días de maduración con respecto a los quesos controles. En nuestro estudio, es posible que la mayor proteólisis hallada en los tratamientos T3 y T4 (capítulo 3) no fuera suficiente para provocar diferencias en estos parámetros a lo largo de la maduración atribuibles al tratamiento con APH. Los mayores valores en los parámetros esfuerzo a la fractura y deformación encontrados luego del tratamiento con APH en los quesos tratados a

400 MPa, puede que se deban a un cambio conformacional en ese momento puntual, y que luego durante la maduración ese cambio revierta, produciéndose una re-orientación y/o formación de nuevas uniones en los quesos presurizados, lo que resulta en similares valores de los parámetros de textura que en los quesos controles. En este sentido, algunos investigadores plantearon que durante el tratamiento con APH, se producen cambios en el equilibrio entre el calcio libre (soluble) y el calcio unido a las caseínas (coloidal). Cuando los quesos se someten a presión, las asociaciones calcio-caseína se rompen y el calcio migra a la fase soluble. Cuando se libera la presión, el equilibrio se restablece, pero las asociaciones entre las caseínas no resultan las mismas que inicialmente, aunque con el tiempo, las diferencias en textura entre los quesos tratados y no tratados disminuyen (Law y col., 1998, Saldo y col., 2000)

Con respecto al ensayo de TPA, el tiempo de maduración influyó significativamente en todos los parámetros de textura determinados mediante TPA. Se observó que con el avance de la maduración, los parámetros dureza y masticabilidad de los quesos aumentaron, mientras que los parámetros elasticidad y cohesividad disminuyeron. La disminución de la elasticidad con el tiempo de maduración también fue planteado por Messens y col. (2000) y Liu y col. (2011) en queso Gouda y por Garde y col. (2007) en queso de oveja La Serena. Sin embargo, en este último tipo de quesos, la dureza disminuyó con el tiempo de maduración (Garde y col., 2007), mientras que en el estudio de Liu y col. en queso Gouda, se observó un incremento de la misma en los primeros 20 días de maduración, y una posterior disminución con el avance de la misma. Un aumento en la dureza de los quesos con el avance de la maduración fue observado por Koca y col. (2011) en queso semiduro, registrándose además en esos quesos una disminución de la elasticidad, cohesividad y masticabilidad a medida que la maduración avanzó. En quesos Cheddar, se observó disminución de la dureza y de la elasticidad con el avance de la maduración (Pollard y col., 2003, Brickley y col., 2007). Los parámetros de textura están muy relacionados con la proteólisis de los quesos, por lo general, a medida que ésta progresa, los quesos se vuelven más blandos y menos elásticos, debido a la ruptura de la matriz de caseína, aunque como se mencionó en la introducción, algunos autores atribuyen los cambios de textura fundamentalmente a cambios en los equilibrios salinos del calcio en el queso que ocurren

simultáneamente con la proteólisis (Lucey y col., 2003; O'Mahony y col., 2005; Brickley y col., 2007). Además, las características composicionales de los quesos tienen gran influencia en los parámetros de textura. En este sentido, se ha visto que la grasa juega un papel muy importante: los quesos reducidos en materia grasa exhiben una estructura más compacta que los quesos con mayor contenido de grasa, debido a que los glóbulos grasos que se distribuyen entre la matriz proteica son menos y de menor tamaño. Dicha composición se asocia a quesos de mayor dureza y mayor elasticidad. Los quesos con mayor contenido de grasa y humedad, en los que las asociaciones entre proteínas se ven interrumpidas, son por el contrario, más blandos. Los quesos con alto contenido de proteínas y aquellos con baja humedad conllevan a un incremento en la dureza. A su vez, el aumento del contenido de grasa determina productos menos cohesivos, y la disminución, quesos más elásticos que resisten a la deformación y a la ruptura, y presentan mayor cohesividad (Gunasekaram y Ak, 2003).

Los resultados arrojados por el presente estudio sobre TPA de queso Reggiano, muestran que la dureza aumentó con el avance de la maduración, lo que probablemente obedeció a la disminución de la humedad. Este efecto ha sido mencionado previamente por Bértola y col (2005), quienes indicaron que la disminución del contenido de humedad en quesos de esta variedad produjo un incremento en algunos parámetros de textura que enmascararon la disminución de los mismos como consecuencia de la proteólisis. Por otra parte, en quesos tipo duros de pasta cocida, el desarrollo adecuado de textura es hacia una mayor dureza y friabilidad, así como formación de la grana, y no de ablandamiento.

En cuanto al efecto del tratamiento con APH, se observó que influyó en los parámetros elasticidad y cohesividad, presentando los quesos tratados a mayor presión, menores valores para estos parámetros a todos los tiempos de maduración analizados. Es probable que la disminución de la elasticidad y la cohesividad en los quesos tratados con APH a la mayor presión, se relacione con la mayor proteólisis evidenciada en estos quesos (capítulo 3). Similares resultados en la elasticidad fueron observados en quesos semiduros, cuando se aplicaron presiones de 200 y 400 MPa (Koca y col., 2011) y en quesos de cabra tratados a 50 MPa durante 3 días (Saldo y col., 2001). En quesos Cheddar a los cuales se le aplicó un tratamiento con APH de 345 y 483 MPa, durante 3 y 7 min, se describieron

mayores valores de cohesividad y elasticidad que en los quesos controles (Serrano y col., 2004). En este estudio, los cambios se atribuyeron principalmente a la modificación en la microestructura, ya que no se hallaron modificaciones en la proteólisis.

En cuanto a los parámetros cromáticos, también en este caso el tiempo de maduración fue una variable significativa. Se observó que a medida que transcurrió la maduración, L^* y a^* disminuyeron, mientras que b^* aumentó. Esto se traduciría en quesos menos luminosos, cuya coloración tiende al amarillo verdoso con el tiempo. Esta misma tendencia en los parámetros a^* y b^* fue observada en queso Cheddar (Rynne y col., 2008). En queso Emmental, se observó una evolución similar en los parámetros L^* y b^* , mientras que el parámetro a^* aumentó durante la maduración (Rohm y Jaron, 1996). Los cambios de color que se producen en el queso podrían deberse a un cambio en el grado de hidratación de las caseínas que se produce durante la maduración, lo cual altera las propiedades de dispersión de la luz (Paulson y col., 1998; Rudan y col., 1998). También la disminución del parámetro L^* se ha asociado con la concentración de los componentes del queso, debido a la reducción del contenido de agua (Rohm y Jaron, 1996). En el presente trabajo, el tratamiento con APH no modificó los parámetros cromáticos. Un efecto similar se observó en el parámetro L^* en quesos Cheddar y en queso semiduro madurado en salmuera, aunque en estos quesos, el parámetro a^* disminuyó y el parámetro b^* aumentó como consecuencia del tratamiento con APH (Rynne y col., 2008; Koca y col., 2011). Delgado y col (2013) no observaron efecto del tratamiento con APH (400 y 600 MPa durante 7 min) sobre el parámetro b^* de quesos de cabra Ibores elaborado con leche cruda. En este caso, el parámetro L^* aumentó y el parámetro a^* disminuyó en los quesos tratados con APH comparados con los controles. En ese trabajo, el tratamiento con APH se realizó en los quesos a los 60 días posteriores a la elaboración de los mismos. Del análisis de la literatura existente y de los resultados de nuestro trabajo, surge que el efecto del tratamiento con APH sobre el color depende de las características particulares de cada tipo de queso, y además del tiempo en el cual se aplica el tratamiento. Algunos autores atribuyeron los cambios observados en los parámetros cromáticos a modificaciones en la microestructura (Koca y col., 2011, Rynne y col., 2008, Saldo y col., 2002b).

Con respecto a la evaluación sensorial realizada en los quesos, se observó que a los 45 días de maduración, los quesos tratados a 400 MPa (T3 y T4) tuvieron mayor intensidad para los atributos gusto salado y flavour típico, y presentaron una menor intensidad para el atributo olor característico, en comparación con el control y con las muestras tratadas a 100 MPa. A los 90 días de maduración, se mantuvieron las diferencias encontradas a los 45 días en los quesos tratados a la mayor presión para el gusto salado y el olor característico. En un estudio previo, en el cual se evaluaron los atributos sensoriales que caracterizan a un queso Reggianito maduro, se encontró que el flavour genuino y gusto salado fueron los más importantes (Ceruti, 2014). Los quesos tratados a la mayor presión (400 MPa), alcanzan a los 45 días de maduración, una intensidad superior a los quesos controles y tratados a 100 MPa. En síntesis: los atributos que caracterizan a un queso maduro fueron más intensos en los quesos tratados a 400 MPa a los 45 días de maduración que en los controles y los tratados a 100 MPa.

El incremento en estos atributos con el tiempo de maduración, es consecuencia de diferentes eventos que ocurren durante la maduración (catabolismo del citrato y lactato, lipólisis, proteólisis y catabolismo de aminoácidos libres y ácidos grasos) que contribuyen al desarrollo del flavour en los quesos (McSweeney, 1997). En el presente estudio, si bien no se observaron cambios importantes en el perfil de aminoácidos libres y concentración de aminoácidos libres totales atribuidas al tratamiento (capítulo 3), se evidenció una proteólisis y peptidólisis mayor en los quesos tratados a 400 MPa. Además en los quesos tratados con la mayor presión (T3 y T4), aproximadamente a los 60 días de maduración, se obtuvieron niveles de aminoácidos libres totales similares a los exhibidos por las muestras controles a los 90 días de maduración. Los aminoácidos son los más importantes precursores de compuestos de aroma y flavour en quesos madurados sin presencia de hongos o flora superficial (Yvon, 2006).

Con respecto a la evolución del gusto salado, la difusión de NaCl en quesos salados por inmersión en salmuera es un proceso lento, en el cual el contenido de sal aumenta gradualmente en zonas internas y disminuye en las zonas cercanas a la superficie, hasta que se alcanza una concentración de sal uniforme (Sihufe y col., 2007). Es posible que el tratamiento con APH haya acelerado la difusión de sal, alcanzándose una distribución

uniforme en toda la masa del queso en menos tiempo. Este efecto ha sido previamente reportado en quesos de cabra y oveja salados por inmersión en salmuera tratados con APH (Saldo y col., 2002; Juan y col., 2008). En estos estudios, se determinó el contenido de sal en los quesos en la corteza y en el centro de los mismos, verificándose que aquellos tratados con APH, alcanzaron mayores valores en el centro del queso en menor tiempo. Estos autores atribuyen esto al hecho de que el tratamiento con APH produce una microestructura más continua en los quesos, lo que facilita la difusión de la sal desde la corteza hacia el centro.

De la literatura existente se entiende que el tratamiento con APH sobre las características sensoriales de otros tipos de quesos ha arrojado resultados variables. En queso Cheddar, se encontró que la intensidad de los atributos sensoriales de los quesos tratados con APH fue inferior comparados con los controles, lo que se relacionó con un retraso de la maduración a causa del tratamiento con APH (Rynne y col., 2008). En otro estudio en queso Cheddar reducido en grasa aplicando presiones superiores a 335 MPa (Ozturk y col., 2013a) y en quesos de oveja tratados a 300 y 400 MPa durante 10 min, se encontró un efecto negativo en las características sensoriales debido al tratamiento con APH (Garde y col., 2007; Juan y col., 2008). En este mismo tipo de queso, no se observaron efectos del tratamiento en la evaluación sensorial cuando se trabajaron con quesos con diferentes concentraciones de sal, a los cuales se le aplicó un tratamiento con APH de 405 MPa durante 3 min (Ozturk y col., 2013b). Similares resultados se observaron en quesos de cabra tratados a 400 o 600 MPa durante 7 min a los 60 días posteriores a la elaboración (Delgado y col., 2013). A su vez, en queso Brie a los que se les aplicó un tratamiento de 400 y 600 MPa 5 min a los 14 días posteriores a la elaboración (Calzada y col., 2014) y en una variedad de queso duro no cocido, cuando se aplicó un tratamiento con APH de 300 MPa durante 10 min (Yang y col., 2014) los cambios observados fueron positivos. Al igual que los resultados observados en las características texturales y de apariencia medidas por métodos instrumentales, los resultados disímiles parecen señalar que el efecto del tratamiento con APH sobre las características sensoriales depende del tipo de queso al cual se le aplica el tratamiento, de las condiciones aplicadas en el tratamiento

con APH (presión y tiempo de presurización) y del tiempo luego de la elaboración al que se aplica el tratamiento.

5. Conclusiones

Para todos los parámetros de textura evaluados, se verificó que el tiempo de maduración fue una variable significativa. En cuanto al efecto del tratamiento con APH, se observó que la aplicación de 400 MPa provocó cambios en algunos parámetros de textura solamente al inicio de la maduración. La disminución en la elasticidad y cohesividad de los quesos tratados a 400 MPa se mantuvo a lo largo de toda la maduración, lo que se relaciona con una aceleración en esos parámetros y resulta consistente con la mayor proteólisis evidenciada en los quesos tratados a 400 MPa.

El tratamiento con APH no produjo cambios en los parámetros cromáticos de los quesos, lo que se valoró como positivo, ya que la evolución de los parámetros cromáticos a lo largo de la maduración de los quesos tratados con APH fue igual a la de los quesos controles.

Los quesos tratados a mayor presión mostraron una aceleración en el desarrollo de las características sensoriales de un queso maduro.

CONCLUSIONES DEL TRABAJO DE TESIS

En este trabajo se estudió el efecto de dos estrategias tecnológicas dirigidas a acelerar la maduración de queso Reggianito. La primera de ellas se basó en una modificación sencilla de la tecnología tradicional, consistente en la reducción de la temperatura de cocción, en presencia de dos coagulantes diferentes. La segunda estrategia requirió una intervención tecnológica innovadora, la aplicación de la tecnología de altas presiones hidrostáticas (APH).

En primer lugar se obtuvieron modelos de queso miniatura, reproducibles y comparables a los sistemas reales. Las fuentes de variación provenientes de la elaboración fueron minimizados, y tanto el fermento, como el coagulante y el proceso se estandarizaron para poner de relevancia el efecto de los factores en estudio.

En la primera experiencia, se comprobó que la utilización de una temperatura de cocción levemente más baja que las usuales condujo a aceleración de la proteólisis del queso Reggianito, principalmente debido a un incremento en la actividad coagulante residual. Además, la actividad coagulante residual se incrementó durante la maduración, y mostró una tendencia a igualarse en todos los quesos a los 90 días, independientemente de la temperatura de cocción. Sin embargo, la actividad coagulante residual, al igual que la proteólisis, fue siempre mayor en los quesos que se trataron a la menor temperatura de cocción, para todos los índices de proteólisis evaluados. La actividad de la plasmina no se vio modificada a las dos temperaturas evaluadas.

En cuanto a la comparación entre la quimosina de camello y la bovina, los resultados del presente estudio confirmaron que la quimosina de camello es menos proteolítica que la bovina, aunque las diferencias encontradas no fueron tan marcadas como las informadas por otros autores. Los patrones de proteólisis fueron similares para ambas enzimas, especialmente los observados por electroforesis, pero en los quesos elaborados con quimosina bovina, la peptidólisis fue cuantitativamente más intensa a tiempos similares de maduración, para las dos temperaturas de cocción estudiadas. No se detectaron

evidencias de productos defectuosos o proteólisis alterada, como péptidos hidrofóbicos derivados de la caseína β , en ninguno de los quesos evaluados.

Se demostró que mediante una modificación sencilla en la tecnología de elaboración, fue posible incrementar la actividad de la enzima coagulante residual, con la consiguiente aceleración de la proteólisis y peptidólisis en los quesos.

En cuanto al efecto de la tecnología APH, se evidenció que la utilización de presiones de 400 MPa al inicio de la maduración permitió acelerar la maduración de los quesos Reggianito, lo cual fue demostrado por un incremento de la proteólisis y peptidólisis en los quesos. La aplicación de los tratamientos a la menor presión (100 MPa), independientemente del tiempo de mantenimiento seleccionado, no produjo cambios relevantes en ninguno de los parámetros evaluados en este trabajo de tesis.

La composición química y el pH de los quesos no mostraron cambios significativos iniciales ni a lo largo de la maduración, atribuibles al tratamiento con APH. Los recuentos iniciales de lactobacilos termófilos, en cambio, fueron afectados por los tratamientos más intensos. Se observó una disminución de los mismos, lo cual se correlaciona con el incremento en la proteólisis observada en los quesos tratados a 400 MPa.

La actividad de la plasmina se incrementó en las muestras tratadas a la mayor presión (400 MPa), mientras que la actividad residual del coagulante no fue afectada por el tratamiento con APH a ningún nivel de presión.

El tratamiento a 400 MPa durante 10 min favoreció un incremento general de la proteólisis y peptidólisis, evidenciado por un aumento de las fracciones NS a lo largo de toda la maduración, por un aumento de la velocidad de hidrólisis de las caseínas, por cambios cuantitativos en los péptidos solubles y por el incremento de los niveles de aminoácidos libres totales. El tratamiento a 400 MPa durante 10 min condujo en sólo 60

días de maduración a índices de proteólisis similares a los del queso control de 90 días de maduración.

Durante la maduración de los quesos, además de los cambios bioquímicos, y en gran medida como consecuencia de ellos, se producen cambios en la textura, el color, y atributos sensoriales de los quesos, características que en definitiva son las que percibe el consumidor y determinan la calidad del producto. Por esta razón, se estudió también el efecto de la tecnología APH sobre esas características. En cuanto a textura, cuando se aplicó una presión de 400 MPa se observó un efecto a lo largo de la maduración sobre la elasticidad y cohesividad de los quesos, lo que posiblemente se relaciona con la mayor proteólisis presentada en esos quesos. Los parámetros cromáticos no fueron afectados por el tratamiento con APH, lo que puede considerarse como positivo, ya que los quesos tratados no se diferenciaron del control. En cuanto al análisis sensorial, dos atributos que se consideran indicadores de la maduración de queso Reggianito, como el gusto salado y el flavour genuino, presentaron a los 45 días de maduración una intensidad mayor en los quesos tratados a 400 MPa.

El presente trabajo de tesis aporta información sobre dos estrategias diferentes para acelerar la maduración del Queso Reggianito. Asimismo, es el primer estudio que investiga el uso de quimosina de camello en queso Reggianito, y en quesos duros de pasta cocida tipo italianos en general. También constituye la primera investigación sobre tecnología APH en esta variedad de quesos.

En las dos estrategias evaluadas, se produjo un incremento en la velocidad de maduración relacionado con el incremento de la proteólisis y el incremento de la actividad de enzimas habitualmente presentes en la matriz alimentaria, como el coagulante y la plasmina. Asimismo, se obtuvieron productos de buena calidad global y no se encontraron defectos.

La aplicación de las tecnologías propuestas debe evaluarse en el contexto de los costos de inversión y operativos de las mismas, tanto actuales como futuros, y de la viabilidad de su implementación, profundizando en la evaluación de su impacto en el perfil sensorial de los productos.

BIBLIOGRAFÍA

- Amárita, F.; de la Plaza, M.; Fernandez de Palencia, P.; Requena, T. y Pelaez, C. (2006). Cooperation between wild lactococcal strains for cheese aroma formation. *Food Chem.* 94: 240-246.
- Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50: 45-55.
- Anese, M.; Nicoli, M. C.; Dall'aglio, G. y Lerici, C. R. (1995) Effect of high-pressure treatments on peroxidase and polyphenoloxidase activities. *J. Food Biochem.* 18: 285-293.
- ANMAT (2014). Código Alimentario Argentino. Cap. VIII: Alimentos lácteos. En vigencia. <http://www.anmat.gov.ar>.
- Aparo, L.; Candiotti, M. C.; Ceresoli, A. y Hynes, E. (2004). Determinación de la actividad de la enzima coagulante residual en quesos. *Rev. Argent. Lactol.* 23: 87-98.
- Aparo, L. 2005. Influencia de la actividad residual de enzima coagulante sobre la hidrólisis de la caseína α_{s1} en quesos duros. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Ardö, Y. (1999). Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions. En: *Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation Part 2.* (Ed. Ardö, Y). *Bulletin. IDF.* N° 337. p 4-9.
- Atiles, M. W.; Dudley, E. G. y Steele, J. L. (2000). Gene cloning, sequencing, and inactivation of the branched-chain aminotransferase of *Lactococcus lactis* LM0230. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2325-2329.
- Audero G.; Costabel L.; Campos S.; Cuatrin A. y Wenteker C. (2014) Leche naturalmente enriquecida con ácidos grasos insaturados: influencia en la composición físico química de los quesos. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Noviembre de 2014. ISBN en trámite.
- Ávila, M.; Garde, S.; Gaya, P.; Medina, M. y Nuñez, M. (2006) Effect of high- pressure treatment and a bacteriocin-producing lactic culture on the proteolysis, texture, and taste of Hispánico cheese. *J. Dairy Sci.* 89: 2882-2893.
- Azarnia, S. M.; Lee, B.; St-Gelais, D.; Kilcawley K.; y Noroozi, E. (2011) Effect of free

- and encapsulated recombinant aminopeptidase on proteolytic indices and sensory characteristics of Cheddar cheese. *LWT-Food Sci. Technol.* 44: 570-575.
- Balasubramaniam, V. M.; Farkas, D. y Turek, E. (2008) Preserving Foods through High-Pressure Processing. *Food Technol.* 62: 32-38.
- Balny, C. y Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews Int.* 9: 611-628.
- Bansal, N.; Drake, M. A.; Piraino, P.; Broe, M. L.; Harboe, M.; Fox, P. F. y McSweeney, P. H. L. (2009a). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 19: 510-517.
- Bansal, N.; Fox, P. y McSweeney, P. H. L. (2009b). Comparison of the level of residual coagulant activity in different cheese varieties. *J. Dairy Res.* 76: 290-293.
- Bansal, N.; Fox, P., y McSweeney P.H.L. (2007). Factors affecting the retention of rennet in cheeses curd. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9219-9225.
- Barrett, F. M.; Kelly, A. L.; McSweeney, P. L. H. y Fox, P.F. (1999) Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 9: 421-427.
- Bastian, E. y Brown, R. J. (1996) Plasmin in milk and dairy products: An update. *Int. Dairy J.* 6: 435-457.
- Bastian, E.; Lo, C. y David, K. (1997) Plasminogen activation in cheese milk: influence on Swiss Cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 80: 245-251.
- Bergamini, C. V.; Hynes, E. R. y Zalazar, C. A. (2006) Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi hard-cheese. *Int. Dairy J.* 16: 856-866.
- Bergamini, C. V.; Peralta, G. H.; Milesi, M. M. y Hynes, E. R. (2013) Growth, survival, and peptidolytic activity of *Lactobacillus plantarum* I91 in a hard-cheese model. *J. Dairy. Sci.* 96: 5465-5476.
- Beresford, T. P. (2003). Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality, En: *Dairy processing – Improving quality*, (Ed. Smit G.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. pág. 448–469.
- Beresford, T. P.; Fitzsimons, N. A.; Brennan, N. L. y Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11: 259-274.

- Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). An Update on high Hydrostatic Pressure, from the Laboratory to Industrial Applications. *Food Eng. Rev.* 3: 44-61
- Bernal, S.; Palma, S.; Hynes, E. y Perotti, M. C. (2001) Determinación de fracciones nitrogenadas para el seguimiento de la maduración de quesos. *Rev. Argent. Lactol.* 20: 9-18.
- Bertola, N. C.; Bevilacqua, A. E. y Zaritzky, N. E. (1995) Rheological Behaviour of Reggianito Argentino Cheese Packaged in Plastic Film During Ripening. *Lebensm. Wiss. Technil (LWT)* 28: 610-615.
- Bertola, N. C.; Bevilacqua, A. E. y Zaritzky, N.E. (1991) Changes in rheological and viscoelastic properties and protein breakdown during the ripening of Port Salut Argentino cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.* 26: 467-478.
- Bertola, N. C.; Bevilacqua, A. E. y Zaritzky, N. E. (1992). Proteolytic and rheological evaluation of maturation of Tybo Argentino cheese. *J. Dairy Sci.* 75: 3273-3281.
- Blakesley, R. W. y Boezi, J. A. (1977) A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 82: 580-581.
- Boscaini, E.; van Ruth, S.; Biasioli, F.; Gasperi, F. y Märk, T. D. (2003). Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) and Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry (PTR-MS) Analysis of the Flavor Profile of Grana Padano, Parmigiano Reggiano, and Grana Trentino Cheeses. *J. Agricul. Food Chem.* 51: 1782-1790.
- Botazzi, R. L.; Scolari, G. L.; Cappa, F.; Battistotti, B.; Bosi, F. y Brambilla, E. (1992) Batteri lattici per la produzione di formaggio Grana. III. Velocità di acidificazione e comparsa di gonfiore. *Sci. Tec. Lat. Cas.* 43:71-93.
- Børsting, M. W.; Qvist, K. B.; Rasmussen, M.; Vindeløv, J.; Vogensen, F. K. y Ardö, Y. (2012) Impact of selected coagulants and starters on primary proteolysis and amino acid release related to bitterness and structure of reduced-fat Cheddar cheese. *Dairy Sci. Technol.* 92: 593-612.
- Bradley, R. L.; Arnold, E.; Barbano, D. M.; Semerad, R. G.; Smith, D.E. y Vines, B. K. (1993). Chemical and physical methods. En: *Standard methods for the*

- examination of dairy product. (Ed.: Marshall, R.). American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos, pág. 433-531.
- Brickley, C. A.; Auty, M. A. E.; Piraino, P. y McSweeney, P. L. H. (2007) The Effect of Natural Cheddar Cheese Ripening on the Functional and Textural Properties of the Processed Cheese Manufactures Therefrom. *J. Food Sci.* 72: 483-490.
- Bude Ugarte, M.; Guglielmotti, D.; Giraffa, G.; Reinheimer, J. y Hynes, E. (2006). Nonstarter Lactobacilli Isolated from Soft and Semihard Argentinean Cheeses: Genetic Characterization and Resistance to Biological Barriers. *J. Food Prot.* 69: 2983-2991.
- Buffa, M.; Guamis, B.; Royo, C. y Trujillo, A. J. (2001a) Microbial changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure treated milk. *Food Microbiol.* 18: 45-51.
- Buffa, M.; Trujillo, A. J. y Guamis, B. (2001b). Rennet coagulation properties of raw, pasteurized and high pressure treated goat milk. *Milchwissenschaft*, 56: 243-246.
- Buffa, M.; Trujillo, A. J. y Guamis, B. (2001c). Changes in textural, microstructure, and colour characteristics during ripening of cheese made from raw, pasteurised or high-pressure-treated goat's milk. *Int. Dairy J.* 11: 927-934.
- Buffa, M.; Guamis, B.; Pavia, M. y Trujillo, A. J. (2001d) Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goat's milk. *Int. Dairy J.* 11: 175-179.
- Burns, P.; Cuffia, F.; Milesi, M.; Vinderola, G.; Meinardi, C.; Sabbag, N. y Hynes, E. (2012). Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food Microbiol.* 30: 45-50.
- Calvo, C. y Durán, L. (1997) Propiedades físicas II. Óptica y Color. En: *Temas en Tecnología de Alimentos*. (Ed. Aguilera, J. M.). D. F., México. pág. 261-288.
- Calzada J.; del Olmo, A.; Picon, A.; Gaya, P. y Nuñez, M. (2014) Effect of high-pressure-processing on the microbiology, proteolysis, texture and flavour of Brie cheese during cheese ripening and refrigerated storage. *Int. Dairy J.* 37: 64-73.
- Candioti, M. C.; Hynes, E. R.; Quiberoni, A.; Palma, S. B.; Sabbag, N. y Zalazar, C. A. (2002). Reggianito Argentino cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains

- isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *Int. Dairy J.* 12: 923–931.
- Cano, M. P.; Hernandez, A. y Ancos, B. D. (1997) High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *J. Food Sci.* 62: 85-88.
- Capellas, M.; Mor-Mur, M.; Gervilla, R.; Yuste, J. y Guamis, B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goat's milk fresh cheese. *Food Microbiol.* 17: 633-641.
- Capellas, M.; Mor-Mur, M.; Sendra, E.; Pla, R. y Guamis, B. (1996). Populations of aerobics mesophils and inoculated *E. coli* during storage of fresh goat's milk cheese treated with high pressured. *J. Food Protec.* 59: 582-587.
- Capellas, M.; Mor-Mur, M.; Sendra, M. y Guamis, B. (2001) Effect of high –pressure processing on physico-quemical characteristics of fresh goat's milk cheese (Mató). *Int. Dairy J.* 11: 165-173.
- Carles, C. y Ribadeau Dumas B. (1985). Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine α s1 casein. Comparison of the behaviour of this substrate with that of β and α s-casein. *FEBS Letters.* 185: 282–286.
- Castañeda R.; Borbonet S.; Ibarra A.; Ipar J. L.; Vásquez A. M.; Brito Contreras C.; Purtschert N. y Alfonso R. (2010) Quesos de la Argentina. En: Quesos de América del Sur. Editorial Albatros, Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-950-24-1312-9. pág. 30-43.
- Ceruti, R. J ; Zorrilla, S. E. ; Sabbag, N. G. ; Costa, S. C. y Sihufe, G. A. (2014) Effect of increased initial ripening temperature on the sensory characteristics of Reggianito cheese. *Int. J. Dairy Technol* 67: 1-8.
- Ceruti, R. J ; Zorrilla, S. E. y Sihufe, G. A. (2012). The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggianito cheese. *Food Res. Int.* 48: 34-40.
- Chamorro M. y Losada, M. (2002). Caracteres Organolépticos del queso (Cap.III) En : El análisis sensorial de los quesos. Tecnología de los alimentos.1 era edición. (A.

- Madrid Vicente Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa), Madrid, España, pág. 67-96.
- Chapot-Chartier, M. P.; Deniel, C.; Rousseau, M.; Vassal, L. y Gripon, J. C. (1994). Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 4:251-269.
- Chaves, A. C. S. D.; Fernandez, M.; Lerayer, A. L. S.; Mierau, I.; Kleerebezem, M. y Hugenholtz J. (2002). Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5656-5662.
- Cheftel, J. C. (1995) High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol.* 1: 75-90.
- Cheftel, J. C. y Culioli, J. 1997. Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Sci.* 46: 211-236.
- Chen, Y. S.; Christensen, J. E.; Broadbent, J. R. y Steele, J. L. (2003). Identification and Characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an Endopeptidase with Post-Proline Specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1276-1282.
- Chianese, L.; Caira, S.; Ferranti, P.; Laezza, P.; Malorni, A.; Mucchetti, G.; Garro, G. y Addeo, F. (1997). The oligopeptides of sweet and acid cheese whey. *Lait* 77: 699-715.
- Cogan T. M. y Beresford T.P. (2002). Microbiology of Hard Cheese. En: *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products.* (Ed Robinso, R. K.). New York, NY: John Wiley & Sons Inc. pág. 516-560.
- Collins, Y. F.; McSweeney, P. L. H. y Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. In. *Dairy J.* 13: 841-866.
- Considine, T.; Patel, H. A.; Anema, S. G.; Singh, H. y Creamer, L. K. (2007). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* 8: 1-23.
- Coppola R.; Nanni M.; Iorizzo M.; Sorrentino A.; Sorrentino E.; Chiavari C. y Grazia L. (2000) Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Lait* 80: 479-490.

- Corsetti, A.; Gobetti, M.; Smacchi, E.; DeAngelis, M. y Rossi, J. (1998) Accelerated ripening of Pecorino Umbro cheese. *J. Dairy Res.* 65: 631-642.
- Costabel, L. M.; Audero, G. M.; Paez, R. B.; Cuatrin, A. L. (2013) Evaluación fisicoquímica y sensorial de quesos Reggianito elaborados utilizando suero fermento y fermento directo. *IVX Congreso Cytal*. Rosario, octubre de 2013. Copia electrónica ISBN: 978-987-22165-5-9.
- Costabel, L. M.; Páez, R.B.; Cuatrín, A.L.; Taverna M.A. (2008). La aptitud a la coagulación de la leche: una herramienta para la obtención de quesos de calidad. *IV Congreso Internacional de Marketing y Tecnología de Quesos*. Bs As, 25 al 27 de junio de 2008.
- Creamer, L. K y Olson, N. F. (1982) Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *J. Food Sci.* 47: 632-636
- Crow, V. L.; Coolbear, T.; Gopal, P. K.; Martley, F. G.; McKay, L. L. y Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *Int. Dairy J.* 5: 855-875.
- Dalgleish, D. G. y Corredig, M. (2012) The Structure of the casein Micelle of Milk and Its Changes during Processing. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 3: 449–67.
- Dandoy, D.; Fremaux, C.; de Frahan, M. H; Horvath, Boyaval, P.; Hols, P. y Fontaine, L. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase Protein *Microb. cell Fact.* 10: 1-9.
- De Angelis, M.; Corsetti, A.; Tosti, N.; Rossi, J.; Corbo, M. R. y Gobetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2011-2020.
- De Jong, L. (1976) Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1. Proteolysis and consistency of NoordhollandseMeshanger' cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 30 : 242-253

- Delacroix-Buchet, A. y Fournier, S. (1992). Protéolyse et texture des fromages à pâte cuite pressée. II. Influence de la chymosine et des conditions de fabrication. *Lait* 72: 53-72.
- Delahunty, C. M. y Drake, M. A. (2004). Sensory Character of Cheese and its Evaluation. En *Cheese- Chemistry, Physics and Microbiology*. Volumen 1 General Aspects. Third edition (Eds.: Fox, P. F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M. y Guinee, T. P.). Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido. pág. 455-487.
- Delgado, F. J. ; González-Crespo, J. ; Cava, R. y Ramírez, R. (2011) Changes in the volatile profile of a raw goat milk cheese treated by hydrostatic high pressure at different stages of maturation. *Int. Dairy J.* 21: 135-141.
- Delgado, F. J. ; Delgado, J. ; González-Crespo, J. ; Cava, R. y Ramírez, R. (2013) High-pressure processing of a raw milk cheese improved its food safety maintaining the sensory quality. *Food Sci.Technol. Int.* 19: 493–501.
- Descalzo, A.M.; Rossetti, L.; Páez, R.; Grigioni, G.; García P.T.; Costabel, L.; Negri, L.; Antonacci, L.; Salado, E.; Bretschneider, G.; Gagliostro, G.; Comerón, E.; Taverna, M.A. (2012). Differential characteristics of milk produced in grazing systems and their impact on dairy products. En: *Milk Production / Book 2*. ISBN 979-953-307-695-8
- Deutsch, S. -M. Ferain, T.; Delcour, J. y Lortal, S. (2002). Lysis of lysogenic strains of *Lactobacillus helveticus* in Swiss cheeses and first evidence of concomitant *Streptococcus thermophilus* lysis. *Int. Dairy J.* 12: 591-600.
- Devi, A. F.; Buckow, R.; Hemar, Y. y Kasapis, S. (2013) Structuring dairy system through high pressure processing. *J. Food Eng.* 114: 106-122.
- Di Cagno, R. y Gobetti, M. (2011) Hard Italian Cheeses. En: *Encyclopedia of Dairy Science* (Eds.: Roginski, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido. pág. 728-736.
- Di Cagno, R.; Quinto, M.; Corsetti, A.; Minervini, F. y Gobetti, M. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *Int. Dairy J.* 16:119-130.

- Dolci, P.; Alessandria, V.; Rantsiou, K.; Rolle, L.; Zeppa, G. y Cocolin, L. (2008). Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *Int. J. Food Microbiol.* 122:302–311.
- Eisenmenger, M. J. y Reyes De Corcuera, J. I. (2009) High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme Microbial Technol.* 45: 331-347
- El Soda, M. y Awad, S. (2003) Accelerated cheese ripening. En *Encyclopedia of Dairy Science*. Volume One. (Eds: Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; McSweeney, P.L.H.) Academic Press, Kidlington, Reino Unido. pág. 799-805
- El Soda, M.; Madkor, S. A. y Tong, P. S. (2000). Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: comparison between attenuated and not attenuated lactobacilli. *Milchwissenschaft* 55: 260-293.
- Engels, W.; Hazelwood, L. y Düsterhöft, E. M. (2012) Innovations in cheese. Efficient and versatile model systems. The MicroCheese and ScreenCheese models. *International - Dairy.com*, pág. 26-29. www.nizo.com/files/596
- Evert-Arriagada, K.; Hernández-Herrero, M. M.; Gallardo-Chacón, J. J.; Juan, B. y Trujillo, A.J. (2013). Effect of High Pressure Processing on Volatile Compounds Profile of a Starter-Free Fresh Cheese. *Innov. Food Sci. Emerging Technol.* 19: 73-78.
- Farkye, N. Y. y Fox, P. F. (1991). Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in Cheddar cheese: Cheese containing plasmin inhibitor, 6-aminohexanoic acid. *J. Agric. Food Sci.* 39:786–788.
- Farkye, N. y Fox, P. (1992) Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *J. Dairy Res.* 59: 209-216.
- Fenelon, M. A. y Guinee, T. P. (2000) Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *Inter. Dairy J.* 10: 151-158.
- Fernández, V. (2004) Determinación del nivel de actividad de plasmina en quesos típicos argentinos. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72: 1379-1400

- Fox, P. F. (2003). Biochemistry of cheese ripening. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Vol. 1. (Eds. Roginsky, H.; Fuquay, J y Fox P.) Academic Press, Kidlington, Reino Unido. pág. 320-326
- Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M. y McSweeney, P. L. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. (Ed. Fox, P. F.) Aspen Publishers, Maryland, USA.
- Fox, P. F.; Law, J.; McSweeney, P. L. H y Wallace, J. (1993) Biochemistry of cheese ripening. En *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. (Ed. Fox, P. F.: Chapman & Hall (Pub.), Londres, Reino Unido. pág. 389-438.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. H. L. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*; Cap. 10: Chemistry and biochemistry of cheese and fermented milks. Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido, pág.379-436.
- Fox, P. F. y McSweeney, P. L. (2004). Cheese: An overview. En *Cheese- Chemistry, Physics and Microbiology*. Volumen 1 General Aspects. Third edition (Eds.: Fox, P. F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M. y Guinee, T. P.). Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido, pág. 1-19.
- Fox, P. F.; Wallace, J. M.; Morgan, S.; Lynch, C. M.; Niland, E. J. y Tobin, J. (1996). Acceleration of cheese ripening. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 271-297.
- Gaiaschi, A.; Beretta, B.; Polesi, C.; Conti, A.; Giuffrida, M. G.; Galli, C. L. y Restani P. (2000). Proteolysis of α -s casein as a marker of Grana Padano cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 83: 2733-2739.
- Galazka, V. B.; Dickinson, E. y Ledward, D. A. (2000) Influence of high pressure processing on protein solutions and emulsions. *Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.* 5: 182-187.
- Gallino, R. (1994). Queso Reggianito Argentino: Tecnología de Fabricación. En *Tecnología de los Productos Lácteos*. Diagramma S.A. Santa Fe, Argentina. pág. 244-287.
- Gallot-Lavallée, T. (1998) Effectiveness of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in raw milk goat cheese. *Sci. des Aliments*, 18: 647-655.

- Garcia-Risco, M. R.; Olano A.; Ramos, M. y López-Fandiño, R. (2000) Micellar changes induced by high pressure. Influence in the proteolytic activity and organoleptic properties of milk. *J. Dairy Sci.* 83: 2184-2189.
- Garcia-Risco, M. R.; Recio, I.; Molina, E. y López-Fandiño, R. (2003) Plasmin activity in pressurized milk. *J. Dairy Sci.* 86: 728-734.
- Garde, S.; Arqués, J. L.; Gaya, P.; Medina, M. y Nuñez, M. (2007) Effect of high- pressure treatments on proteolysis and texture of ewes' raw milk La Serena cheese. *Int. Dairy J.* 17: 1424-1433.
- Garriga, M.; Grèbol, N.; Aymerich, M. T.; Monfort, J. M. y Hugas, M. (2004) Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5: 451-457.
- Gatti, M.; Bottari, B.; Lazzi, C.; Neviani, E. y Mucchetti, G. (2014). Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *J. Dairy Sci.* 97: 573-591.
- Gervilla, R.; Felipe, X.; Ferragut, V. y Guamis, B. (1997) Effect of high hydrostatic pressure on *Listeria innocua* 910 CECT inoculated into ewe's milk. *J. Food Prot.* 60: 33-37.
- Gervilla, R.; Ferragut, V. y Guamis, B. (2001) High hydrostatic pressure effects on colour and milk- fat globule of ewe's milk. *J. Food Sci.* 66: 880-885.
- Gilbert, C.; Blanc, B.; Frot-Coutaz, J.; Portalier, R. y Atlan, D. (1997). Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *J. Dairy Res.* 64, 561–571.
- Giraffa, G.; Mucchetti, F.; Addeo, F. y Neviani, E. (1997) Evolution of lactic acid microflora during Grana cheesemaking and ripening. *Microbiol. Aliments Nutr.* 15 :115-122.
- Gobetti M. y DiCagno, R. (2003). Hard Italian Cheeses ripening. En *Encyclopedia of Dairy Science Vol 1.* (Eds. Roginsky, H.; Fuquay, J. y Fox P.) Academic Press, Reino Unido. pág. 378-385.
- Gomes, M. R. A y Ledward, D. A. (1996). Effect of high-pressure treatments on the activity of some polyphenoloxidases. *Food Chem.* 56:1-5.

- Gómez de Cadiñanos, L. P.; García-Cayueta, T.; Yvon, M.; Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C. y Requena, T. (2013). Inactivation of the panE Gene in *Lactococcus lactis* enhances formation of cheese aroma compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 3503-3506.
- Goodner, J. K.; Braddock, R. J. y Parish, M. (1998) Inactivation of pectinesterase in orange and grapefruit juices by high pressure. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1997-2000.
- Govindasamy-Lucey, S.; Lu, Y.; Jaeggi, J. J.; Johnson M. E. y Lucey, J. A. (2010). Impact of camel chymosin on the texture and sensory properties of low-fat cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 65: 139–142.
- Grappin, R.; Rank, T. C. y Olson, N. F. (1985). Primary proteolysis of cheese during ripening. A review. *J. Dairy Sci.* 68: 531-540.
- Gripon, J. C.; Desmazeaud, M. J.; Le Bars, D. y Bergère, J. L. (1975). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la pression commerciale. *Lait* 55 : 502-516.
- Griffiths, M. W. y Tellez, A. M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology* 4: 1-9.
- Grufferty, M. y Fox, P. (1988) Milk alkaline protease. *J. Dairy Res.* 55: 609-630.
- Guamis, B.; Pla, R.; Trujillo, A.; Capellas, M.; Gervilla, R.; Saldo, J. y Yuste, J. (2005) High Pressure Processing of Milk and Dairy and Egg products. En: *Novel Food Processing Technologies*. (Eds. G.V. Barbosa-Cánovas, M.S. Tapia y M.P. Cano) CRC Press, Florida, Estados Unidos. pág. 343-359.
- Guinee, T.P. (2011) Cheese Rheology. En: *Encyclopedia of Dairy sciences*. Vol. 1. (Eds. Fuquay J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.H.L). Academic Press, Elsevier Science, Oxford, Inglaterra. pág. 685-697.
- Gunasekaram, S. y Ak, M. M. (2003) *Cheese Rheology and Texture*. Editorial: CRC Press LLC, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.
- Hassan, A.; Johnson, M. E. y Lucey, J. A. (2004). Changes in the proportions of soluble and insoluble calcium during the ripening of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 87:854–862.

- Hayes, M. G. ; Hurley, M. J. ; Magboul, A. A. ; Larsen, L. B. ; Heegard, C. W. ; Oliveira, J. C. ; McSweeney, P. L. H. y Kelly, A. L. (2001) Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *J. Dairy Res.* 68 : 267-276.
- Hayes, M. G. ; Oliveira, J. C. ; McSweeney, P. L. H. y Kelly, A. L. (2002). Thermal inactivation of chymosin during cheese manufacture. *Journal of Dairy Science.* 69: 269-279
- Helinck, S.; Le Bars, D.; Moreau, D. y Yvon, M. (2004). Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3855-3861.
- Heremans, K. (1989). From living systems to biomolecules. En: *High Pressure and Biotechnology* (Eds. Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P.) Colloque INSERM, Vol. 224, John Libbey Eurotext. Paris. pág. 37-44
- Hernando Sáiz A.; Tárrago Mingo S.; Purroy Balda F. y Tonello Samson C. (2008) Advances in design for successful commercial high pressure food processing. *Food Aust.* 60: 154-156.
- Hite, B. H. (1899). The effect of high pressure in the preservation of milk. *Bulletin of the West Virginia Agricultural Experimental Station*, 58: 15-35.
- Høier, E.; Janzen, T.; Rattray, F.; Sørensen, K.; Børsting, M. W.; Brockmann, E. y Johansen, E. (2010). The Production, Application and Action of Lactic Cheese Starter Cultures. En: *Technology of Cheesemaking.* (Eds Law, B. y Tamime, A. Y.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, Estados Unidos. pág.166-189.
- Holmes, D. G.; Duersch, J. W.; y Ernstrom C. A. (1977). Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheese making. *J. Dairy Sci.* 60: 862-869.
- Hong, G. P.; Park, S. H.; Kim, J. Y. y Min, S. G. (2006) The Effects of High Pressure and Various Binders on the Physico-chemical Properties of Restructured Pork Meat. *Asian-australan J. Animal Sci.* 19: 1484-1489.

- Hough, G.; Martinez, E.; Barbieri, T.; Contarini, A. y Vega, M. J. (1994) Sensory profiling during ripening of Reggianito grating cheese, using both traditional ripening and in plastic wrapping. *Food Qual. Pref.* 5: 271-280.
- Hugas, M., Garriga, M., y Monfort, J. M. (2002) New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Sci.* 62: 359-371.
- Hunter, E. A.; McNulty, D. A. y Banks, J. M. (1997). Statistical design and analysis of experiments in cheese technology. *Lebenson.Wiss. Technol.* 30:121-128.
- Huppertz, T.; Fox, P. F. y Kelly, A. L. (2004b) Susceptibility of plasmin and chymosin in Cheddar cheese to inactivation by high pressure. *J. Dairy Res.* 71: 496-499.
- Huppertz, T.; Fox, P. F. y Kelly, A. L. (2004a) Effect of high pressure treatment on yield of cheese curd from bovine milk. *Innov.Food Sci. Emerg. Technol.* 5: 1-8.
- Huppertz, T.; Fox, P. F.; de Kruif, K. G y Kelly, A. L. (2006a). High pressure-induced changes in bovine milk proteins: a review. *Biochim. Biophys. Acta*, 1764: 593-598
- Huppertz, T.; Hinz, K.; Zobrist, M. R.; Uniacke, T.; Kelly, A. L. y Fox, P. F. (2005) Effects of high pressure treatment on the rennet coagulation and cheese-making properties of heated milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6: 279-285.
- Huppertz, T.; Kelly, A. L. y Fox, P. F. (2002).Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *Int. Dairy J.* 12: 561–572.
- Huppertz, T.; Kelly, A. L. y de Kruif, C.G. (2007) Disruption and reassociation of casein micelles during high pressure treatment: influence of whey protein. *J. Dairy Res.* 74: 194-197.
- Huppertz, T.; Smiddy, M.; Upadhyay, V. K. y Kelly, A. L. (2006b). High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 59: 58-66.
- Hurley, M. J.; O`Driscoll, B. M.; Kelly, A. L. y McSweeney, P. H. L. (1999) Novel assay for the determination of residual coagulant activity in cheese. *Int. Dairy J.* 9: 553-558.
- Hynes, E. R.; Aparo, L. y Candiotti, M. C. (2004a). Influence of residual milk-clotting enzyme on α -s1 casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino cheese *J..Dairy Sci.* 87: 565-573.

- Hynes, E. R.; Bergamini, C. V.; Suárez, V. B. y Zalazar, C. A. (2003). Proteolysis on Reggianito Argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* 86: 3831–3840.
- Hynes, E.; Candioti, M. C.; Meinardi, C.; Sabbag, N.; Cattaneo, T. y Zalazar, C. A. (2001) Influence of milk clotting enzyme concentration in the α s1 hydrolysis during soft cheeses ripening. *J. Dairy Sci.* 84: 1335-1340.
- Hynes, E.; Candioti, M.; Zalazar, C.; McSweeney P. L. H. (2004b) Rennet activity and Proteolysis in Reggianito Argentino cooked cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 59, 3, 209-213.
- Hynes, E.; Ogier, J. C. y Delacroix-Buchet, A. (2000). Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.*10:733-737.
- Hynes, E.; Delacroix-Buchet, A.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (1999). Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 54: 24–27.
- Hynes, E.; Zalazar, C.A. y McSweeney, P. L. H. (2005). Influence of defined and natural ‘wild’ thermophilic cultures on proteolysis in Reggianito Argentino hard cooked cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 60: 55-59.
- International Dairy Federation (IDF). (2004). Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content (reference methods). N° 4: A. Bruselas, Bélgica.
- International Dairy Federation (IDF). (1993). Milk. Determinations of nitrogen content. N° 20: B. Bruselas, Bélgica.
- International Dairy Federation (IDF). (1995). Milk and milk products. Guidance on sampling. N° 50: C. Bruselas, Bélgica.
- International Dairy Federation (IDF). (1997). Milk and milk products. Determination of fat content (general guidance on the use of butyrometric methods). N° 152: A. Bruselas, Bélgica.
- Irigoyen, A.; Ortigosa, M.; Juansaras, I.; Oneca, M. y Torre, P. (2007). Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewes-milk cheese. *Food Chemistry* 100: 71-80.

- Ismail, B. y Nielsen, S.S. (2010). Plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *J. Dairy Sci.* 93: 4999-5009
- ISO/TS 17996 IDF/RM 205 (2006). Cheese- Determination of rheological properties by uniaxial compression at constant displacement rate. Bruselas, Bélgica
- IRAM 14023-2 (2008) Quesos y quesos procesados. Determinación del contenido de cloruros. Parte 2 – Método por valoración de Volhard. Buenos Aires, Argentina. 10 pág.
- IRAM 20002 (1985). Análisis Sensorial. Guía General para la Metodología. Buenos Aires, Argentina. 24 pág.
- Iwaczak, M. y Winiewska, K. (2005) Effect of high pressure on the process of Edam cheese proteolysis. *High Pressure Res.* 25: 43-50.
- Jensen L. J.; Mølgaard A.; Poulsen, J. C. N.; Harboe, M. K.; Simonsen, J. B.; Lorentzen, A. M.; Hjernø, K.; van den Brink, J. M.; Qvist, K. B. y Larsena, S. (2013) Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallographica* 69: 901–913.
- Johnsen, L.; Rasmussen, L.; Petersen, T.; Etzerodt, M. y Fedosov, S. (2000) Kinetic and structural characterization of a two-domain streptokinase: dissection of domain functionality. *Biochem.* 39: 6440-6448.
- Juan, B.; Ferragut, V.; Buffa, M.; Guamis, B. y Trujillo, A. J. (2007a) Effects of High Pressure on Proteolytic Enzymes in Cheese: Relationship with the Proteolysis of Ewe Milk Cheese. *J. Dairy Sci.* 90: 2113-2125.
- Juan, B.; Barron, L. J. R.; Ferragut, V.; Guamis, B. y Trujillo, A. J. (2007b) Changes in the Volatile Composition of Semihard Ewe Milk Cheese Induced by High-Pressure treatment of 300 MPa. *J. Agricul. Food Chem.* 55: 747-754.
- Juan, B.; Ferragut, V.; Guamis, B.; y Trujillo, A. J. (2008) The effects of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewe's milk cheese. *Int. Dairy J.* 18: 129-138.
- Juan, B.; Ferragut, V.; Guamis, B.; Buffa, M. y Trujillo, A. J. (2004) Proteolysis of a high-pressure treated ewe's milk cheese. *Milchwissenschaft*, 59, 616-619.
- Kailasapathy, K. y Lam S. H. (2005) Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *Int. Dairy J.* 15: 929–939.

- Kappeler, S. R.; van den Brink, H. J. M.; Rahbek-Nielsen, H.; Farah, Z.; Puhán, Z.; Bech Hansen, E. y Johansen E. (2006) Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342: 647–654.
- Kelly, A. L. y McSweeney P. L. H. (2003) Indigenous Proteinases. En *Advances dairy chemistry. Vol. I: Proteins.* 3rd ed (Eds. Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Estados Unidos. pág. 495-521.
- Kieronczyk, A.; Skeie, S.; Langsrud, T. y Yvon, M. (2003) Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 734-739.
- Kilcawley, K. N.; Ngonierma, A. B.; Hannon, J. A.; Doolan, I. A. y Wilkinson, M. G. (2012) Evaluation of commercial enzyme systems to accelerate Cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 26: 50-57.
- Kindstedt, P.; Yun, J.; Barbano, D. M. y Larose, K. L. (1995) Mozzarella Cheese: impact of coagulant concentration on chemical composition, proteolysis, and functional properties. *J. Dairy Sci.* 78: 2591-2592.
- Koca, N.; Balasubramaniam, V. M. y Harper, W. J. (2011) High-Pressure Effects on the Microstructure, Texture, and Color of White-Brined Cheese. *J. Food Sci.* 76: 399-404.
- Kok, J. y de Vos, W. M. (1994) The proteolytic system of lactic acid bacteria. En: *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria* (Eds.: Gasson, M.J. y de Vos, W.M.). Blackie Academic & Professional, Glasgow, Nueva Zelanda. pág. 169-210.
- Lamballerie-Anton, M. D.; Taylor, R. G. y Culioli, J. (2002). High pressure processing of meat. En *Meat Processing: Improving Quality.* (Eds.: Joseph Kerry, John Kerry y David Ledward). Woodhead Publishing Limited y CRC Press LLC, Cornwall, Inglaterra. pág. 313-327.
- Law, B. A. (2001) Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *Int. Dairy J.* 11: 383-398.

- Law, A. J. R.; Leaver, J.; Felipe, X.; Ferragut, V.; Pla, R. y Guamis, B. (1998) Comparison the effect of high pressure and thermal treatment on the casein micelles in goat's milk. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2523-2530.
- Lawrence, R.C.; Creamer, L. K. y Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.* 70: 1748-1760.
- Liu, H.; Zhang X.; Wei, F. y Li, L. (2011) Effect of high-pressure on the accelerating ripening of Gouda cheese. *Adv. Materials Res.* 239-242: 1617-1621.
- Lopez-Fandino, R. (2006). High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *Int. Dairy J.* 16: 1119–1131.
- Lopez-Fandino, R.; Carrascosa, A. V. y Olano, A. (1996) The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *J. Dairy Sci.* 79: 929-936.
- López-Pedemonte, T.; Roig-Sagués, A. X.; De Lamo, S.; Gervilla, R. y Buenaventura, G. (2007) High hydrostatic treatment applied to model cheeses made from cow's milk inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 18: 441-447.
- Lucey, J. A.; Mishra, R.; Hassan, A. y Johnson, M. E. (2005). Rheological and calcium equilibrium changes during ripening of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 15:645–653.
- Lucey, J. A.; Johnson, M. E. y Horne, D. S. (2003). Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *J. Dairy Sci.* 86: 2725-2743.
- Lynch, C. M.; McSweeney, P. L. H.; Fox P. F.; Cogan, T. M. y Drian, F. D. (1996) Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* 6: 851-867.
- Lynch C. M.; McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F.; Cogan, T. M. y Drinan, F. D. (1997). Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* 77: 441-459.
- MAGyP (2012) Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. En internet:
http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estadística/s/_04_Elaboracion/Elabora_12.htm

- MAGyP (2014) Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina.
En internet:
http://www.minagri.gob.ar/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estadísticas/_archivos/Exportaciones_2013.pdf?exporta
- Malone, A. S.; Shellhammer, T. H. y Courtney, P. D. (2002). High pressure effects on the viability, morphology, lysis and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4357-4363.
- Malone, A. S.; Wick, C.; Shellhammer, T. H. y Courtney, P. D. (2003). High Pressure Effects on Proteolytic and Glycolytic Enzymes Involved in Cheese Manufacturing. *J. Dairy Sci.* 86: 1139-1146.
- Marcos, B.; Kerry, J. P. y Mullen, A. M. (2010). High pressure induced changes on sarcoplasmic protein fraction and quality indicators. *Meat Sci.* 85: 115-120.
- Marilley, L. y Casey M. G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 139-159.
- Martínez-Rodríguez, Y.; Acosta-Muñiz, C.; Olivas, G. I.; Guerrero-Beltrán, J.; Rodrigo-Aliaga, D. y Sepúlveda, D. R. (2012) High Hydrostatic Pressure Processing of Cheese. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 11: 399-416.
- Martley, F. G. y Crow, V. L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3:461-483.
- Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M; Deming, S. N; Michotte, Y y Kaufman, L. (1988) *Chemometrics: a textbook. Data Handling in Science and Technology. Volumen 2.* (Eds. Vandeginste, B.G.M y Kaufman, L). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda.
- McSweeney P. L. H. (1997) The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: taste. *Int. J. Dairy Technol.* 50: 123-128.
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57: 127-144.
- McSweeney, P. L. H. (2011). Biochemistry of Cheese Ripening. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol.1* (Eds. Fuquay J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.H.L). Academic

- Press, Elsevier Science, Oxford, Inglaterra. pág. 667-674.
- McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third Edition, Vol. 1: General Aspects.* (Eds. Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Cogan, T. y Guinee, T.). Academic Press, Estados Unidos. pág. 361-371.
- McSweeney, P. L. H y Sousa, M. (2000). Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* 80: 293-324.
- Meilgaard, M., Civille, G. V. y Carr, B. T. (2007) *Sensory Evaluation Techniques*, 4th edition. CRC Press, Florida, USA.
- Meinardi, C. A.; Alonso, A. A.; Hynes, E. R. y Zalazar, C. A. (2002). Influence of milk-clotting enzyme on acidification rate of natural whey starter culture. *Int. J Dairy Technol.* 55:139-144.
- Meinardi, C.; Costabel, L. M.; Páez, R. B.; Audero, G.; Zalazar, C. y Taverna M. A. (2008). Desarrollo de un protocolo para elaboración de queso Reggiano utilizando ácido láctico y cultivos directos. IV Congreso Internacional de Marketing y Tecnología de Quesos. Bs As, 25 al 27 de junio de 2008.
- Messens, W.; Dewettinck, K.; Van Camp, J. y Huyghebaert, A. (1998) High pressure brining of Gouda Cheese and its effect on the Cheese Serum. *Lebenson.Wiss. Technol.* 31: 552-558.
- Messens, W.; Estepas-Garcia, J.; Dewettinck, K. y Huyghebaert, A. (1999) Proteolysis of high-pressure-treated Gouda cheese. *Int. Dairy J.* 9: 775-782.
- Messens, W.; Foubert, I.; Dewettinck, K. y Huyghebaert, A. (2001) Proteolysis of high-pressure-treated mould-ripened cheese. *Milchwissenschaft* 56: 201-204.
- Messens, W.; Van de Walle, D.; Arevalo, J.; Dewettinck, K. y Huyghebaert, A. (2000) Rheological properties of high-pressure-treated Gouda cheese. *Int. Dairy J.* 10: 359-367.
- Milesi, M. M.; Candiotti, M. y Hynes E. (2007) Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening. *LWT- Food Sci. Technol.* 40: 1427-1433.

- Milesi, M. M.; McSweeney, P. L. H. y Hynes E. R. (2008a) Impact of Chymosin- and Plasmin-Mediated Primary Proteolysis on the Growth and Biochemical Activities of Lactobacilli in Miniature Cheddar-Type Cheeses. *J. Dairy Sci.* 91:3277–3290.
- Milesi, M.; McSweeney, P. L. H. y Hynes E. (2008b) Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *J. Appl. Microbiol.* 105: 884–892.
- Milesi, M. M. (2009). Desarrollo de fermentos adjuntos para quesería a partir de bacterias lácticas no pertenecientes al fermento. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/handle/1/107>
- Milesi, M. M.; Bergamini, C. V. y Hynes, E. (2011). Production of peptides and free amino acids in a sterile extract describes peptidolysis in hard-cooked cheeses. *Food Res. Int.* 44: 765-773.
- Milesi, M. M.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V. y Hynes, E. R. (2010). Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *J. Dairy Sci.* 93: 5020-5031.
- Miyakawa, H.; Anjitsu, K.; Ishibashi, N. y Shimamura, S. (1994) Effects of pressure on enzyme activities of *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *Biosci. Biochem.* 58: 606-607.
- Møller, K. K.; Rattray, F. P. y Ardö, Y. (2012) Camel and bovine chymosin hydrolysis of bovine α_{S1} - and β Caseins studied by comparative peptide mapping. *J. Agricul. Food chem.* 60: 11421–11432.
- Møller, K. K.; Rattray, F. P. y Ardö, Y. (2013) Application of selected lactic acid bacteria and coagulant for improving the quality of low-salt Cheddar cheese: Chemical, microbiological and rheological evaluation. *Int. Dairy J.* 33: 163-174.
- Monnet, V.; Nardi, M.; Chopin, A.; Chopin, M. C. y Gripon, J. C. (1994). Biochemical and genetic characterization of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 269: 32070-32076.

- Moschopoulou, E.; Anisa, T.; Katsaros, G.; Taoukis, P. y Moatsou, G. (2010) Application of high-pressure on ovine brined cheese: Effect on composition and microflora throughout ripening. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11: 543-550.
- Moynihan, A. C.; Govindasamy-Lucey, S.; Jaeggi, J. J.; Johnson, M. E. y Lucey J. A. (2014). Effect of camel chymosin on the texture, functionality, and sensory properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 97: 85-96.
- Murray, J. M. y Delahunty, C. M. (2000). Mapping preference for the sensory and packaging attributes of Cheddar cheese. *Food Qual. Pref.* 11: 419-435.
- Mussa, D. M. y Ramaswamy, H. (1997) Ultra high pressure pasteurisation of milk: kinetics of microbial destruction and changes in physico- chemical characteristics. *Lebenson. Wiss. Technol. (LWT)* 30: 551-557.
- Nantet, B. (1994). *Le goût du fromage*. Ramma- rion, París.
- Needs, E. C.; Stenning, R. A.; Gill, A. L.; Ferragut, V. y Rich, G. T. (2000) High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymatic coagulation. *J. Dairy Res.* 67: 31-42.
- Neviani, E. y Carini, S. (1994) Microbiology of Parmesan cheese. *Microbiol. Aliments Nutrition* 12: 1-8.
- Norton, T. y Sun, D. W. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food Bioproc. Technol.* 1: 2-34.
- Novella-Rodriguez, S.; Veciana-Nogués, T.; Saldo, J. y Vidal-Carou, C. (2002) Effects of High Hydrostatic Pressure Treatments on Biogenic Amine Contents in Goat Cheeses during Ripening. *J. Agricul. Food Chem.* 50: 7288-7292.
- O'Farrel, I.; Sheehan, J.; Wilkinson, M.; Harrington, D.; Kelly, A. (2002) Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear cheese. *Lait*, 82: 305-316.
- Okpala, C. O. R.; Piggott, J. R.; Schaschke, C. J. (2010) Influence of high-pressure processing (HPP) on physic-chemical properties of fresh cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11: 61-67.

- O'Mahony, J. A.; Lucey, J. A. y McSweeney, P. L. H. (2005) Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 88: 3101-3114.
- O'Mahony J. A., Sheehan E. M., Delahunty C. M. y McSweeney P. L. H. (2006) Lipolysis and sensory characteristics of Cheddar cheeses ripened using different temperature-time treatments. *Lait* 86: 59-72.
- O'Reilly, C. E.; Kelly, A. L.; Murphy, P. M. y Beresford, T. P. (2001) High-pressure treatment: applications to cheese manufacture and ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 51-59.
- O'Reilly, C. E.; Kelly, A. L.; Oliveira, J. C.; Murphy, P. M.; Auty, M. A. E. y Beresford, T. P. (2003) Effect of varying high-pressure treatment conditions on acceleration of ripening of cheddar cheese. *Innov, Food Sci. Emerg. Technol.* 4: 277-284.
- O'Reilly, C. E.; O'Connor, P. M.; Murphy, P. M.; Kelly, A. L. y Beresford, T. P. (2000a) The effect of exposure to pressure of 50 MPa on Cheddar ripening. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1: 109-107.
- O'Reilly, C. E.; O'Connor P. M.; Kelly, A. L.; Beresford, T. P. y Murphy, P. M. (2000b) Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Appl. Environ. Microbiol* 66: 4890-4896.
- O'Reilly, C. E.; O'Connor, P. M.; Murphy, P. M.; Kelly, A. L. y Beresford, T. P. (2002) Effects of high-pressure treatment on viability and autolysis of starter bacteria and proteolysis in cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 12: 915-922.
- Ozturk, M.; Govindasamy-Lucey, S.; Jaeggi J. J.; Houck, K.; Johnson, M. E. y Lucey, J. A. (2013a) Effect of various high-pressure treatments on the properties of reduced-fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 96: 6792-6806.
- Ozturk, M.; Govindasamy-Lucey, S.; Jaeggi J. J.; Johnson, M. E. y Lucey, J. A. (2013b) The influence of high hydrostatic pressure on regular, reduced, low and no salt added Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 33: 175-183.
- Patterson, M. F.; Linton, M. y Doona, C. J. (2007). Introduction to High Pressure Processing of Foods. En: *High Pressure Processing of Foods*. (Eds. Doona, C.J y Feeherry, F.E) Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Reino Unido. pág. 1-14.

- Paulson, B. M.; McMahon, D. J. y Oberg, C. J. (1998) Influence of sodium chloride on appearance, functionality and protein arrangements in nonfat Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 81: 2053-2064.
- Peralta, G. H.; Wolf, I. V.; Bergamini, C. V.; Perotti, M. C.; y Hynes, E. R. (2014). Evaluation of volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* I90 in a hard-cooked cheese model using solid-phase microextraction. *Dairy Sci. Technol.* 94: 73-81.
- Perotti, M. C.; Bernal, S. M.; Meinardi, C. A.; Candiotti, M. C. y Zalazar, C. A. (2004) Substitution of natural whey starter by mixed strains of *Lactobacillus helveticus* in the production of Reggianito Argentino cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 57: 45-51.
- Perotti, M. C.; Bernal, S. M.; Meinardi, C. A. y Zalazar, C. A. (2005) Free fatty acids profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. *Int. Dairy J.* 15 : 1150-1155.
- Piraino, P; Parente, E y McSweeney, P. L. H. (2004) Processing of chromatographic data for chemometric analysis of peptides from cheese extracts: A novel approach. *J. Agric. Food Chem.* 52:6904–6911.
- Pollard, A.; Sherkat, M. G.; Seuret, M. G. y Halmos, A. L. (2003) Textural Changes of Natural Cheddar Cheese During the Maturation Process. *Food Eng. Phys. Proper.* 68: 2011-2016.
- Poquet, I.; Saint, V.; Sez nec, E.; Simoes, N.; Bolotin, A. y Gruss, A. (2000). HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol. Microbiol.* 35:1042-1051.
- Poza, L. (2012) Validación de una metodología cromatográfica para la determinación de la actividad residual de la enzima coagulante de leche en quesos. Trabajo Final de la carrera Licenciatura en Química, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Pripp, A. H.; Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L. H.; Sørhaug, T. y Fox, P. F. (2000a) Comparative study by multivariate statistical analysis of proteolysis in a sodium caseinate solution under cheese-like conditions caused by strains of *Lactococcus*. *Int. Dairy J.* 10:25-31.

- Pripp, A. H.;Stepaniak, L. y Sørhaug, T. (2000b) Chemometrical analysis of proteolytic profiles during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 10:249-253.
- Quintans, N. G.; Blancato, V.; Repizo, G., Magni C. y López, P. (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. En: *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications* (Eds. Mayo, M.; López, P. y Pérez-Martínez, G.) pág.65-88.
- Rampilli, M.; Raja, V. y Gatti, A. L. (1998). Valutazione dell'attività residua del caglio nel formaggio. *Sci.Tec. Latt. Cas.* 49: 29-41.
- Rampilli, M. y Raja, V. (1998) Osservazioni sull'attività di plasmina e plasminogeno nel formaggio. *Sci. Tec. Latt. Cas.* 49: 341-350.
- Rastogi, N. K.;Raghavarao, K. S. M. S.; Balasubramaniam, V. M.; Niranjan, K. y Knorr, D. (2007) Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 47: 69-112.
- Reinheimer, J.; Suárez, V.; Bailo, N.; y Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinean hard cheese production. *J. Food Protec.* 54: 796-799.
- Reinheimer, J.; Quiberoni, A.; Tailliez, P.; Binetti, A. y Suárez, V. (1996).The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina on hard cheese production. *Int. Dairy J.* 6:869-879.
- Richardson, B. y Pearce, K. (1981). The Determination of Plasmin in Dairy Products. *N. Z. J. Dairy Sci.Technol.*16:209-220.
- Rippel, K.; Nielsen, S.; Hayes, K. (2004) Effects of native and denatured whey proteins of plasminogen activator activity. *J. Dairy Sci.* 87, 2344-2350.
- Rohm, H. y Jaros, D. (1996) Colour of hard cheese. 1. Description of colour properties and effects of maturation. *Z Lebensm. Unters. Forsch* 203:241-244.
- Rudan, M. A.; Barbano, D. M.; Guo, M. R. y Kindstedt, P. S. (1998). Effect of the modification of fat particle size by homogenization on composition, proteolysis, functionality and appearance of reduced fat Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* 81: 2065-2076.

- Rynne, N. M.; Beresford, T. P.; Guinee, T. P.; Sheehan, E.; Delahunty, C. M. y Kelly, A.L. (2008) Effect of high-pressure treatment of 1 day-old full-fat Cheddar cheese on subsequent quality and ripening. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9: 429-440.
- Sadat-Mekmene, L.; Jardin, J.; Corre, C.; Mollé, D.; Richoux, R.; Delage, M.-M.; Lortal, S. y Gagnaire, V. (2011a) Simultaneous Presence of PrtH and PrtH2 Proteinases in *Lactobacillus helveticus* Strains Improves Breakdown of the Pure α_{s1} -Casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 179-186.
- Sadat-Mekmene, L.; Genay, M.; Atlan, D.; Lortal, S. y Gagnaire, V. (2011b) Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 146: 1-13.
- Sadat-Mekmene, L.; Richoux, R.; Aubert-Frogerais, L.; Madec, M.N.; Corre, C.; Piot, M.; Jardin, J.; le Feunteun, S.; Lortal, S. y Gagnaire, V. (2013). *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses. *J. Dairy Sci.* 96: 1455-1470.
- Saldo, J.; McSweeney P. L. H.; Sendra, E.; Kelly, A.L. y Guamis B. (2002a) Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *Int. Dairy J.* 12: 35-44.
- Saldo, J.; Sendra, E. y Guamis B. (2000) High hydrostatic pressure for accelerating ripening of Goat's milk cheese: proteolysis and texture. *J. Food Sci.* 65: 636-640
- Saldo, J.; Sendra, E. y Guamis B. (2001) Hard cheese structure after a high hydrostatic pressure treatment at 50 MPa for 72 h applied to cheese after brining. *Lait* 81: 625-635.
- Saldo, J.; Sendra, E.; Guamis B. (2002b) Colour changes during ripening of high pressure treated hard caprine cheese. *High Press. Res.* 22: 659-663.
- San Martín-Gonzalez, M. F.; Rodríguez, J. J.; Gurrám, S.; Clark, S.; Swanson, B. G. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2007) Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. *LWT Food Sci. Technol.* 40: 697-705.
- Sandra, S.; Standford, M. A. y Neunier Goddik, L. (2004) The use of high-pressure processing in the production of queso fresco cheese. *J. Food Sci* 69: 153-158.

- Scollard, P. G.; Beresford, T. P.; Murphy, P. M. y Kelly, A.L. (2000a) Barostability of plasmin activity. *Lait* 80: 609-619.
- Scollard, P. G.; Beresford, T. P.; Needs, E. C.; Murphy, P. M. y Kelly, A. L. (2000b) Plasmin activity, β -lactoglobulin denaturation and proteolysis in high pressure treated milk. *Int. Dairy J.* 10: 835-841.
- Scott, R. (1998) Bosquejo histórico del queso. En: *Fabricación de queso*. (Eds. Ribinson R. K y Wildey R. A.). Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. pág. 1-9
- Serrano, J.; Velazquez, G.; Lopetcharat, K.; Ramnirez, J.A. y Torres, J. A. (2004) Effect of Moderate Pressure Treatments on Microstructure, Texture, and Sensory Properties of Stirred-Curd Cheddar Shreds. *J. Dairy Sci.* 87: 3172-3182.
- Settanni, L. y Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27: 691-697.
- Sgarbi, E.; Lazzi C.; Tabanelli G.; Gatti M.; Neviani, E. y Gardini, F. (2013). Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *J. Dairy Sci.* 96: 4223-4234.
- Shakeel-Ur-Rehman; Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Madkor, S. y Farkye, N. (2001). Alternatives to pilot plan experiments in cheese-ripening studies. *Int. J. Dairy Technol.* 54:121-126.
- Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1998) Protocol for the manufacture of miniature cheeses. *Lait* 78:607-620.
- Sheehan, J. J.; Huppertz, T.; Hayes, M. G.; Kelly, A. L.; Beresford, T. P. y Guinee, T. P. (2005) High pressure treatment of reduced-fat Mozzarella cheese: Effects on functional and rheological properties. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6: 73-81.
- Sheehan, J. J.; Oliveira, J. C.; Kelly, A. L. y McSweeney, P. H. L. (2007). Effect of cook temperature on primary proteolysis and predicted residual chymosin activity of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *Int. Dairy J.* 17: 826-834.
- Sheehan, A.; O’Cuinn, G.; FitzGerald, R. J. y Wilkinson, M. G. (2006). Proteolytic enzyme activities in Cheddar cheese juice made using lactococcal starters of differing autolytic properties. *J. Appl. Microbiol.* 100: 893-901.

- Sierra, I.; Vidal Valverde, C. y López Fandiño, R. (2000). Effect of high pressure on the vitamin B1 and B6 content in milk. *Milchwissenschaft* 55: 365-367.
- Sihufe, G. A.; Pirola, M. B.; Ramos, E.; Ceruti, R. J.; De Piante Vicín, D. A. y Robert, L. (2011) Proteólisis en Queso Reggianito elaborado con enzimas exógenas para acelerar su maduración. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, 19 al 21 de octubre de 2011. Copia electrónica ISBN 978-987-22165-4-2.
- Sihufe, G. A.; Zorrilla, S. E.; Perotti, M. C.; Wolf, I. V.; Zalazar, C. A.; Sabbag, N. G.; Costa, S. C. y Rubiolo, A. C. (2010a) Acceleration of cheese ripening at elevated temperature. An estimation of the optimal ripening time of a traditional Argentinean hard cheese. *Food Chem.* 119: 101-107.
- Sihufe G. A.; Zorrilla S. E.; Sabbag N. G.; Costa S. C. y Rubiolo A. C. (2010b) The influence of ripening temperature on the sensory characteristics of Reggianito Argentino cheese. *J. Sensory Studies* 25: 94-107.
- Sihufe G. A.; Zorrilla S. E.; Mercanti D. J.; Perotti M. C.; Zalazar C. A. y Rubiolo A. C. (2007) The influence of ripening temperature and sampling site on the lipolysis in Reggianito Argentino cheese. *Food Res. Int.* 40:1220-1226.
- Sihufe G. A.; Rubiolo A. C. y Zorrilla S. E. (2012) Reggianito cheese: hard cheese produced in Argentina. En: *Handbook of animal-based fermented food and beverage technology*. Editorial CRC press, Boca Raton, Estados Unidos. pág. 377-386.
- Singh, T.; Drake, M.; Cadwallader, K. (2003). Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* 2: 139-162.
- Slattery, L.; O'Callaghan, J.; Fitzgerald G. F.; Beresford, T.; Ross, R. P. (2010). Invited review: *Lactobacillus helveticus* - A thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *J. Dairy Sci.* 93: 4435-4454.
- Smit, G.; Smit B.; Engels, W. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 591-610.

- Smit, G.; Braber, A.; Van Spronsen, W.; Van Den Berg, G. y Exterkate, F. A. (1995) Cheese model: a cheese-based model to study cheese ripening. En: *Bioflavour 95* (Eds.: Étiévant, P. y Schreier, P.) INRA, Paris, Francia, pág. 185-190.
- Smit, G.; Van Hylckama Vlieg, J. E. T.; Smit, B. A.; Ayad, E. H. E. y Engels, W. J. M. (2002). Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacteria. *Austr. J. Dairy Technol.* 57:61–68.
- Somerville, J. (2009) The Effects of Pressure-Assisted Thermal Processing on the Quality Attributes of Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis electrónica. The Ohio State University, Columbus, Estados Unidos
- Somers, J. M. y Kelly, A. L. (2002). Contribution of plasmin to primary proteolysis during ripening of cheese: Effect of milk heat treatment and cheese cooking temperature. *Lait* 82 : 181-192.
- Sousa, M. J. ;Ardö, Y. y McSweeney, P. H. L. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11: 327-345.
- Stevenson, R.; Chen, X.; Mills, O. (1996). Modern analyses and binding studies of flavour volatiles with particular reference to dairy protein products. *Food Res. Int.* 29 : 265-290.
- Szczesniak, A.S. (1963) Classification of Textural Characteristics. *J. Food Sci.* 28: 385-389.
- Tao, Y. ; Sun, D. ;Hogan, E. y Kelly, A. L. (2014). High-Pressure Processing of Foods: An Overview. En: *Emerging Technologies for Food Processing. Second Edition.* Capítulo 1.(Ed. Da-Wen Sun) Dublin, Irlanda. pág. 3-24.
- Thakur, B. R. y Nelson, P. E. (1998) High-pressure processing and preservation of food. *Food Rev. Int.* 14 : 427-447.
- Tavaria, F.; Dahl, S.; Carballo, F. y Malcata, F. (2002) Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 85: 2462-2470.
- Terán, J. C. (2009) La cadena de la leche en Santa Fe. En: *Análisis de la cadena de la leche en Argentina* (Castellano, A.; Issaly, L.C.; Iturrioz, G.; Mateos, M. y Terán, J.C.) Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.

- Tewari, G. (2007) High-Pressure Processing of Foods. En: *Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation*. (Eds Gaurav Tewari y Vijay K. Juneja) Oxford, Reino Unido. pág. 203-235.
- Tewari, G.; Jayas, D. S. y Holley, R. A. (1999) High pressure processing of foods: An overview. *Sci. Des Aliments* 19: 619–661.
- Torres, J. A. y Velazquez, G. (2005). Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of food. *J. Food Eng.* 67:95-112.
- Trujillo, A. J.; Capellas, M.; Bufa, M.; Royo, C.; Gervilla, R.; Felipe, X.; Sendra, E.; Saldo, J.; Ferragut, V. y Guamis, B. (2000) Application of high pressure treatment for cheese production. *Food Res. Int.* 33: 311-316.
- Trujillo, A. J.; Capellas, M.; Saldo, J.; Gervilla, R. y Guamis, B. (2002) Application of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: A review. *Innov.Food Sci.Emerg.Technol.* 3: 295-307.
- Trujillo, A. J.; Royo, C.; Guamis, B. y Ferragut, V. (1999) Influence of pressurization on goat milk and cheese composition and yield. *Milchwissenschaft* 54: 197-199.
- Upadhyay V. K. y McSweeney, P. L. H. (2003). Acceleration of cheese ripening. En *Dairy Processing. Improving quality*. Ed. CRC Press, Cambridge, Reino Unido. pág. 419-447.
- Upadhyay, V. K.; Kelly, A. L. y McSweeney, P. L. H. (2006) Use of nattokinase, a subtilisin-like serine proteinase, to accelerate proteolysis in Cheddar -cheese during ripening. *Lait.* 86: 227-240.
- Upadhyay, V.; McSweeney, P. L. H.; Magboul, A. y Fox, P. F. (2004a) Proteolysis in cheese during ripening. En *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (Eds. Fox P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. y Guinee, T.), Elsevier Ltd (Pub.) Essex, Reino Unido. pág. 393-396.
- Upadhyay, V.; Sousa, M. J.; Ravn, P.; Israelsen, H.; Kelly, A. y McSweeney, P. L. H. (2004b) Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Lait* 84: 527-538.

- Valence, F.; Deutsch S. M.; Richoux; R.; Gagnaire, V. y Lortal, S. (2000). Autolysis and related proteolysis in Swiss cheese for two *Lactobacillus helveticus* strains. *J. Dairy Res.* 67: 261-271.
- Vallejo, J. A.; Ageitos, J. M.; Poza, M. y Villa, T. G. (2012). Short communication: A comparative analysis of recombinant chymosins. *J. Dairy Sci.* 95: 609-613.
- Vélez M. A. (2013) Influencia de la actividad de las enzimas nativas de la leche lipoproteína lipasa y plamina en la lipólisis y la proteólisis de quesos duros de pasta cocida. Tesis doctoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina. <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/handle/1/577>
- Vélez, M. A.; Audero, G.; Costabel, L. M.; Cuatrin, A. L.; Taverna, M. A. (2009) Influencia de la variación estacional y de la proporción de alfalfa en la dieta de vacas lecheras en la composición de quesos Reggianito. XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL®). Facultad de Cs. de la Alimentación (UNER), Concordia, 7 al 9 de octubre de 2009. Copia electrónica ISBN 978-987-22165-3-5.
- Vélez, M. A.; Bergamini, C. V.; Pozza, L.; Candioti, M. C.; Perotti, M. C. y Hynes, E. R. (2011) Efecto del pH, la temperatura de cocción y el lavado de la cuajada sobre la actividad de coagulante y plasmina en minicuajadas modelo. XIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, 19 al 21 de octubre de 2011. ISBN 978-987-22165-4-2.
- Vélez, M. A.; Perotti, M. C.; Wolf, I. V.; Hynes, E. R. y Zalazar, C. A. (2010) Influence of milk pretreatment on production of free fatty acids and volatile compounds in hard cheeses: heat treatment and mechanical agitation. *J. Dairy Sci.* 93: 4545-4554.
- Visser, S. (1993) Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour: an overview. *J. Dairy Sci.* 76: 329-350.
- Voigt, D. D.; Chevalier, F.; Qian, M. C. y Kelly, A. L. (2010) Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11: 68-77.

- Voigt, D. D.; Patterson, M. F.; Linton, M. y Kelly, A. L. (2011) Effect of high-pressure treatment of milk prior to manufacture on ripening of Camembert cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12: 1-5.
- Voigt, D. D.; Chevalier, F.; Donaghy, J. A.; Patterson, M. F.; Qian, M. C. y Kelly, A. L. (2012). Effect of high-pressure treatment of milk for cheese manufacture on proteolysis, lipolysis, texture and functionality of Cheddar cheese during ripening. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol* 13: 23-30.
- Wallace, J. M. y Fox, P. F. (1997). Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. *Int. Dairy J.* 7: 157-167.
- Walstra, P.; Geurts, T. J.; Noomen, A.; Jellema, A. y van Boekel, M. A. (2001) *Ciencia de la leche y tecnología de los productos*. Editorial ACRIBIA S.A., Zaragoza, España
- Welti-Chanes, J.; López-Malo, A.; Palou, E.; Bermúdez, D.; Guerrero-Beltrán, J. A. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). *Fundamentals and Applications of High Pressure Processing of Foods*. En: *Novel Food Processing Technologies* (Eds. Cano, P.; Tapia, M. S. y Barbosa-Cánovas, G. V.). CRC Press. pág.157-182.
- Wick, C.; Nienaber, U.; Anggraeni, O.; Shellhammer, T. H. y Courtney, P. D. (2004). Texture proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial Cheddar cheeses treated with high pressure. *J. Dairy Res.* 71:107-115.
- Wilkinson M. G. y Kilcawley K. N. (2005) Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 15: 817–830.
- Williams, A. G.; Felipe, X. y Banks, J. M. (1998) Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activity of *Lactobactillus* spp. and non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 8: 255-266.
- Yang, W.; Xub, Y.; Zhangc, D.; Zhaod, Y. y Zhao, Z. (2014). Effects of High Pressure Treatments on the Ripening of Hard Cheeses. *Appl. Mechanics Mat.* 464: 98-102.
- Yegin, S. y Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Sci Technol.* 93: 565-594.
- Yokohama, H.; Sawamura, N. y Motobayashi, N. (1992) Method for accelerating cheese ripening. European patent application EP 0 469 857 A1.

- Yvon, M.; Thirouin, S.; Rijinen, L.; Fromentier, D. y Gripon, J. C. (2006) Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 61: 16-24.
- Yvon, M.; Thirouin, S.; Rijnen, L.; Fromentier, D. y Gripon, J. C. (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavour compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 414-419.
- Zalazar, C. A.; Candiotti, M. C.; Mercanti, D. J.; Bergamini, C. V. y Meinardi, C. A. (2006a) Maduración de quesos y su control. En *Avances en Microbiología, Bioquímica y tecnología de quesos*. (Eds. Jorge Reinheimer y Carlos Zalazar), Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina. pág. 177-243.
- Zalazar, C.A.; Candiotti, M.; Mercanti, D.J.; Bergamini, C.V.; Meinardi, C. (2006b) Maduración acelerada. En: *Avances en Microbiología, Bioquímica y Tecnología de quesos*. (Eds. Jorge Reinheimer y Carlos Zalazar), Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina. pág. 267-284.
- Zalazar, C. A.; Meinardi, C. A. y Hynes, E. (1999). Quesos típicos argentinos: Una revisión general sobre producción y características; Cap. 3: Los quesos Argentinos. Centro de Publicaciones Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. pág. 20-49.
- Zannoni, M.; Bertozzi, L y Hunter, E. A. (1994) Comparison of Parmigiano-Reggiano and American Parmesan cheeses by sensory analysis of texture. *Sci.Tecn. Latt.Cas.* 45:505-518.
- Zobrist, M. R.; Huppertz, T.; Uniacke, T.; Fox, P. F. y Kelly, A. L. (2005) High-pressure-induced changes in the rennet coagulation properties of bovine milk. *Int. Dairy J.* 15: 655-662.