



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ingeniería Química

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,
para la obtención del Grado Académico de Doctor en Química en el campo de
Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Desarrollo de flavor y estrategias para acelerar la
maduración de quesos duros y/o semiduros argentinos**

Bioq. Roberto Julio Ceruti



Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química

Director: **Dr. Guillermo A. Sihufe**
Co-Directora: **Dra. Susana E. Zorrilla**

Miembros del jurado de la Tesis: **Dra. Alicia E. Bevilacqua**
Dr. Guillermo E. Hough
Dra. Erica R. Hynes

2013

A Laura, mi compañera

A mis padres y mi hermano, mis raíces

Agradecimientos

A mis directores, Guillermo y Susana, por todo lo que siento que aportaron a mi formación personal y profesional. Voy a estar siempre muy agradecido de que hayan puesto tanto de su capacidad, esfuerzo y compromiso en este proyecto.

A los miembros del jurado por la disposición e interés para participar en la evaluación de esta tesis.

A mi país y su sistema educativo, por darme acceso de manera libre y gratuita a toda la educación formal que he recibido en mi vida, permitiéndome culminar un ciclo en el más alto nivel académico.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento para llevar a cabo todas las actividades de esta tesis y porque mediante los estipendios de becas que recibí, pude dedicarme exclusivamente a esta tarea.

Al personal del INTEC y del CCT CONICET Santa Fe, por la notable infraestructura y calidad humana que tuve a disposición desde el principio y que me generó un genuino sentido de pertenencia. Quiero agradecer especialmente a Juan Carlos Andini y Silvina Addona, por su disposición para ayudarme y compartir sus conocimientos en cromatografía.

A Milkaut S.A., por haber proporcionado desinteresadamente las muestras para el presente estudio.

A mis compañeros del Grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología del INTEC, por todos los buenos momentos compartidos, y por la ayuda, el respeto y sostén que fueron para mí desde el comienzo y a lo largo de todos estos años.

Resumen

Resumen

Acercar la maduración de quesos de pasta dura es, desde hace algunos años, un objetivo de gran interés para disminuir el costo asociado a tener grandes volúmenes de producto almacenado durante períodos de tiempo prolongados. Entre las alternativas propuestas para lograrlo, el aumento de la temperatura de almacenamiento es considerada la más sencilla, efectiva y económica. En la presente Tesis, se evaluó el efecto del uso de una temperatura elevada durante el comienzo de la maduración de queso Reggianito sobre los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos, bioquímicos y sensoriales que caracterizan a este queso.

Usando 18 quesos, recibidos en nuestro laboratorio luego de la etapa de salado, se ensayaron tres condiciones de maduración diferentes: 6 quesos se almacenaron a 12°C y 85% HR durante 6 meses (quesos C); 6 quesos se almacenaron a 20°C y 85% HR durante los primeros 15 días y luego hasta 6 meses a 12°C y 85% HR (quesos E₁); los restantes 6 quesos se almacenaron a 20°C y 85% HR los primeros 30 días y luego hasta 6 meses a 12°C y 85% HR (quesos E₂). La toma de muestra se llevó a cabo por duplicado a 61, 124 y 180 días de maduración y se realizaron los siguientes análisis: determinación de los contenidos de humedad y de cloruro, determinación del IM, pH, recuentos microbiológicos, seguimiento de la proteólisis y de la lipólisis, determinación del perfil de compuestos volátiles y análisis sensorial descriptivo.

Si bien las condiciones de maduración evaluadas afectaron la velocidad de redistribución de humedad y sal en la masa del queso, se observaron valores finales muy similares y dentro de los esperados para todos los parámetros fisicoquímicos y recuentos microbiológicos correspondientes a microorganismos del fermento natural de suero y aquellos pertenecientes a NSLAB, en todas las muestras analizadas. En lo que se refiere al seguimiento de la proteólisis, las metodologías usadas (IM, urea-PAGE y RP-HPLC para el análisis de péptidos y aminoácidos libres) permitieron observar que un aumento inicial de la temperatura de almacenamiento de los quesos intensificó los procesos de degradación/formación de las fracciones presentes, pero no alteró el patrón de proteólisis habitual y esperable para esta variedad de queso.

La mayoría de los ácidos grasos libres no mostraron cambios en sus concentraciones debido a los tratamientos evaluados, siendo el total observado a los 6 meses muy similar para todos los quesos analizados. Los mayores cambios en los perfiles de compuestos volátiles se observaron al comienzo del almacenamiento de los quesos. A partir de los 2 meses se observaron cambios en la concentración de los mismos, pero no se observó la aparición y/o desaparición de picos por efecto del aumento de la temperatura al comienzo de la maduración. Además, no se alteró el perfil compuestos volátiles característico de este queso.

Mediante el análisis sensorial, se pudo observar que el uso de temperaturas iniciales de maduración elevadas conducen a una aceleración suave y moderada en el

desarrollo de las características sensoriales de queso Reggianito. Finalmente, a través del uso de técnicas estadísticas de análisis multivariado y considerando toda la información proveniente de las diferentes áreas evaluadas, fue posible comprobar que las muestras correspondientes a los quesos experimentales (fundamentalmente E₂) madurados durante 4 meses tuvieron características similares y comparables a las de los quesos control madurados durante 6 meses.

El trabajo de Tesis realizado permitió profundizar el conocimiento sobre los eventos que determinan las principales características de queso Reggianito, así como evaluar de qué manera se ven afectadas al implementar un aumento en la temperatura inicial de almacenamiento con el objetivo de disminuir el período total de maduración del queso duro más importante y representativo de los elaborados en nuestro país.

Índice de contenidos

Índice de contenidos

Resumen.....	v
Índice de contenidos.....	ix
Capítulo 1	1
Introducción.....	2
1.1. Definición y origen del queso.....	3
1.2. La producción de leche y quesos a nivel mundial y en Argentina.....	4
1.3. Características generales de la leche.....	6
1.4. Principales componentes de la leche de vaca.....	8
1.4.1. Lactosa.....	8
1.4.2. Lípidos.....	8
1.4.3. Proteínas.....	10
1.4.3.1. Caseínas.....	10
1.4.3.2. Proteínas del suero lácteo.....	13
1.5. Principales etapas de la fabricación de quesos.....	14
1.5.1. Selección y tratamiento de la leche.....	14
1.5.2. Obtención de la cuajada.....	15
1.5.3. Sinéresis, moldeado y prensado.....	17
1.5.4. Salado.....	18
1.5.5. Maduración.....	18
1.6. Queso Reggianito.....	20
Capítulo 2	24
Objetivos.....	25
2.1. Objetivo general.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	26
Capítulo 3	27
Fundamentos teóricos.....	28
3.1. Aspectos microbiológicos de la maduración de quesos.....	28
3.1.1. Principales tipos de microorganismos.....	28
3.1.2. Fermento primario.....	30
3.1.3. Fermento secundario.....	33
3.1.4. Bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento primario ...	34
3.1.5. Principales factores que controlan el crecimiento de los microorganismos.....	35
3.1.5.1. Actividad de agua.....	35
3.1.5.2. Sal.....	36
3.1.5.3. Potencial de óxido-reducción.....	36

Índice de contenidos

3.1.5.4.	pH y ácidos orgánicos	36
3.1.5.5.	Temperatura y humedad.....	37
3.1.6.	Evolución de la flora LAB durante la maduración	37
3.1.7.	Microbiología de quesos duros italianos y de queso Reggianito ...	38
3.2.	Aspectos bioquímicos de la maduración de quesos	40
3.2.1.	Proteólisis.....	40
3.2.2.	Principales agentes proteolíticos.....	42
3.2.2.1.	Coagulante residual.....	42
3.2.2.2.	Proteinasas nativas de la leche	43
3.2.2.3.	Enzimas proteolíticas de origen microbiano	45
3.2.3.	Lipólisis.....	46
3.2.4.	Principales agentes lipolíticos.....	48
3.2.4.1.	Lipoproteinlipasa	48
3.2.4.2.	Esterasa pregástrica.....	48
3.2.4.3.	Enzimas lipolíticas de origen microbiano	49
3.2.5.	Degradación de compuestos de menor tamaño	49
3.2.5.1.	Metabolismo del lactato y citrato	50
3.2.5.2.	Metabolismo de los ácidos grasos libres.....	51
3.2.5.3.	Metabolismo de los aminoácidos libres	53
3.2.6.	Compuestos volátiles presentes en quesos.....	56
3.2.6.1.	Ácidos grasos	57
3.2.6.2.	Cetonas	57
3.2.6.3.	Alcoholes	58
3.2.6.4.	Lactonas	58
3.2.6.5.	Ésteres	58
3.2.6.6.	Aldehídos	59
3.2.6.7.	Compuestos azufrados	59
3.2.6.8.	Aminas	60
3.3.	Aspectos de la evaluación sensorial de quesos	60
3.3.1.	Técnicas de evaluación sensorial	60
3.3.2.	Principales características sensoriales.....	64
3.4.	Aceleración de la maduración de quesos	66
3.4.1.	Métodos para acelerar la maduración	66
3.4.2.	Aceleración de la maduración por aumento de la temperatura de almacenamiento.....	75
Capítulo 4	88
Materiales y métodos		89
4.1.	Quesos	89
4.1.1.	Maduración de los quesos	89
4.1.2.	Muestreo de los quesos	90
4.2.	Análisis fisicoquímico.....	91
4.3.	Análisis microbiológico	92
4.4.	Seguimiento de la proteólisis	93

Índice de contenidos

4.4.1.	Análisis electroforético	93
4.4.2.	Obtención de la fracción soluble en agua a pH 4.6.....	97
4.4.3.	Obtención de la fracción soluble en ácido sulfosalicílico 2.5%.....	98
4.4.4.	Determinación del índice de maduración.....	99
4.4.5.	Análisis de la FS por RP-HPLC.....	100
4.4.6.	Análisis de la FS-SSA por RP-HPLC	102
4.5.	Análisis de los ácidos grasos libres	107
4.5.1.	Preparación de la muestra.....	108
4.5.2.	Aislamiento de los AGL	109
4.5.3.	Análisis cromatográfico	109
4.6.	Análisis de los compuestos volátiles.....	110
4.6.1.	Preparación de la muestra	112
4.6.2.	Microextracción en fase sólida (SPME)	112
4.6.3.	Análisis cromatográfico	113
4.6.4.	Índice de Kováts.....	114
4.7.	Análisis sensorial	115
4.8.	Análisis estadístico.....	117
Capítulo 5		119
Resultados y discusión		120
5.1.	Análisis fisicoquímico.....	120
5.2.	Análisis microbiológico	126
5.3.	Seguimiento de la proteólisis	128
5.3.1.	Análisis electroforético por urea-PAGE	128
5.3.2.	Análisis de la FS por RP-HPLC.....	132
5.3.3.	Análisis de la FS-SSA por RP-HPLC	136
5.4.	Seguimiento de la lipólisis: análisis de los ácidos grasos libres	145
5.5.	Análisis de los compuestos volátiles.....	150
5.5.1.	Perfiles cromatográficos de los compuestos volátiles.....	150
5.5.2.	Identificación de compuestos a partir de los datos obtenidos de los cromatogramas	156
5.6.	Análisis sensorial	161
5.7.	Análisis de Componentes Principales	168
Capítulo 6		176
Conclusiones		177
Anexo		184
Referencias bibliográficas		214
Abreviaturas		231

Capítulo 1

Introducción

Capítulo 1

Introducción

La producción de alimentos fermentados ha sido desde épocas milenarias un medio de conservación de alimentos, así como una manera de transformar, diversificar y mejorar sus características sensoriales. En todos los alimentos fermentados, por tratarse de sistemas donde ocurren transformaciones llevadas a cabo por microorganismos, es crucial el tiempo del proceso, pudiendo ser éste desde algunas horas hasta de varios años. A nivel industrial, la producción de alimentos fermentados exige un elevado nivel de control sobre las diferentes variables que dominan el proceso, a fin de optimizar la relación entre rendimiento, costo y calidad, y prevenir la aparición de procesos fuera de control que puedan eventualmente deteriorar la producción. En el caso de los quesos, el consumo cada vez más masivo y la necesidad de hacer que los procesos industriales resulten más rentables y productivos, ha motivado el desarrollo y la optimización de las condiciones en que se lleva a cabo cada una de las etapas de producción. Una de las etapas de mayor costo en la elaboración de quesos duros es la de maduración, durante la cual grandes volúmenes del producto son inmovilizados durante meses e incluso años. Además, debido a que durante esta etapa ocurren las transformaciones bioquímicas que definen la identidad y la calidad de cada variedad de queso, es de especial interés buscar alternativas para obtener un producto final que mantenga las características que le son propias y pueda ser producido en menor tiempo.

1.1. Definición y origen del queso

El queso puede ser considerado básicamente un concentrado de caseínas y minerales como calcio y fósforo, con un contenido graso variable (Mahaut y col., 2003). Desde un punto de vista tecnológico, se lo puede definir como el producto fresco o maduro, sólido o semisólido, que resulta de la coagulación de la leche por acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, seguida del desuerado del coágulo obtenido o cuajada. La cuajada puede ser consumida como tal bajo la categoría de queso fresco o sufrir una maduración que conduce a una serie de transformaciones especialmente enzimáticas en las que se adquieren caracteres organolépticos específicos, constituyendo el queso maduro (Chamorro y Losada, 2002).

Actualmente, se cree que el queso surgió por primera vez hace aproximadamente 8000 a 10000 años en la Mesopotamia, región del actual Irak, de la mano de la domesticación de ovejas y cabras y la obtención de leche de estos animales. Los quesos de coagulación ácida podrían haber surgido espontáneamente, por la acción acidificante de los lactobacilos, naturalmente presentes en la leche, al metabolizar la lactosa (Fox, 2011a). Los quesos producidos por coagulación enzimática probablemente surgieron al usar los estómagos de los animales que producían la leche, como contenedor para transportar leche. Almacenar leche en el estómago de una cría la expuso a la acción de las enzimas coagulantes presentes en la mucosa gástrica de estos animales, produciéndose así la formación de la cuajada

(Andrén, 2011). La producción de quesos fue extendiéndose a otras regiones y a otras especies de animales que fueron domesticados, como la vaca, y acompañó el crecimiento de las civilizaciones en Egipto, Grecia y Roma (Fox, 2011a).

1.2. La producción de leche y quesos a nivel mundial y en Argentina

El 85% de la producción mundial de leche corresponde a leche de vaca, 11% es de búfala, 2% de oveja y 2% de cabra. En muchos países, la leche y los productos lácteos son componentes muy importantes en la dieta, dado que contribuyen en gran medida a la ingesta de proteínas, lípidos y calcio. Una ingesta adecuada de calcio, especialmente durante la niñez, es crítica para el desarrollo óseo y la prevención de la osteoporosis en etapas posteriores de la vida, por lo que la leche y los productos lácteos ricos en calcio, como por ejemplo los quesos coagulados enzimáticamente, son muy importantes. La leche juega un rol vital en la nutrición infantil. A pesar de que la leche humana es probablemente la mejor para los niños pequeños, la mayoría de ellos puede sobrevivir y tener un desarrollo corporal adecuado alimentándose con leche bovina (Fox, 2011b).

Actualmente, la producción y el consumo de leche y diversos productos lácteos, entre los que se incluyen los quesos, están extendidos a nivel mundial. De acuerdo con el último informe anual de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2012), la economía mundial está cada vez más influida por el cambio en la dieta y en los patrones de consumo de alimentos de origen animal. En las últimas décadas, en países en desarrollo de Asia del este y del sur, donde ha

Capítulo 1 - Introducción

ocurrido el mayor aumento de la población mundial, el consumo de carne ha crecido a una tasa de alrededor de un 4% anual, y el de leche y productos lácteos a un ritmo de un 2 a 3% anual. En 2010, la producción mundial de leche fue de 610000 millones de litros, siendo EE.UU. (14.3% de la producción mundial), India (8.25%) y China (5.91%) los principales productores mundiales ([MAGyP, 2012a](#)).

En Argentina, el total de leche producida durante 2011 fue de 11600 millones de litros. Este volumen marcó un récord absoluto para una producción en crecimiento desde el año 2008 ([MAGyP, 2012b](#)). En vastos sectores de la población argentina, los lácteos representan una porción importante de la dieta diaria. Del total de leche producida, aproximadamente un 75% se destina al consumo interno y el 25% restante se destina a exportaciones, siendo los principales productos exportados la leche en polvo (57%), los quesos (19%) y en tercer lugar, suero en polvo y derivados (5%). En cuanto a la distribución geográfica de las zonas productivas, se observa que las explotaciones lecheras (11000 tambos aproximadamente) se encuentran concentradas en la llanura pampeana, siendo Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe las provincias que concentran el 94% de la explotación y la mayor parte de las plantas que industrializan la leche ([MAGyP, 2012c](#)).

A nivel mundial, aproximadamente la tercera parte de la leche producida se destina a la elaboración de quesos, la cual fue de alrededor de 20 millones de toneladas en 2011. Las principales regiones productoras son Europa (que concentra

el 50% de la producción mundial), EE.UU. y Sudamérica (particularmente Brasil y Argentina) ([OECD-FAO, 2012](#)).

Según datos de 2011, el principal destino de la leche producida en el país es la fabricación de quesos, para la que se destina el 43% del total, de los cuales 8% es para quesos de pasta dura, 19% para quesos de pasta semidura y 16% para quesos de pasta blanda ([MAGyP, 2012d](#)). En 2011, en Argentina se produjeron 536000 toneladas de queso. Debido al elevado consumo *per cápita* que se registra (alrededor de 11 kg de queso por año por habitante), la mayor parte del queso producido es consumido localmente, pero un remanente de alrededor del 10% del total es exportado (59842 toneladas). Además, durante 2011 se exportaron 8360 toneladas de queso de pasta dura (22.3% más que en 2010), lo que representó un ingreso total de 55 millones de dólares. Los principales compradores de queso de pasta dura (principalmente de queso Reggianito) fueron Brasil, EE.UU., Rusia, Chile, México y Venezuela ([MAGyP, 2012e](#)). Esta situación de expansión de las colocaciones de quesos de pasta dura en el extranjero se ha mantenido en el 2012, observándose un nivel de exportación un 60% mayor en el primer semestre que en igual período del año anterior ([MAGyP, 2012f](#)).

1.3. Características generales de la leche

La leche es un fluido secretado por las glándulas mamarias de las hembras de todos los mamíferos, de los que hay alrededor de 4500 especies, para la alimentación de sus crías. Desde el punto de vista nutricional, la leche cubre en su totalidad los

Capítulo 1 - Introducción

requerimientos nutricionales de las crías de mamíferos durante su período de mayor crecimiento, y es por ello que puede ser considerada el alimento natural más completo. Además, la leche cumple con numerosas funciones fisiológicas en el lactante, mediante el aporte de inmunoglobulinas y otros agentes antibacterianos, enzimas e inhibidores de enzimas y proteínas de unión o transportadoras, que ayudan a la digestión, así como hormonas y factores de crecimiento. Debido a que los requerimientos nutricionales y fisiológicos son particulares para cada especie, existen marcadas diferencias en la composición de su leche. Sin embargo, gran parte de los estudios sobre la composición de la leche han sido dirigidos a las principales especies de explotación lechera: vaca, búfala, oveja y cabra (Fox, 2011b).

Desde un punto de vista fisicoquímico, puede considerarse a la leche como un fluido complejo, en el que sus componentes coexisten organizados en tres fases. Por un lado, hay una fase acuosa, en la cual la lactosa, las sales orgánicas e inorgánicas y algunas vitaminas están solubilizadas. En esta fase acuosa están también solubilizadas algunas proteínas, las proteínas del suero lácteo. Por otro lado, existe una fase coloidal, compuesta por las caseínas que forman agregados (denominados micelas), cuyo diámetro oscila entre 50 a 300 nm y otra fase en la que los lípidos existen en un estado emulsificado, formando glóbulos de 0.1 a 20 μm de diámetro, estabilizados por una membrana lipoproteica (Fox, 2011b).

1.4. Principales componentes de la leche de vaca

Al igual que la leche de probablemente todas las especies, la leche de vaca varía en su composición y por lo tanto en sus propiedades, de acuerdo a diversos factores, especialmente la alimentación, estado de lactación, salud, estado nutricional e individualidad del animal.

1.4.1. Lactosa

En leche de vaca, los niveles de este disacárido son típicamente de alrededor de 4.8%, valor que decrece con el avance de la lactación y la infección de la ubre (mastitis). Existen también en baja concentración oligosacáridos compuestos de 3 a 10 monosacáridos entre los que se incluyen la fucosa y el ácido N-acetilneuramínico, sin que tengan importancia tecnológica conocida (Fox, 2011c).

1.4.2. Lípidos

La leche bovina contiene 3 a 6% de lípidos. Los lípidos se encuentran formando parte de los glóbulos grasos, cuyos diámetros oscilan entre 0.1 y 20 μm , con un promedio de 3.4 μm . Los lípidos presentes en la leche son principalmente los triglicéridos (98%), y luego siguen, en pequeñas cantidades, fosfolípidos y otros lípidos polares, diglicéridos, esteroides (principalmente colesterol), vitaminas liposolubles (A, D, E y K), ácidos grasos libres e hidrocarburos. Resulta también característico de la leche de vaca, el mayor contenido de sustancias carotenoides, que

le confieren a la leche y productos lácteos de origen bovino un color amarillento, en contraste con el blanco para el caso de la leche de los demás rumiantes (Fox, 2011c).

La leche bovina contiene un gran número de ácidos grasos (alrededor de 400), sin embargo, muchos de ellos se encuentran en cantidades extremadamente pequeñas, y sólo 15 ó 16 de ellos están presentes en concentraciones iguales o mayores a 1%. Predominan los ácidos grasos de cadena saturada, que suman hasta 70% del total. Los principales ácidos grasos saturados tienen una longitud de 4 a 18 átomos de carbono, siendo éste un número par. El ácido graso que está presente en mayor proporción es el ácido palmítico (C16:0), que representa un 25-30% del total, mientras que el ácido mirístico (C14:0) y el ácido esteárico (C18:0) constituyen individualmente 10-12% del total. El principal ácido graso no saturado es el ácido oleico (C18:1) que representa alrededor de 20% del total, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados están presentes en bajos niveles. A diferencia de lo que ocurre con los demás mamíferos, la leche de vaca y otros rumiantes contiene cantidades relativamente altas de los ácidos grasos más cortos de cadena lineal: C4:0, C6:0, C8:0 y C10:0 (Taylor y McGibbon, 2011).

En la leche de rumiantes, y especialmente en la leche de vaca, también se encuentran un conjunto de ácidos grasos poliinsaturados conocidos como conjugados del ácido linoleico (CLA). Estos compuestos son isómeros del ácido linoleico con dobles enlaces conjugados y se originan como producto de la hidrogenación incompleta del ácido linoleico dietario. El principal isómero es el ácido cis-9, trans-11-octadecadienoico. Este compuesto ha sido objeto de numerosas investigaciones

que sugieren un amplio rango de propiedades beneficiosas para la salud, como la prevención de la carcinogénesis, enfermedades cardiovasculares e inmunoprotección (Bauman y col., 2011).

1.4.3. Proteínas

El contenido de proteínas en leche de vaca es de alrededor de 3.5%. La proporción de caseínas/proteínas del suero lácteo es característica de cada especie, siendo en el caso de los rumiantes de aproximadamente 0.8 (Fox, 2011c).

1.4.3.1. Caseínas

Las caseínas bovinas son cuatro, α_{S1} -, α_{S2} -, β - y κ -caseína y están presentes en una proporción aproximada de 38, 10, 35 y 12%, respectivamente, observándose en cada una de ellas diferencias que las clasifican como subtipos. Esta heterogeneidad que se observa para cada caseína se conoce como microheterogeneidad y se debe a polimorfismos genéticos (pequeñas diferencias en los genes de las caseínas que originan diferencias en la estructura primaria) y a modificaciones postraduccionales, como son las variaciones en el grado de fosforilación (en los residuos de serina u ocasionalmente treonina), glicosilación de los residuos de treonina (sólo en la κ -caseína) y polimerización por enlaces disulfuro, debido a la oxidación de residuos de cisteína, así como por la proteólisis de las caseínas debido a la acción de las enzimas nativas de la leche (Fox, 2011c).

Todas las caseínas tienen en su estructura primaria un elevado contenido del aminoácido prolina (en el caso de la β -caseína hasta un 16%), que interrumpe las estructuras secundarias de las proteínas. Como consecuencia, las caseínas son proteínas desestructuradas, abiertas y de conformación variable (reomórficas), lo que favorece el ataque enzimático y aumenta su digestibilidad. Debido a que las caseínas están asociadas con calcio y fosfato en alta proporción, la digestión de estas proteínas libera también una cantidad significativa de estos minerales para que puedan ser asimilados por el lactante (Fox, 2011c).

Las α_{S1} -caseínas contienen 199 residuos de aminoácidos y sus residuos de serina unen covalentemente 8 grupos fosfatos. Las α_{S2} -caseínas, por su parte, contienen en su estructura 207 residuos de aminoácidos. Son las menos hidrofóbicas de todas las caseínas, y tienen 10 residuos de prolina, 2 de cisteína y más fosfoserinas (en un número variable, de 10 a 13) y lisinas que las demás caseínas.

Las β -caseínas son las más hidrofóbicas y contienen 209 residuos de aminoácidos, no tienen cisteínas y poseen un alto nivel de prolina (35 residuos), lo que tiene un profundo efecto sobre su estructura. Al pH de la leche, el segmento N-terminal de 21 residuos es de alta carga negativa, mientras el resto de la molécula, que es muy hidrofóbica, no tiene carga neta. Esta naturaleza anfipática de las β -caseínas es la causa de que formen agregados moleculares en solución. Las β -caseínas tienen 0-5 grupos fosfatos unidos a los residuos de serina.

Capítulo 1 - Introducción

Las γ -caseínas son producidas tras la hidrólisis de las β -caseínas, como consecuencia de la acción de la plasmina. Las γ -caseínas principales son tres, que corresponden a los residuos 29-209 (γ_1 -caseína), 106-209 (γ_2 -caseína) y 108-209 (γ_3 -caseína) de la β -caseína. Los fragmentos restantes tras la hidrólisis de las β -caseínas, dan origen a los péptidos conocidos como proteosa-peptonas (PP), los cuales están solubilizados en el suero lácteo.

Las κ -caseínas son las únicas caseínas que están glicosiladas, tienen 169 residuos de aminoácidos y son las moléculas blanco de la acción de la quimosina. Estabilizan las micelas de caseína contra la precipitación por acción del calcio, pero pierden su rol protector cuando son escindidas a nivel de los residuos Phe₁₀₅-Met₁₀₆ para formar dos péptidos, para- κ -caseína por un lado (residuos 1-105), que es la porción hidrofóbica y precipita con las micelas de caseína, y el caseinomacropéptido (residuos 106-169) por el otro, que permanece en solución debido a su alta polaridad y alto contenido de cargas negativas (Farrell, 2011).

Las α_{S1} -, α_{S2} - y β -caseínas se unen fuertemente a cationes polivalentes como el calcio. En concentraciones de Ca^{+2} mayores a 6 mmol/L a 20°C se vuelven insolubles. Sin embargo, la estabilidad de la κ -caseína no se ve afectada por la unión de Ca^{+2} y puede estabilizar hasta 10 veces su masa de caseínas sensibles al calcio, permitiendo la formación de las micelas. La estabilidad y la desestabilización de las micelas bajo ciertas condiciones son críticas para la tecnología láctea (Fox, 2011c).

1.4.3.2. Proteínas del suero lácteo

Las proteínas del suero lácteo representan alrededor del 20% del contenido de proteína total en leche de vaca y permanecen en solución a pH 4.6. En contraste con las caseínas, son típicamente proteínas globulares con una alta organización a nivel secundario, terciario e incluso cuaternario en algunos casos. Las principales proteínas del suero lácteo (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica bovina e inmunoglobulinas) representan alrededor de un 99% del total. La β -lactoglobulina, que representa más del 50% de las proteínas del suero lácteo, tiene una estructura primaria de 162 aminoácidos. Los estudios realizados hasta el momento indican que sería una proteína de unión a retinol y podría estar involucrada también en la activación de la lipasa. La α -lactoalbúmina es la segunda proteína del suero lácteo en cantidad y juega un rol muy importante en la biosíntesis de lactosa, al ser un modificador del complejo enzimático lactosa sintetasa. Por otro lado, las proteínas albúmina sérica bovina e inmunoglobulina tienen funciones inmunitarias (Ng-Kwai-Hang, 2011).

Además existen numerosas proteínas en pequeña proporción, muchas de las cuales tienen actividad biológica e incluyen alrededor de 60 enzimas nativas. Algunas de estas enzimas tienen acciones significativas, como por ejemplo sobre el deterioro de la calidad (por ejemplo, lipasa, plasmina, fosfatasa ácida, xantinaóxidoreductasa), la preservación de la calidad (por ejemplo, lisozima, superóxidodismutasa, lactoperoxidasa), como indicadores de la historia térmica (por ejemplo, fosfatasa alcalina, catalasa, γ -glutaminotranspeptidasa, lactoperoxidasa) o

como indicadores de mastitis (por ejemplo, N-acetilglucosaminidasa, catalasa). Las enzimas están heterogéneamente distribuidas en la leche, por ejemplo, la catalasa, lactoperoxidasa, ribonucleasa y glucosaminidasa se encuentran principalmente en la fracción del suero lácteo, mientras que las proteinasas y la lipasa están asociadas a las micelas de caseína y la xantina oxidasa se encuentra en la membrana de los glóbulos grasos (Ng-Kwai-Hang, 2011).

1.5. Principales etapas de la fabricación de quesos

1.5.1. Selección y tratamiento de la leche

La composición del queso está fuertemente influenciada por la composición de la leche, especialmente su contenido de grasas, proteínas y calcio, y el pH. La leche de vaca en etapas iniciales de la lactancia debe ser excluida, así como en caso de detección de mastitis, o de contaminantes químicos, como pesticidas y antibióticos. La leche debe ser de buena calidad microbiológica, debido a que las bacterias contaminantes presentes se concentran en la cuajada y pueden causar defectos en el queso o problemas sanitarios (Fox, 2011a).

Para que el queso tenga una determinada relación entre su contenido de proteínas y grasa, esta proporción debe estar ajustada en la leche que se use como materia prima para su fabricación. Existen varias maneras de lograr este fin tales como el agregado de crema, el descremado por centrifugación o el agregado de leche descremada. El calcio juega un papel importante en la coagulación, es por ello que el

agregado previo de una pequeña cantidad de CaCl_2 (0.01%) a la leche es una práctica común (Fox, 2011a).

Tradicionalmente, el queso era fabricado a partir de leche cruda. Actualmente, esta práctica sigue siendo utilizada en algunos casos, especialmente en quesos con Denominación de Origen Protegida (DOP). Sin embargo, en la mayoría de los casos, la leche es sometida previamente a un tratamiento térmico de pasteurización, especialmente en industrias de gran escala, a los fines de eliminar microorganismos patógenos potencialmente presentes en la leche y de obtener una menor carga microbiana de partida en la leche (Fox, 2011a).

1.5.2. Obtención de la cuajada

Habitualmente la leche tiene un pH cercano a la neutralidad, de alrededor de 6.7, pero para que haya una adecuada formación de la cuajada es necesario disminuir este pH, hasta un valor de 6.2 a 6.5 durante el moldeado y prensado y hasta 5.0 a 5.2 inmediatamente antes del salado, para la mayoría de los quesos obtenidos por coagulación enzimática. Esta acidificación en general se obtiene mediante la producción *in situ* de ácido láctico debido a la fermentación de la lactosa presente en la leche por parte de cultivos especialmente agregados de bacterias ácido lácticas. Estos cultivos son usualmente conocidos como cultivo iniciador, fermento primario o *starter*, y a las bacterias perteneciente a este tipo de fermento se las llama bacterias ácido lácticas pertenecientes al fermento primario. La producción de ácido a una adecuada velocidad es necesaria porque incide en: una adecuada actividad del

coagulante; la desnaturalización y retención del coagulante en la cuajada, lo que luego influye en la tasa de proteólisis durante la maduración y puede afectar la calidad del queso; la fuerza del gel, lo que influye sobre el rendimiento quesero; la sinéresis del gel, que controla el contenido de humedad de la cuajada y así regula el crecimiento de las bacterias y la actividad de enzimas en el queso y, consecuentemente, influye de manera notable sobre la tasa y el patrón de maduración y la calidad del queso; la disponibilidad de fosfato de calcio coloidal de las micelas de caseína que se disuelve a pH menores, lo que aumenta la susceptibilidad de las caseínas a la proteólisis, y cambia la reología de los quesos; la inhibición del crecimiento de microorganismos no deseados (Fox, 2011a).

En algunas variedades de quesos, ciertos cultivos son también agregados deliberadamente, conocidos como cultivo adjunto o fermento secundario, con propósitos tecnológicos específicos que son ajenos a la acidificación de la cuajada. Tal es el caso del agregado de bacterias del género *Propionibacterium* en el caso de quesos tipo suizos y del hongo *Penicillium roqueforti* en el caso de quesos azules, que favorecen mediante su actividad metabólica la generación de características organolépticas que resultan propias de la variedad de queso (Fox, 2011a).

La coagulación enzimática de los quesos es el método de obtención de la cuajada más empleado, ya que alrededor del 75% de las variedades de queso en el mundo se obtienen de esta manera. Consiste básicamente en una proteólisis limitada que es llevada a cabo por ciertas proteinasas agregadas. El fundamento de la acción

de estas proteinasas es la ruptura específica del enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la molécula de κ -caseína, en la superficie de la micela caseínica. La hidrólisis de la κ -caseína altera la carga superficial y las propiedades estéricas de las micelas, lo que disminuye la repulsión entre ellas, y permite así su agregación para que finalmente, en presencia de Ca⁺², coagulen formando una red tridimensional firme conocida como cuajada (Lucey, 2011). La quimosina bovina, originalmente obtenida del cuarto estómago o abomaso de terneros lactantes, es la enzima coagulante más usada que tiene un mayor rendimiento en la obtención de la cuajada y actividad proteolítica específica. Actualmente la mayor parte de la quimosina bovina es obtenida por fermentación en cultivos de microorganismos modificados genéticamente para expresar el gen de dicha enzima (Andrén, 2011).

1.5.3. Sinéresis, moldeado y prensado

Luego de la coagulación, el gel formado es bastante estable, pero si es cortado en pequeños fragmentos, proceso conocido como lirado, exudará suero, lo que se conoce como sinéresis del gel. El tamaño de los fragmentos en que se corta la cuajada dependerá del grado de humedad que se desea obtener en el queso. Así, quesos con alto contenido de humedad son cortados en trozos más grandes, y quesos de baja humedad, o quesos duros, se corresponden con una cuajada cortada en fragmentos mucho más pequeños. En este proceso de sinéresis, se elimina la fase acuosa de la leche o suero, conteniendo el 98% de la lactosa, 25% de la proteína total y 10% de la materia grasa de la leche; las caseínas y grasas se concentran en un factor de 6 a 12, dependiendo de la variedad de queso considerada (Fox, 2011a).

Una vez que se han alcanzado los niveles de humedad y pH deseados, la masa de coágulo se coloca en moldes donde termina de drenar el líquido y adquiere una consistencia más compacta. El contenido final de humedad de cada variedad de queso se regula a través del prensado de la masa en el molde (Fox, 2011a).

1.5.4. Salado

El salado por inmersión en salmuera es el método de salado que se adopta para la mayoría de las variedades de queso, si bien existen otros métodos como el agregado de sal directamente sobre la cuajada obtenida luego de la coagulación o el salado por agregado directo de sal en la superficie de los quesos ya moldeados y prensados. El salado en quesos cumple dos funciones principales, la de contribuir a la preservación y la de hacer un aporte directo al sabor del queso. Sin embargo, la presencia de sal en la matriz del queso ejerce una amplia gama de efectos con influencia sobre el crecimiento de la flora microbiana normalmente presente en el queso durante la maduración, la actividad enzimática y el grado de hidratación de las caseínas (Guinee y Shuterland, 2011).

1.5.5. Maduración

La gran mayoría de los quesos coagulados enzimáticamente son almacenados durante un período, que según la variedad, puede abarcar desde algunas semanas hasta más de dos años. La duración de este período en general se relaciona de manera inversa con el contenido de humedad de la variedad de queso. De esta manera, quesos con mayor contenido de humedad son madurados por menor tiempo y

viceversa. Es durante esta etapa de maduración que en cada variedad de queso se desarrollan las características que le son únicas, como resultado del complejo conjunto de reacciones bioquímicas y cambios físicos que ocurren. Los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración son causados por uno o más de los agentes involucrados: el coagulante, las enzimas nativas de la leche (especialmente proteinasas y en ocasiones lipasas), las bacterias del fermento primario y los microorganismos de la flora secundaria (por ejemplo, las bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento primario). También tienen influencia las enzimas exógenas que puedan haber sido deliberadamente agregadas (Fox, 2011a).

La maduración está caracterizada por una compleja serie de reacciones bioquímicas que pueden ser divididas en tres grupos principales:

- El metabolismo de la lactosa residual, lactato y citrato, que resulta en cambios en el sabor, la textura y, en ocasiones, en la producción de CO₂ (responsable de la presencia de ojos y otras aberturas en la masa del queso).
- La lipólisis y metabolismo de los ácidos grasos libres, que si bien es moderada en la mayoría de las variedades de quesos, puede ser importante en otras, e incluso ser la vía catabólica principal y dominar el proceso de maduración, como ocurre en el caso de los quesos azules.

- La proteólisis y posterior metabolismo de aminoácidos, que son las reacciones más complejas y quizás más importantes que ocurren durante la maduración de quesos, especialmente en quesos madurados internamente con bacterias. Estas transformaciones tienen gran influencia sobre el aroma y sabor, la textura y la funcionalidad de cada queso. Las reacciones primarias que ocurren en la proteólisis (degradación de las caseínas) suelen ser responsables de los cambios en la textura y funcionalidad, mientras que los cambios que impactan sobre el aroma y sabor se originan principalmente de las modificaciones que ocurren posteriormente sobre los productos de las reacciones primarias ([McSweeney, 2011](#)).

1.6. Queso Reggianito

El queso Reggianito es el queso duro más importante elaborado en la Argentina. Sus antecedentes son los quesos duros italianos de pasta cocida Parmigiano Reggiano y Grana Padano, de los que surge como una adaptación a las condiciones locales, como resultado de la llegada de inmigrantes italianos en la segunda mitad del siglo XIX. Es un queso más pequeño, con mayor contenido de humedad y menor tiempo de maduración que sus congéneres italianos ([Castañeda y col., 2010](#)).

Según el Código Alimentario Argentino ([CAA, 2006](#)), artículo 635, “Con el nombre de Queso Reggianito se entienden los quesos madurados que se obtienen por coagulación de la leche por medio del cuajo y/u otras enzimas coagulantes

Capítulo 1 - Introducción

apropiadas, complementada por la acción de bacterias lácticas específicas. Deberán tener un contenido mínimo de 32 g de materia grasa / 100 g del extracto seco. Consistencia dura, textura compacta, quebradiza y granulosa. Color blanco amarillento y ligeramente amarillento. Sabor salado, levemente picante. Olor característico. Corteza lisa, consistente, bien formada, cubierta con revestimientos apropiados, adheridos o no. Sin ojos. Cilindros de caras planas de 5 a 10 kg de peso y madurados por lo menos seis meses para lograr sus características específicas”.

El queso Reggianito generalmente se elabora con leche de vaca estandarizada y pasteurizada. La cuajada se obtiene con coagulantes naturales bovinos o quimosina obtenida por fermentación y se utiliza como fermento primario, fermento natural de suero obtenido de elaboraciones previas, conteniendo principalmente los lactobacilos termófilos *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Luego de la coagulación y el lirado, la cuajada se procesa mediante una etapa de cocción, en la que es agitada y calentada progresivamente hasta una temperatura máxima de alrededor de 50°C para favorecer aún más la sinéresis. Luego del prensado, el queso es salado por inmersión en salmuera durante 8-9 días, tras lo cual es madurado a una temperatura de 10-15°C y una humedad relativa de 82-85% durante un período mínimo de 6 meses (Sihufe y col., 2012).

El queso Reggianito ha sido objeto de diferentes estudios para poder caracterizar la bioquímica de su maduración, así como para ver el efecto que pueden tener sobre las características finales del producto, diferentes modificaciones

tecnológicas efectuadas en algunas de las etapas de su elaboración. [Reinheimer y col. \(1996\)](#) describieron las cepas de bacterias lácticas que predominan en el fermento natural de suero que habitualmente se utiliza en la elaboración de queso Reggianito. [Wolf y col. \(2010\)](#) llevaron a cabo un estudio utilizando distintas muestras de queso comercial y poniendo especial énfasis en la caracterización de los compuestos volátiles presentes, de marcado impacto sobre el aroma y sabor de esta variedad de queso.

Se estudió el efecto de envasar con envoltura plástica cerrada al vacío sobre las características reológicas ([Bertola y col., 1995](#)), el perfil sensorial ([Hough y col., 1994](#)) y el contenido de ácidos orgánicos ([Lombardi y col., 1994](#)) durante la maduración de quesos Reggianito. También se evaluó el efecto de sustituir el fermento natural de suero que es habitualmente utilizado como fermento primario por cepas puras seleccionadas (y originalmente aisladas de dicho fermento natural) sobre aspectos relacionados con la proteólisis ([Hynes y col., 2003](#); [Hynes y col., 2005](#)), la lipólisis ([Perotti y col., 2005](#)) y el perfil sensorial en el queso ([Candioti y col., 2002](#)).

Por otro lado, se realizaron estudios con el objetivo de evaluar el efecto del uso de temperaturas más elevadas de maduración en queso Reggianito sobre los distintos aspectos involucrados en la maduración de los quesos como la proteólisis ([Sihufe y col., 2010a](#)), la lipólisis ([Sihufe y col., 2007](#)), la información procedente del análisis sensorial ([Sihufe y col., 2010b](#)) y se realizó una evaluación estadística

Capítulo 1 - Introducción

conjunta de toda la información mencionada para establecer un tiempo óptimo de maduración de queso Reggianito a 18°C ([Sihufe y col., 2010c](#)).

Capítulo 2

Objetivos

Capítulo 2

Objetivos

El crecimiento de la población a nivel mundial, la incorporación de productos lácteos a la dieta en países asiáticos en los que tradicionalmente no eran populares y el incremento del consumo *per cápita* de estos productos en países en los que ya forman parte de la cultura alimenticia, son factores responsables del mayor interés por bajar los costos de producción sin que vaya en desmedro de la calidad del producto. La maduración de quesos, en especial de quesos duros, es una de las etapas más costosas de la fabricación del producto. Entre las alternativas para acelerar la maduración, la de aumentar la temperatura de almacenamiento es una de las más simples, y a la vez más efectivas. El queso Reggianito, que es el principal queso duro producido en la Argentina, registra altos niveles de consumo y popularidad dentro del país y es también conocido en mercados del exterior, por mérito propio y por su similitud con los quesos duros italianos. Por lo tanto, se proponen los objetivos que se listan a continuación.

2.1. Objetivo general

Se propone como objetivo general estudiar alternativas que permitan acelerar la maduración en queso Reggianito, usando como base el estudio de los principales cambios bioquímicos que ocurren en quesos almacenados bajo diferentes combinaciones de temperatura-tiempo, así como la influencia que éstos tienen sobre

las principales características del producto.

2.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos se proponen:

- Evaluar el efecto del aumento de la temperatura aplicado en la etapa inicial de maduración de queso Reggianito sobre:
 - ✦ Los parámetros de control fisicoquímico y microbiológico.
 - ✦ Las vías bioquímicas de la proteólisis, lipólisis y formación de compuestos volátiles.
 - ✦ Las características sensoriales.

- En función a la información fisicoquímica, bioquímica y sensorial obtenida, establecer una combinación temperatura-tiempo y un tiempo de maduración que resulten adecuados para obtener un producto de características similares al queso Reggianito madurado en condiciones tradicionales.

Capítulo 3

Fundamentos teóricos

Capítulo 3

Fundamentos teóricos

3.1. Aspectos microbiológicos de la maduración de quesos

3.1.1. Principales tipos de microorganismos

Desde el punto de vista microbiológico, el queso es un complejo ecosistema de diversas especies de bacterias y en algunos casos también contiene ciertas especies de mohos y levaduras como flora natural. Durante la maduración, estos microorganismos llevan a cabo sus actividades metabólicas, para lo cual utilizan los hidratos de carbono, grasas y proteínas presentes en el queso, lo que tiene gran influencia sobre las características finales del producto.

Debido a que el queso es un ambiente selectivo, no cualquier tipo de microorganismo es capaz de desarrollarse en su interior. Las bacterias que tienen dicha capacidad son conocidas como bacterias ácido lácticas (LAB, *lactic acid bacteria*) y se caracterizan por la capacidad de producir ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares, incluyendo la lactosa, en la mayoría de las especies. Comúnmente son bacilos o cocos no móviles, Gram-positivos, microaerofílicos, ácido tolerantes, no formadores de esporas (Fox, 2011d).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Las LAB pueden ser mesófilas (temperatura óptima de crecimiento alrededor de 30°C) o termófilas (temperatura óptima alrededor de 45°C). En cuanto a su ubicación taxonómica, las LAB pertenecen a alguno de los siguientes géneros principales: *Lactobacillus* (125 especies), *Lactococcus* (5 especies y 3 subespecies), *Streptococcus* (sólo una especie es de interés en tecnología alimentaria, *Streptococcus thermophilus*), *Leuconostoc* (22 especies y 3 subespecies), *Pediococcus* (9 especies), *Bifidobacterium*, *Carnobacterium* y *Enterococcus* (Fox, 2011d).

La microflora del queso resulta de los cultivos agregados, la flora presente en la leche (cuando no es pasteurizada previamente a la elaboración) y la flora adquirida del ambiente durante el proceso de manufactura. Las tendencias actuales en la industria quesera están dirigidas a lograr un mayor control sobre la microflora presente en el queso, usando leche pasteurizada y mezclas de cultivos diseñadas para un control y desarrollo de flavor a medida. Es así que la flora bacteriana del queso comprenderá una de las siguientes categorías: 1) cultivo primario o SLAB (*starter lactic acid bacteria*), 2) cultivo secundario o adjunto, agregado principalmente por su efecto sobre el flavor, formación de ojos, etc. y 3) microorganismos adventicios o NSLAB (*non-starter lactic acid bacteria*) (Broome y col., 2011).

Para cualquier tipo de queso, el fermento primario, junto con cualquier cultivo secundario agregado y con la flora adventicia, deben tener los componentes microbiológicos adecuados para que ocurran las transformaciones bioquímicas típicas de ese tipo de queso. Los cultivos tradicionales (incluyendo los fermentos

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

primarios industriales indefinidos que se derivan de precursores artesanales) contienen típicamente numerosas cepas de muchas especies microbianas. Todos estos microorganismos contribuyen, desde un punto de vista bioquímico, a la complejidad (y variabilidad) del producto final (Powell y col., 2011).

3.1.2. Fermento primario

Si bien existen quesos artesanales en los que los lactococos presentes naturalmente en la leche son los encargados de la acidificación inicial de la leche (Cogan, 2011), en la gran mayoría de los casos se recurre con esta finalidad al agregado de cultivos de microorganismos que por la función que desempeñan son conocidos como cultivo iniciador o fermento primario.

Dentro de los cultivos primarios se pueden distinguir los mesófilos, que comprenden a especies del género *Lactococcus* y en ocasiones, *Leuconostoc* y a los termófilos, que típicamente incluye a las bacterias termófilas del género *Lactobacillus* y a *Streptococcus termophilus*. Los cultivos mesófilos tienen un crecimiento y una producción de ácido óptima a temperaturas de alrededor de 30°C y son capaces de producir ácido (aunque no necesariamente de crecer) a una temperatura de cocción del queso de hasta 38-40°C. Los cultivos termófilos tienen temperaturas de crecimiento óptimo de alrededor de 42°C y son típicamente usados en quesos manufacturados a altas temperaturas (tales como algunas variedades de quesos italianos y suizos en los que se usan temperaturas desde 37°C y hasta por encima de los 50°C) (Powell y col., 2011).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

La función principal de los cultivos de SLAB es la de producir ácido láctico por fermentación de la lactosa en las etapas iniciales de la manufactura de quesos. La consecuente caída del pH es la que afecta a numerosos aspectos del proceso de manufactura de quesos y en última instancia, la composición y calidad del queso. Es importante notar que estos efectos no están simplemente relacionados al pH final del queso, sino que dependen del pH en distintos momentos cruciales durante la manufactura del queso, especialmente en el momento del drenaje del suero y durante la sinéresis. Una producción de ácido predecible por el cultivo primario puede ser crucial para un control de la textura del queso y el desarrollo del flavor ([Powell y col., 2011](#)).

Otra función importante del fermento primario es contribuir a generar condiciones adversas para el crecimiento de otros microorganismos; el crecimiento de muchos patógenos que son sensibles a medios ácidos está inhibido en cierta medida por el pH bajo, así como por las moléculas de ácido láctico sin disociar. Además, la oxidación de la lactosa es fundamental para la reducción de la tensión de oxígeno y la consecuente disminución del potencial de óxido-reducción, que constituye otro obstáculo para el crecimiento de otros microorganismos. Sin embargo, estos cambios mencionados actúan como un obstáculo más para inhibir el crecimiento de patógenos, operando en el queso en conjunto con la baja temperatura, baja actividad acuosa, presencia de sal y ácidos orgánicos y la baja disponibilidad de oxígeno ([Powell y col., 2011](#)).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Otra característica de mucha importancia en relación a las SLAB es la de formar parte en el desarrollo del flavor en quesos, debido a que poseen un conjunto de peptidasas que son capaces de degradar hasta aminoácidos los péptidos formados por otros agentes proteolíticos, pudiendo luego estos aminoácidos actuar como precursores de un conjunto de compuestos volátiles de aroma y sabor. Cuando las células de las SLAB se lisan en el queso, las peptidasas intracelulares pasan a estar disponibles para actuar sobre los péptidos que están presentes en la masa del queso. Cuando la cantidad de lactosa presente en el queso se reduce a niveles limitantes, el metabolismo de los cultivos primarios puede afectar directamente el desarrollo de flavor en el queso mediante la formación de diversos compuestos derivados del lactato, del citrato y de los aminoácidos (Broome y col., 2011).

En la actualidad, existen diferentes formas de preparar los cultivos de fermentos primarios que luego serán utilizados en la elaboración del queso. Si bien originalmente los queseros preparaban estos fermentos sin ningún conocimiento de microbiología, actualmente en la mayoría de los casos los fermentos son de origen comercial. Se dispone de una amplia gama de microorganismos, para ser utilizados solos o combinados, los cuales han sido especialmente seleccionados a nivel de especie e incluso cepa para el fin particular para el que son utilizados. Sin embargo, existen aún, especialmente en Europa, variedades de quesos en los cuales se utilizan fermentos primarios preparados de forma artesanal, como son los fermentos naturales de leche y de suero lácteo (Powell y col., 2011).

3.1.3. Fermento secundario

Los cultivos secundarios pueden ser definidos como aquellos cultivos de microorganismos que son utilizados en la manufactura de algunos tipos de quesos con una función específica dentro del proceso de desarrollo y el control del flavor, el color y la textura del queso. El crecimiento y el desarrollo de los cultivos secundarios en quesos están normalmente precedidos por la fermentación de la lactosa a lactato por el fermento primario ya que la contribución de los cultivos secundarios a la acidificación de la leche suele ser limitada o nula. Los cultivos secundarios son usados en la manufactura de quesos debido a sus propiedades fisiológicas o bioquímicas únicas, que están o ausentes o severamente limitadas en el fermento primario. Entre estas propiedades están, por ejemplo, la halotolerancia, el crecimiento a bajo pH, la utilización del lactato, la formación de CO₂, la actividad proteolítica y peptidolítica, la actividad lipolítica y esterolítica o las actividades enzimáticas del catabolismo de aminoácidos. Entre los cultivos secundarios se incluyen un conjunto de especies de levaduras, mohos y bacterias ([Ratray y Eppert, 2011](#)).

En otros tipos de quesos, entre los que se incluye el Cheddar y los quesos duros italianos, normalmente no se usan cultivos secundarios y la generación del flavor depende de la actividad metabólica y del complemento de enzimas del fermento primario y de la flora adventicia o NSLAB ([Ratray y Eppert, 2011](#)).

3.1.4. Bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento primario

Este grupo está presente en la mayoría de los quesos madurados durante un cierto tiempo y comprende principalmente a lactobacilos facultativos heterofermentativos, especialmente *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*, pero también pueden estar presentes *Pediococcus* spp. y lactobacilos heterofermentativos obligados como son *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermentum*. Son microorganismos mesófilos y las principales fuentes de origen son la leche (especialmente en quesos elaborados con leche cruda) y/o el ambiente de la fábrica. La mayoría de las NSLAB son anaerobios facultativos ácido y halotolerantes y por lo tanto pueden crecer en el queso en estadios más avanzados de la maduración, donde se transforman en la población predominante (Cogan, 2011). En quesos manufacturados en las instalaciones industriales actuales, con un alto nivel de higiene y automatización, las NSLAB constituyen el único factor que permanece sin controlar y son en consecuencia la principal fuente de inconsistencias y defectos en la calidad del producto final (Bude Ugarte y col., 2006). Hasta el momento no está bien establecido qué compuestos utilizan las NSLAB como fuente primaria de energía. Si bien tienen la capacidad de degradar carbohidratos simples con mayor facilidad, la virtual desaparición de la lactosa residual en las primeras semanas de maduración muestra que son capaces de obtener energía partiendo de otros compuestos. Entre los compuestos que serían responsables de este aporte figuran los ácidos grasos, glicoproteínas y glicolípidos, aminoácidos e incluso nucleótidos que son liberados en la masa del queso debido a la lisis de los cultivos primarios (Broadbent y col., 2011).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Dentro de la población NSLAB, existe una mayor diversidad de especies en estadios más tempranos. A diferencia de lo que ocurre en el fermento primario, las células de las NSLAB se lisan lentamente en quesos duros y sus enzimas intracelulares probablemente no son liberadas en la masa del queso. Sin embargo, se cree que pueden tener una alta participación en el desarrollo del flavor y muchos estudios actuales proponen el aislamiento de algunos de estos microorganismos para ser usados como cultivos adjuntos que aceleren o intensifiquen el desarrollo del flavor. Una de las acciones más importantes es el metabolismo de los aminoácidos libres presentes durante la maduración. En particular, el catabolismo de metionina y de los aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada generaría compuestos volátiles con un fuerte impacto sobre el flavor del queso. Las NSLAB también estarían involucradas en la lipólisis y el posterior catabolismo de los ácidos grasos liberados, además de la capacidad de metabolizar compuestos con impacto en el flavor a través de vías degradativas alternativas para los compuestos remanentes, como el lactato y el citrato (Broadbent y col., 2011).

3.1.5. Principales factores que controlan el crecimiento de los microorganismos

3.1.5.1. Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) en el queso disminuye a medida que avanza la maduración. La pérdida de agua por evaporación, la mayor concentración de solutos como el lactato y demás ácidos orgánicos y la mayor captación de agua libre por parte de los péptidos y aminoácidos liberados así como los ácidos grasos libres, son los responsables de esta disminución. Las bacterias necesitan altos valores de a_w para

sobrevivir, siendo de esta manera un factor que ayuda a limitar la multiplicación de los microorganismos (Cogan, 2011).

3.1.5.2. Sal

La acción de la sal está en íntima relación con la reducción de a_w que ocurre cuando un soluto se disuelve en agua. La relación entre la concentración de sal y la disminución en a_w es prácticamente lineal. La concentración de sal en quesos es variable, desde valores inferiores a 0.5% a valores de alrededor del 5% (Cogan, 2011).

3.1.5.3. Potencial de óxido-reducción

El potencial redox varía desde un valor positivo de alrededor de 150 mV en la leche a uno negativo de -250 mV en el queso. Esta disminución en el potencial probablemente se debe a la disminución de la tensión de oxígeno como resultado de la fermentación de la lactosa a ácido láctico por parte del fermento primario. Por lo tanto, se puede definir al queso como un sistema anaeróbico, en el que sólo pueden crecer microorganismos anaerobios, facultativos u obligados (Cogan, 2011).

3.1.5.4. pH y ácidos orgánicos

La mayoría de las bacterias tienen un pH para el crecimiento óptimo cercano a la neutralidad y tienen poco crecimiento en pH menores a 5. Dado que el pH del queso luego de la manufactura suele ser de 4.5 – 5.3, el mismo es un factor

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

significativo para el control del crecimiento de bacterias en el queso. Por el contrario, las bacterias lácticas tienen pH de crecimiento óptimo por debajo de 7 y en especial los lactobacilos pueden crecer a valores de pH cercanos a 4. Complementariamente, los ácidos orgánicos no disociados tienen también la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Los ácidos láctico, acético y propiónico predominan en la mayoría de los quesos (Cogan, 2011).

3.1.5.5. Temperatura y humedad

La temperatura a la que cada variedad de queso es madurada es una solución de compromiso entre los eventos bioquímicos que se quieren favorecer y aquellos que se quieren limitar. Debe considerarse que así como se quiere promover las reacciones bioquímicas que ocurren durante la maduración y el crecimiento (o lisis) por parte de los microorganismos presentes, se busca prevenir el desarrollo de microorganismos indeseables. Por otro lado, la humedad es un parámetro que en general se controla con un enfoque similar. Una humedad excesiva puede ser indeseable desde el punto de vista microbiológico, pero debe mantenerse controlada y que no sea baja para prevenir excesiva pérdida de humedad, especialmente en quesos blandos (Cogan, 2011).

3.1.6. Evolución de la flora LAB durante la maduración

El número inicial de SLAB en la leche antes de la coagulación está en el orden 10^5 - 10^7 UFC/g queso. Luego crecen relativamente rápido durante la manufactura, llegando a alrededor de 10^9 UFC/g queso en casi todos los quesos a las

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

pocas horas de haber sido agregados a la leche. De esta manera, las SLAB son los microorganismos dominantes en el queso al comienzo de la maduración. La mayor parte de las SLAB se lisa relativamente rápido durante la maduración, liberando sus enzimas intracelulares que, junto con la quimosina, ayudan al desarrollo del flavor del queso. En contraste con lo que ocurre con el fermento primario, las NSLAB tienen recuentos iniciales bajos en el queso (alrededor de 10^2 UFC/g queso), pero crecen relativamente rápido para llegar a cifras altas, del orden de 10^8 UFC/g queso dentro del primer mes de maduración, para luego mantenerse en niveles relativamente constantes entre 10^7 y 10^8 UFC/g queso (Cogan, 2011).

3.1.7. Microbiología de quesos duros italianos y de queso Reggiano

La preparación tradicional de un cultivo primario indefinido, usando parte de una elaboración (o suero originado a partir de ésta) como fermento primario para la elaboración siguiente, resulta en un enriquecimiento selectivo en los microorganismos que sobreviven y se multiplican bajo las condiciones de la elaboración quesera. Así, los fermentos primarios tradicionales de cualquier tipo de queso contienen bacterias adecuadas, naturalmente seleccionadas, para el proceso de manufactura tradicional (especialmente para el perfil de temperaturas presente durante la manufactura). Esta interrelación se aplica también para el caso de elaboración de quesos a escala industrial (Powell y col., 2011). En el caso de los quesos acidificados con fermento natural de suero y en los que su elaboración incluye una etapa de cocción por encima de los 40°C , existe una selección de flora LAB termófila. Por ejemplo, en los quesos duros italianos Parmigiano Reggiano y

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Grana Padano, que tienen un proceso de cocción en el que la cuajada llega a 54-56°C, el fermento natural de suero está dominado por las especies de lactobacilos termófilos *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus fermentum* (Di Cagno y Gobbetti, 2011). De manera análoga, para queso Reggianito, elaborado con una tecnología que tiene similitudes a la utilizada para los quesos tipo grana italianos, y que incluye una cocción de la cuajada con temperaturas que llegan a 51°C, el fermento natural de suero que es utilizado está principalmente compuesto por cepas de los termófilos *Lactobacillus helveticus* (66% del total) y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (33%) (Reinheimer y col., 1996). Ningún tipo de cultivo adjunto es utilizado durante la elaboración de estos quesos.

Dado que la mayoría de los quesos duros italianos, manufacturados bajo estrictas normas por estar registrados bajo DOP, son elaborados siguiendo técnicas artesanales entre las que se incluye el uso de leche cruda, existe una gran diversidad en cuanto a las especies de lactobacilos mesófilos presentes en cada uno de ellos, así como diferencias en la composición entre las distintas variedades de quesos. Así, por ejemplo, se ha reportado que *Lactobacillus casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum* y *Lb. rhamnosus* predominan en quesos Parmigiano Reggiano, mientras que *Lb. plantarum*, *Lb. curvatum* y *Lb. fermentum*, junto con una heterogénea población de lactococos se encontraron en quesos maduros de la variedad Pecorino Romano (Di Cagno y Gobbetti, 2011). Hasta el momento, en queso Reggianito no se ha

informado sobre estudios que incluyan recuentos totales o de composición de la flora NSLAB.

3.2. Aspectos bioquímicos de la maduración de quesos

Desde un punto de vista bioquímico, durante la maduración el queso es un espacio limitado en donde ocurren una gran cantidad de reacciones bioquímicas, que son en su mayor parte catalizadas por las distintas enzimas presentes. En la mayoría de las reacciones se liberan, a partir de las macromoléculas presentes, fragmentos cada vez más pequeños hasta llegar a los componentes más elementales: aminoácidos en el caso de las proteínas y ácidos grasos y glicerol en el caso de las grasas. Luego estos compuestos pueden seguir siendo objeto de reacciones adicionales o secundarias, generándose a partir de hidratos de carbono simples (lactosa residual, lactato y citrato), ácidos grasos y aminoácidos, distintos compuestos volátiles que juegan un papel importante en aumentar la complejidad y diversidad de las características de los quesos. Las reacciones primarias son responsables principalmente de los cambios en la textura y funcionalidad, mientras que los cambios que ocurren debido a las transformaciones químicas de estos productos primarios tienen más impacto sobre las características del flavor.

3.2.1. Proteólisis

Bajo el nombre de proteólisis se agrupa al conjunto de reacciones degradativas del que son objeto las proteínas y que son las más complejas e importantes en quesos madurados internamente con bacterias, como es el caso de la

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

gran mayoría de los quesos duros. La proteólisis es la responsable primaria de los cambios que se dan en la textura y funcionalidad en los quesos y hace una contribución significativa al flavor a través de la formación de aminoácidos y péptidos cortos. Sin embargo, más importante aún es la contribución que hacen de modo indirecto estas vías proteolíticas al desarrollo del flavor, ya que los aminoácidos liberados por el proceso sirven a su vez como sustrato en las reacciones catabólicas posteriores, que generan una multitud de compuestos volátiles con alto impacto sobre el flavor del alimento (McSweeney, 2011).

En muchas variedades de quesos, la cadena de eventos que conforman el proceso de proteólisis sigue aproximadamente el mismo camino. Inicialmente las caseínas sufren una hidrólisis parcial, debido a la acción enzimática del coagulante residual retenido en la cuajada y a enzimas nativas de la leche (fundamentalmente la plasmina), que da como producto un rango de péptidos de tamaño grande a intermedio. Este proceso a menudo es conocido como proteólisis primaria. Los péptidos producidos luego de la proteólisis primaria pueden ser a su vez hidrolizados por las proteinasas y peptidasas pertenecientes a los distintos microorganismos presentes (SLAB, NSLAB o cultivos secundarios) para dar como productos, péptidos más cortos y aminoácidos, siendo esta serie de eventos conocida como proteólisis secundaria. Sin embargo, existen grandes diferencias en cuanto a la importancia relativa de cada una de las vías que componen la proteólisis y a su extensión global entre las distintas variedades, debido a variaciones en las prácticas de manufactura (particularmente la temperatura de cocción) y en los protocolos seguidos para la

maduración, que causan diferencias en el tiempo de maduración, contenido de humedad, actividad del coagulante residual, activación del plasminógeno a plasmina y posiblemente en el desarrollo de una flora altamente proteolítica. El patrón de proteólisis (esto es, las concentraciones relativas de los diferentes péptidos y aminoácidos) es muy variable y es esencialmente particular para cada variedad de queso (McSweeney, 2004).

3.2.2. Principales agentes proteolíticos

3.2.2.1. Coagulante residual

La mayor parte del coagulante agregado a la leche se pierde con el lactosuero y, según la variedad de queso que se trate, por desnaturalización durante la etapa de cocción. En los quesos cocidos a temperaturas altas, de alrededor de 55°C o más, el coagulante perderá toda o casi toda su actividad enzimática. Sin embargo, a temperaturas menores una cierta proporción quedará en estado nativo y será suficiente para catalizar reacciones hidrolíticas sobre las caseínas. Durante la maduración del queso, el coagulante es responsable principalmente de la ruptura inicial de las caseínas o proteólisis primaria.

Distintos coagulantes intervienen en la elaboración de distintas variedades de queso. La quimosina, ya sea agregada en estado puro o en combinación con la enzima pepsina, es el coagulante más utilizado. El sitio principal de acción sobre α_{S1} -caseína es el enlace Phe₂₃-Phe₂₄, que por ejemplo en quesos Cheddar es completamente hidrolizado hacia los 4 meses de maduración y que origina el péptido

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

largo α_{S1} -CN (f24-199), conocido como α_{S1} -I-caseína y el péptido corto α_{S1} -CN (f1-23). El segundo enlace más susceptible en esta proteína es el Leu₁₀₁-Lys₁₀₂, que está extensamente hidrolizado en queso Cheddar maduro. La acción de la quimosina sobre la α_{S2} -caseína en el queso no ha sido aún dilucidada, pero al parecer su alcance es limitado. Con respecto a la β -caseína, a pesar de que el enlace Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ es muy susceptible a la acción de la enzima en solución, en las condiciones del queso no se ha demostrado que esto ocurra. La mayoría de los enlaces de la β -caseína potencialmente susceptibles a la acción de la quimosina están ubicados en la región C-terminal, rica en aminoácidos hidrofóbicos y por lo tanto la hidrólisis de estos enlaces liberaría péptidos hidrofóbicos, que contribuyen al sabor amargo. Sin embargo, la acción de la quimosina sobre la β -caseína parece estar fuertemente inhibida en el queso por los niveles de sal presente (McSweeney, 2011).

La especificidad de los sitios de acción de la pepsina sobre las moléculas de las caseínas sería en general similar a los de quimosina, pero no han sido establecidos con precisión. Una diferencia es que la pepsina bovina rompe el enlace Leu₁₀₉-Glu₁₁₀ de la α_{S1} -caseína con bastante rapidez, mientras que este enlace es hidrolizado con bastante lentitud por la quimosina (McSweeney, 2011).

3.2.2.2. Proteinasas nativas de la leche

La leche contiene naturalmente una serie de proteinasas nativas, entre las cuales la plasmina claramente es la más importante. En menor proporción y con baja

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

significancia relativa, se encuentran también la proteinasa ácida catepsina D y otras enzimas nativas.

La plasmina es una serin-proteasa que proviene del suero sanguíneo y cuyo pH de actividad óptima se encuentra alrededor de 7.5. Forma parte de un sistema enzimático que incluye un precursor o zimógeno (plasminógeno), activadores e inhibidores. La plasmina, el plasminógeno y los activadores del plasminógeno están asociados a las micelas de caseína y quedan así incorporados dentro de la cuajada. Por otro lado, los inhibidores de la plasmina y de los activadores del plasminógeno están presentes en el lactosuero y en su mayor parte se eliminan de la cuajada durante la coagulación. La presencia de estos inhibidores mantiene baja la actividad de la plasmina en la leche, mientras que su ausencia en la cuajada la favorece (McSweeney, 2011).

La plasmina actúa principalmente sobre la β -caseína y como productos de esta hidrólisis surgen las γ -caseínas: γ_1 -caseína (β -CN (f29-209)), γ_2 -caseína (β -CN (f106-209)) y γ_3 -caseína (β -CN (f108-209)) y las proteosa peptonas (PP): PP5 (β -CN (f1-105) y β -CN (f1-107)), PP8 lenta (β -CN (f29-105) y β -CN (f29-107)) y PP8 rápida (β -CN (f1-28)). La α_{S2} -caseína es susceptible a la acción de la plasmina en 8 enlaces diferentes mientras que la α_{S1} -caseína, a pesar de ser menos susceptible a la plasmina que la α_{S2} - y β -caseína, puede ser hidrolizada en solución, dando origen a fragmentos conocidos como λ -caseínas, presentes en forma minoritaria (McSweeney, 2011).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

La plasmina es principalmente responsable de la hidrólisis limitada de la β -caseína que ocurre en los quesos madurados internamente con bacterias y su contribución es particularmente importante en los quesos con cocción a altas temperaturas. En este caso, los inhibidores de los activadores del plasminógeno son extensa o completamente desnaturalizados, mientras que el coagulante residual es parcialmente inactivado. Además, el calor durante la cocción provoca la apertura de ciertos dominios plegados (kringle domains o dominios rosquilla) en la estructura espacial del plasminógeno, lo que favorece la acción de los activadores del plasminógeno y así también contribuye a una mayor actividad de plasmina. La plasmina es posiblemente la responsable de la hidrólisis de la α S2-caseína en los quesos durante la maduración (McSweeney, 2011; Ismail y Nielsen, 2011).

3.2.2.3. Enzimas proteolíticas de origen microbiano

Las LAB son débilmente proteolíticas en relación a otros microorganismos, pero poseen un sistema proteolítico, ya que éste resulta esencial para su crecimiento en la leche.

El sistema proteolítico de bacterias del género *Lactococcus* está bien caracterizado e incluye proteinasas de pared celular, sistema de transporte de péptidos y aminoácidos, y una batería de proteinasas y peptidasas intracelulares que en conjunto, son capaces de hidrolizar completamente las caseínas hasta aminoácidos. Sin embargo, su actividad enzimática en el queso durante la

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

maduración estaría concentrada sobre oligopéptidos producidos a partir de la degradación previa de α_{S1} - y β -caseína por quimosina y plasmina, respectivamente.

El sistema proteolítico de *Lactobacillus* spp. está menos estudiado que el de *Lactococcus* spp., pero se sabe que son similares en cuanto a la distribución y propiedades de sus proteinasas y peptidasas. Sin embargo, existen diferencias notables en cuanto al nivel de actividad de estos sistemas dentro del género, ya que los lactobacilos termófilos tendrían una actividad más amplia y completa que los lactobacilos mesófilos, que sólo son capaces de utilizar péptidos pequeños y aminoácidos. El rol de la proteinasa de pared en los lactobacilos termófilos durante la maduración del queso probablemente sería similar al que cumple la de las bacterias del género *Lactococcus*, es decir, la hidrólisis de oligopéptidos, más que de caseínas intactas. Tanto bacterias lácticas del género *Lactococcus* como del género *Lactobacillus* pueden lisarse durante la maduración, lo que libera el contenido enzimático (que continúa siendo activo) en la masa del queso. De esta manera, luego de la lisis celular pueden seguir siendo producidos oligopéptidos y aminoácidos a partir de dichas enzimas microbianas (McSweeney, 2011).

3.2.3. Lipólisis

En todas las variedades de queso existe un cierto grado de ruptura de carácter hidrolítico de las moléculas de triglicéridos o lipólisis, provocando la liberación de ácidos grasos en el queso. En la mayoría de las variedades de quesos, la vía de la lipólisis ocurre en forma moderada. Esta hidrólisis es de naturaleza enzimática y

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

según la variedad de queso considerada, las enzimas responsables de esta transformación pueden ser de origen endógeno, exógeno o nativo de la leche.

En aquellos quesos en que esta vía es muy activa, los productos generados a partir de ella hacen un aporte sustancial a sus características distintivas. Tal es el caso de algunos quesos italianos conocidos como Pecorino (por ejemplo, Pecorino Romano), Provolone, y los quesos tipo Grana, pero el caso más notable es quizás el de los quesos azules. El más conocido de los quesos azules es el Roquefort, en el que ocurre una lipólisis muy extensa debido a las activas lipasas de origen fúngico, producidas por el cultivo adjunto *Penicillium roqueforti*.

En otras variedades de quesos, niveles aun ligeramente por encima de lo habitual tiene un efecto indeseable sobre el flavor, originando el defecto sensorial de rancidez. Tal es el caso de los quesos Cheddar, o aquellos de la familia de quesos holandeses o de la de quesos suizos. Sin embargo, bajas concentraciones de los ácidos grasos de cadena corta (volátiles) son importantes y probablemente esenciales para el flavor de muchas variedades de quesos.

La lipólisis es considerablemente mayor en quesos elaborados con leche cruda en comparación con aquellos elaborados con leche pasteurizada, en los cuales la inactivación térmica de la principal lipasa de la leche, la lipoproteinlipasa y los cambios en la flora nativa de la leche causados por las altas temperaturas de la

pasteurización reducen notablemente el número y la diversidad de microorganismos (McSweeney, 2004).

3.2.4. Principales agentes lipolíticos

3.2.4.1. Lipoproteinlipasa

La lipoproteinlipasa (LPL) es una enzima de origen sanguíneo. Pese a ser muy activa, los triglicéridos en la leche están protegidos de su acción por estar formando parte de los glóbulos grasos, y por lo tanto separados y protegidos de la hidrólisis por la membrana del glóbulo graso, mientras que el 90% de la LPL se halla asociada a las micelas de caseínas. La actividad de la LPL es sólo apreciable en quesos elaborados partiendo de leche cruda (McSweeney, 2004).

3.2.4.2. Esterasa pregástrica

En algunas variedades de quesos como los italianos de tipo Provolone o Pecorino se usan como coagulante, pastas obtenidas por maceración a partir del estómago de animales jóvenes en lactancia, tales como los estómagos de cordero. Esta pasta suele contener, además de la quimosina, altos niveles de la enzima esterasa pregástrica, una lipasa de actividad óptima entre 32-42°C y que es la responsable de los altos niveles de ácidos grasos libres en estas variedades de queso (McSweeney, 2004).

3.2.4.3. Enzimas lipolíticas de origen microbiano

Los niveles de lipólisis en algunos quesos en los que es agregado un fermento secundario, dependen de la actividad lipolítica de las enzimas de dicho cultivo. En este sentido, microorganismos muy lipolíticos asociados con quesos pertenecen al género *Penicillium*, mohos utilizados en la maduración de quesos azules y quesos madurados con mohos en superficie, como el Camembert y el Brie.

En la mayoría de los quesos madurados internamente con bacterias y elaborados a partir de leche pasteurizada no existen agentes lipolíticos fuertes y la lipólisis ocurre lentamente durante la maduración debido a la presencia de enzimas lipolíticas intracelulares correspondientes a la microflora presente en el queso, tanto del fermento primario como de NSLAB. Aunque la acción de estas enzimas es débil, la alta cantidad de bacterias lácticas en los distintos momentos de la maduración y la alta tasa de lisis de las células del fermento primario, son responsables de que los ácidos grasos libres estén presentes en una cantidad moderada pero significativa y que tiende a ser mayor a medida que transcurre la maduración (McSweeney, 2004).

3.2.5. Degradación de compuestos de menor tamaño

Los compuestos generados a partir de las grandes vías de degradación como la proteólisis y la lipólisis (aminoácidos libres y ácidos grasos libres, respectivamente) pueden, junto con el lactato y el citrato presentes en el queso, ser degradados a una gran cantidad de compuestos volátiles, siguiendo un igualmente numeroso conjunto de reacciones bioquímicas.

3.2.5.1. Metabolismo del lactato y citrato

El metabolismo del lactato es de gran importancia en algunas variedades específicas de quesos donde a través de la acción de cultivos adjuntos, está ligada a la producción de compuestos de importancia tecnológica. Tal es el caso de las variedades de quesos tipo suizo, donde por acción del cultivo adjunto *Propionibacterium* se generan, entre otros, ácido propiónico, de importancia para su flavor característico, y CO₂, responsable de la formación de ojos, característica típica en estos quesos (McSweeney y Fox, 2004).

En quesos elaborados sin fermentos adjuntos y a partir de leche pasteurizada, el lactato puede ser oxidado al menos parcialmente por parte de las LAB presentes a una variedad de compuestos que incluye el acetato, etanol, formiato y CO₂, pero estas reacciones están limitadas según el tipo de población NSLAB presente y la disponibilidad de oxígeno, que suele ser baja, en especial en quesos de gran tamaño o envasados con envoltura (Fox y col., 2000). Otra reacción que puede ocurrir es la formación del isómero D-lactato a partir del L-lactato originalmente presente en el queso. La racemización del L-lactato es una secuencia de dos reacciones enzimáticas, la reducción del L-lactato a piruvato y la posterior oxidación del piruvato a D-lactato, y su formación sería consecuencia de la acción de diferentes bacterias lácticas, entre las que podrían encontrarse algunas NSLAB. La racemización del lactato no es importante desde el punto de vista del flavor, pero el D-lactato unido al calcio, de baja solubilidad, puede formar cristales en la masa del queso, dándole una apariencia

anómala que puede generar rechazo por parte del consumidor (McSweeney y Fox, 2004).

En la leche, el citrato suele estar presente en una concentración de alrededor de 1.8 g/L, en su gran mayoría en solución y se pierde junto con el lactosuero durante la coagulación. Un remanente de alrededor de un 5% de este citrato está en fase coloidal y queda retenido en la cuajada. El citrato es un importante precursor de compuestos relacionados con el flavor en variedades de quesos en las que se utilizan cultivos iniciadores mesófilos. Este es el caso de los quesos tipo holandeses en los que las cepas seleccionadas de *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. producen a partir de citrato grandes cantidades de los compuestos diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol, que tienen alto impacto sobre el flavor característico y CO₂, responsable de la generación de ojos típicos. El citrato no es metabolizado por fermentos primarios termófilos. Sin embargo, aun en quesos con estos cultivos, el citrato puede ser metabolizado lentamente a acetoína, acetato y diacetilo por algunas cepas de la flora NSLAB (McSweeney, 2004).

3.2.5.2. Metabolismo de los ácidos grasos libres

Partiendo de la gran variedad de ácidos grasos originalmente presentes en los triglicéridos, los distintos ácidos grasos libres (AGL) que se generan pueden seguir distintas vías catabólicas, dando lugar a una amplia gama de compuestos volátiles. Una de las vías más importantes es la reacción de esterificación entre los diversos ácidos grasos y alcoholes presentes en el queso, que genera ésteres que, por lo

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

general, aportan notas frutales al flavor en quesos. Pese a que suelen estar presentes metil, propil y butil ésteres, debido a que el alcohol que está más disponible para esta reacción es el etanol, los etil ésteres son los que predominan en quesos. El etanol no tiene un único origen, ya que proviene en parte del metabolismo del lactato y en parte de reacciones de degradación de aminoácidos. Por otro lado, producto de la esterificación de los ácidos grasos libres con compuestos que poseen el grupo sulfhidrilo (principalmente metanotiol), se generan los tioésteres (McSweeney, 2004).

La hidroxilación de los ácidos grasos en las posiciones γ - o δ - genera γ - y δ -hidroxiácidos, que a su vez, por esterificación intramolecular puede generar compuestos cíclicos llamados γ - y δ -lactonas, con impacto sobre el flavor. Los ácidos grasos insaturados pueden originar hidroperóxidos que luego al desdoblarse originan aldehídos, tales como butanal, heptanal y nonanal. Posteriores reacciones de oxidación o reducción de estos aldehídos pueden originar los correspondientes ácidos o alcoholes (McSweeney, 2004).

Por último, la reacción de β -oxidación parcial de los ácidos grasos genera compuestos cetónicos conocidos como 2-alcan-onas, o metil cetonas, que además pueden ser reducidos dando origen a los correspondientes alcoholes secundarios. Esta vía es sumamente importante en quesos azules, ya que las metilcetonas están en alta concentración y son componentes fundamentales del flavor característico en este tipo de quesos (McSweeney, 2004).

3.2.5.3. Metabolismo de los aminoácidos libres

Existe una marcada diversidad en las propiedades físicas y químicas de los aminoácidos que componen las proteínas. Es por ello que suelen ser clasificados según los grupos químicos que estén presentes en sus cadenas laterales. Ejemplo de ello son los aminoácidos ácidos, básicos, azufrados y ramificados. Esta diversidad es responsable de una diversidad aún mayor en los compuestos que generan cuando son metabolizados en la matriz del queso durante la maduración. Estos compuestos que se generan a partir de los aminoácidos son en general volátiles, y debido a sus usualmente bajos umbrales de percepción hacen un aporte significativo al flavor, y por ello, se afirma que la principal contribución al flavor del queso que hacen los aminoácidos es de manera indirecta, siendo el sustrato para generar compuestos volátiles.

En las transformaciones que ocurren como producto del catabolismo de los aminoácidos libres (AAL), en algunos casos intervienen enzimas de origen microbiano, ya sea por parte de microorganismos utilizados como fermento o de los NSLAB, así como transformaciones químicas que ocurren sin catálisis enzimática. Aparentemente, los aminoácidos en el queso son catabolizados a través de dos vías principales iniciadas por transaminasas o liasas, si bien otras vías ocurren en menor medida, como son las iniciadas por deaminación y decarboxilación ([McSweeney, 2004](#)).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Pese a la gran cantidad de trabajos de los últimos años en relación al tema, aún no fueron totalmente dilucidadas las vías catabólicas que llevan a la producción de compuestos volátiles a partir de aminoácidos. La diversidad de vías de degradación según la especie e incluso cepa de microorganismo que se considera dificulta el estudio del tema. Además tanto la expresión de los genes que codifican a las enzimas como la ocurrencia de las reacciones puramente químicas están influidas por las condiciones que existen en el ambiente del queso durante la maduración, las cuales pueden diferir de las presentes en estudios en condiciones de laboratorio y realizadas con cepas aisladas (Curtin y McSweeney, 2004).

En una de las vías principales, el primer paso es el de transaminación y está catabolizado por las transaminasas que convierten al correspondiente aminoácido en un α -cetoácido, mientras que en simultáneo el grupo amino se transfiere a otro α -cetoácido, que suele ser α -cetoglutarato para dar así el aminoácido glutamato. Los α -cetoácidos así producidos pueden ser luego degradados a otros compuestos mediante pasos que pueden o no involucrar la participación de enzimas. Estos compuestos que se generan tienen especial impacto sobre el flavor del queso cuando los aminoácidos de partida son metionina, los aromáticos o los de cadena lateral ramificada.

Uno de los posibles caminos posteriores para los α -cetoácidos comprende la reducción mediada por las 2-hidroxiácido deshidrogenasas, para dar hidroxiácidos. Estos compuestos no hacen un aporte significativo al flavor, por lo que la ocurrencia de esta vía reduce los niveles de compuestos volátiles con impacto sobre el flavor. En

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

otra de las vías, los α -cetoácidos pueden ser decarboxilados, dando como producto los correspondientes aldehídos. Estos compuestos pueden a su vez ser oxidados a ácidos carboxílicos o reducidos a alcoholes, pudiendo ambos participar en la formación de ésteres. Los α -cetoácidos pueden también pasar directamente a ácidos carboxílicos por la reacción de decarboxilación oxidativa en la que intervienen las enzimas α -cetoácido deshidrogenasas. Sin embargo, esta vía no es frecuentemente utilizada por los microorganismos presentes en el queso. Una cuarta posible vía de oxidación química se ha reportado para los α -cetoácidos derivados de fenilalanina, tirosina y triptófano, que puede originar benzaldehído, hidroxibenzaldehído e indol-3-acetato, que resultan inestables y pueden degradarse dando otros compuestos volátiles activos (Curtin y McSweeney, 2004).

La segunda vía principal del catabolismo de los aminoácidos incluye una reacción de eliminación en la que el grupo lateral de los aminoácidos metionina, fenilalanina y tirosina es escindido del resto de la molécula. Las enzimas involucradas son las liasas. Esta vía es de suma importancia debido a que es la principal vía de degradación de metionina y, considerando los bajos niveles de cisteína en quesos, es por lo tanto la principal vía de producción de compuestos azufrados como metanotiol, dimetildisulfuro y dimetiltrisulfuro (Curtin y McSweeney, 2004; McSweeney, 2011).

Los AAL pueden ser también degradados mediante las reacciones de deaminación en las que el nitrógeno es eliminado de la molécula como ión amonio,

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

intervienen deshidrogenasas y se producen α -cetoácidos, o mediante las reacciones de oxidación en las que intervienen oxidasas y se forman aldehídos. El ión amonio producido en estas reacciones contribuye al flavor en algunas variedades de quesos madurados en superficie y, en suficientes cantidades, contribuye a elevar el pH del queso (McSweeney, 2004).

Otras transformaciones importantes incluyen un primer paso en el que ocurre una decarboxilación, como consecuencia de la cual se generan aminas que tienen un aporte fuerte al flavor y por encima de ciertos niveles, provoca un flavor desagradable. Igualmente importante es la generación de aminas biógenas. Ejemplo de ellas son tiramina, histamina, feniletilamina y triptamina, que se producen a partir de tirosina, histidina, fenilalanina y triptófano, respectivamente. La producción de aminas en quesos, en general indeseable, ocurre a una tasa que depende de las concentraciones de sus precursores aminoácidos, pero en mayor medida, de la actividad de las decarboxilasas de la microflora presente en el queso, la cual es afectada por el pH, la temperatura de maduración y la concentración de sal (McSweeney, 2004).

3.2.6. Compuestos volátiles presentes en quesos

Teniendo en cuenta el conjunto de las vías catabólicas que ocurren en el queso a partir del lactato, citrato, ácidos grasos y aminoácidos libres, se pueden agrupar a los principales compuestos volátiles que se generan (Le Quéré, 2011).

3.2.6.1. Ácidos grasos

Debido a sus bajos umbrales de percepción, sólo los AGL de cadena par de entre 2 y 12 átomos de carbono de longitud hacen por sí mismos un aporte considerable al flavor. El origen de estos AGL de cadena más corta está en la lipólisis, pero también en las reacciones de degradación del lactato y los aminoácidos para aquellos de 2 a 6 átomos de carbono. Si bien en bajas concentraciones, aportan aromas característicos, cuando están presentes por encima de cierto nivel crítico de concentración generan características atípicas de flavor, en general asociadas con la percepción de rancidez ([Le Quéré, 2011](#)).

3.2.6.2. Cetonas

En su mayoría son metilcetonas de cadena lineal impar de 3 a 15 átomos de carbono, derivadas de la β -oxidación de los AGL. Las más comunes en quesos son las 2-heptanona y la 2-nonanona y están presentes en concentraciones muy elevadas en quesos madurados con hongos, en los que son componentes claves del flavor característico. Algunas metilcetonas de cadena ramificada o insaturada también pueden ser encontradas en quesos, así como metilcetonas de cadena lineal par en estadios avanzados de la maduración. Otras cetonas muy comunes en quesos son la acetoína (3-hidroxi-2-butanona) y el diacetilo (2,3-butanodiona), formadas a partir del metabolismo del citrato ([Le Quéré, 2011](#)). En variedades de quesos madurados por períodos prolongados de tiempo, puede ocurrir que la concentración de muchas cetonas alcance un máximo en los primeros meses de maduración y que luego disminuyan debido a la transformación en otros compuestos ([Collins y col., 2004](#)).

3.2.6.3. Alcoholes

Puede considerarse que como grupo, los alcoholes son un punto de confluencia de vías catabólicas correspondientes al lactato, citrato, AGL y AAL. El etanol y el 2,3-butanodiol pueden ser producidos como consecuencia del metabolismo del lactato. Los alcoholes secundarios presentes en quesos se originan típicamente por reducción de las metilcetonas, mientras que algunos alcoholes primarios se originan por reducción de aldehídos, incluidos en el catabolismo de los aminoácidos (Le Quéré, 2011).

3.2.6.4. Lactonas

Como se mencionó anteriormente, las lactonas provienen del catabolismo de los ácidos grasos y las más comunes son γ - y δ -lactonas. Generalmente se caracterizan por su aporte de notas frutales al flavor en quesos (Le Quéré, 2011).

3.2.6.5. Ésteres

La reacción de esterificación tiene importancia para la detoxificación del medio, ya que permite eliminar ácidos grasos y alcoholes que resultan tóxicos para los microorganismos presentes. Existe una gran diversidad de ésteres en quesos. La esterificación ocurre directamente entre ácidos grasos de cadena corta o media y alcoholes, derivados del metabolismo del lactato (etanol) o de la degradación de aminoácidos o a través de reacciones de transesterificación. Los ésteres se caracterizan por aportar notas frutales y florales. Debido al bajo umbral de percepción que en general tienen, su aporte al flavor en quesos es significativo y en

ciertas variedades de quesos (por ejemplo, Cheddar) puede ser considerado una característica sensorial atípica (Le Quéré, 2011).

3.2.6.6. Aldehídos

Existe una gama de aldehídos en quesos como resultado de la actividad de distintas vías. Los aldehídos son considerados compuestos que están presentes transitoriamente en quesos, debido a que pueden ser transformados relativamente rápido a alcoholes o ácidos. Los aldehídos de cadena recta generalmente son producidos a partir del catabolismo de los ácidos grasos, mientras que los de cadena ramificada se originan a partir de aminoácidos, luego de las reacciones de transaminación. El acetaldehído se produce en el catabolismo de treonina, y en el caso de benzaldehído, su origen aún no ha sido establecido. Los aldehídos más comunes en quesos son hexanal, heptanal, nonanal, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y benzaldehído (Le Quéré, 2011).

3.2.6.7. Compuestos azufrados

Los distintos compuestos azufrados presentes en quesos son responsables de un amplio rango de notas de flavor características en distintas variedades de quesos, ya que las propiedades sensoriales de estos compuestos sulfurados son notables aun en concentraciones sumamente pequeñas. El origen de muchos de los compuestos azufrados presentes en quesos es la producción de metanotiol a partir de la degradación enzimática del aminoácido metionina (Le Quéré, 2011).

3.2.6.8. Aminas

Existe una amplia variedad de aminas en quesos. Las aminas primarias se producen como consecuencia de la decarboxilación enzimática de los aminoácidos. Ejemplos de ellas son metilamina, etilamina, N-propilamina, isopropilamina y las aminas biógenas. Igualmente puede verificarse la presencia de aminas secundarias y terciarias, que están presentes en menores concentraciones pero también tienen umbrales de percepción más bajos que las aminas primarias. Por último, las aminas pueden originar otros compuestos, como aldehídos por deaminación oxidativa (Le Quéré, 2011).

3.3. Aspectos de la evaluación sensorial de quesos

3.3.1. Técnicas de evaluación sensorial

Las propiedades sensoriales de los productos lácteos (aroma, flavor, textura y apariencia) son las que básicamente determinan la aceptación por parte del consumidor y el deseo de volver a consumir un producto, con alguna contribución adicional basada en su valor nutritivo y sus potenciales efectos beneficiosos para la salud. La mayor parte de las propiedades sensoriales son complejas por definición, al ser consecuencia de un estímulo generado por la integración de muchas propiedades composicionales y estructurales diferentes y, por esta razón, no pueden ser adecuadamente detectadas o representadas por técnicas analíticas. Sin embargo, debido al sofisticado funcionamiento de los sistemas sensoriales humanos, aun un pequeño cambio en la composición puede ser detectado como un cambio en una característica sensorial y es así que la evaluación sensorial pasó a ser rutinariamente

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

utilizada en la industria láctea, en particular para el aseguramiento de la calidad, pero también y más recientemente, como una poderosa herramienta para la investigación (Drake y Delahunty, 2011).

La evaluación sensorial puede definirse como una disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones de las personas a las características de los alimentos y los materiales tal como son percibidos por los sentidos de la visión, gusto, olfato, tacto y audición. De una manera muy general, puede agruparse a las técnicas de evaluación sensorial en tres grandes categorías: las de valoración o puntuación de la calidad, las pruebas de análisis sensorial y las de afectividad o sensoriales centradas en el consumidor. Las dos últimas categorías comprenden una gran cantidad de técnicas precisas, con sólidos y establecidos fundamentos científicos para la medición de las respuestas sensoriales a los alimentos u otros estímulos (Drake y Delahunty, 2011).

Dentro de las pruebas de análisis sensorial se puede distinguir por un lado a las pruebas de discriminación, como la prueba de comparaciones pareadas, en las que evaluadores no entrenados comparan características sensoriales entre dos o más productos para detectar diferencias entre ellos, y las pruebas de evaluación sensorial descriptiva por el otro, en las que existe un conjunto de evaluadores sensoriales entrenados o panel sensorial, que analiza de manera objetiva diferentes características del producto (Drake y Delahunty, 2011).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Los test de evaluación sensorial descriptiva son un conjunto de técnicas que buscan diferenciar un rango de productos sobre la base de todas sus características sensoriales y determinar una descripción cuantitativa de todos los atributos sensoriales, y no solamente los defectos. Así, los métodos de evaluación sensorial descriptiva constituyen una herramienta adicional para la aplicación en investigación, desarrollo de productos y estudios de mercado. Estos métodos utilizan un panel de asesores y por lo tanto el resultado obtenido representa un consenso que es menos subjetivo y menos susceptible a sesgos, que el resultado obtenido cuando es un solo experto el que lleva a cabo la evaluación. Un panel sensorial entrenado opera como un instrumento de medida y provee datos que resultan comparables en su naturaleza a los de naturaleza instrumental. Las características sensoriales de un producto lácteo que pueden ser cuantificadas incluyen todas las propiedades de aroma, apariencia, flavor, textura, gusto residual y aun sonido de un producto que pueda ayudar a distinguirlo de otros. Existen numerosos métodos de análisis descriptivo, incluyendo el método de perfil de flavor, el método de perfil de textura, el método *Spectrum*, el de obtención de perfiles por libre elección y el método descriptivo cuantitativo (Drake y Delahunty, 2011).

La implementación de cada método de análisis descriptivo tiene tres etapas. La primera incluye la selección de un panel de evaluadores para llevar a cabo la evaluación sensorial, la segunda incluye el desarrollo y la definición de una terminología específica, o vocabulario mediante el cual describir las características sensoriales del producto y la tercera incluye la cuantificación de estas características

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

sensoriales. A pesar de las diferencias que puedan presentar en cuanto a los enfoques de los procedimientos, todos los métodos de evaluación sensorial descriptiva apuntan a una misma meta: la de entrenar a un grupo de individuos para operar al unísono como un instrumento mediante el cual poder identificar y cuantificar atributos sensoriales (Drake y Delahunty, 2011).

El método de evaluación sensorial por análisis descriptivo cuantitativo fue desarrollado hacia 1974 y provee datos descriptivos que pueden ser analizados estadísticamente. Puede producir una descripción sensorial completa desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. Los panelistas, generalmente en un número de 8 a 15, que son seleccionados por su habilidad para describir y discriminar productos en la categoría a ser estudiada, acuerdan una lista de atributos cualitativos y luego trabajan individualmente para estimar la magnitud de los atributos sobre una escala lineal con extremos fijos. Los evaluadores reciben un entrenamiento limitado y el principal objetivo para ellos es el de ser autoconsistentes, más que consistentes con el resto del panel. Las evaluaciones son hechas reiteradas veces (2-6 evaluaciones repetidas) y los datos son transformados en puntajes promedio y analizados estadísticamente. El desempeño individual de cada evaluador es monitoreado y comparado con el del panel. El análisis descriptivo cuantitativo es una técnica de análisis sensorial que puede ser usada en una variedad de aplicaciones (Kemp y col., 2009). El método de análisis descriptivo cuantitativo tiene como ventajas que provee un protocolo rápido para la selección de los evaluadores, para el entrenamiento del

panel y para la evaluación sensorial descriptiva y no requiere una precisa definición y referencia de las características sensoriales del producto (Drake y Delahunty, 2011).

3.3.2. Principales características sensoriales

La gran diversidad en las distintas prácticas de elaboración de quesos y el número de etapas que ocurren durante la manufactura, resulta en una amplia variedad de quesos, cada uno de los cuales tiene características sensoriales complejas. La evaluación sensorial de los quesos es necesaria para determinar los méritos relativos de los procedimientos de elaboración y la influencia de los datos de la composición que fueron medidos sobre las características sensoriales específicas del queso. Ésta resulta también de importancia para determinar la influencia de las características sensoriales sobre la calidad del alimento y la aceptación por parte del consumidor. En los últimos años, numerosos reportes se han presentado sobre la aplicación del análisis sensorial descriptivo para determinar con precisión la influencia de las variables del proceso de elaboración (por ejemplo, tiempo y temperatura de maduración, cultivo primario o uso de cultivos adjuntos) sobre las características sensoriales del queso. Buscar la relación entre información sensorial referente a flavor y/o textura con mediciones de compuestos químicos y mediciones instrumentales es un área de investigación muy importante y en pleno desarrollo. Establecer las relaciones claves entre lo percibido sensorialmente y la reología o la química del flavor provee el potencial de vincular el flavor o textura del queso a la tecnología empleada para su producción (Delahunty y Drake, 2004).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Entre las características sensoriales de mayor importancia en quesos, se incluyen las de apariencia, textura y flavor. Las características de **apariencia** son evaluadas visualmente, en general antes de ingerir el queso, o durante la preparación de este queso para su consumo cortándolo o untándolo. Estas características incluyen el color, la presencia de ojos, mohos, corteza y textura visual. Además, la apariencia incluye la imagen en la que el queso es comercializado (tamaño, forma, presentación o envoltorio), ya que es la forma más común en que es adquirido por el consumidor (Delahunty y Drake, 2004).

La **textura** puede ser definida como el atributo de un queso que resulta de la combinación de las propiedades físicas, incluyendo el tamaño, forma, número, naturaleza y conformación de los elementos estructurales constitutivos, que son percibidos por la combinación de los sentidos del tacto (textura táctil), visión (textura visual) y audición (textura auditiva). Las características texturales que se describen frecuentemente en quesos incluyen la firmeza, gomosidad, granulosis, cohesividad y adhesividad (Delahunty y Drake, 2004).

El **flavor** es a menudo definido como la percepción integrada de los estímulos olfatorios, gustativos y quemestésicos (trigeminales). Dado que flavor (palabra de origen inglés) no posee traducción en algunos idiomas, incluido el castellano, se adopta como vocablo adecuado para expresar este concepto en términos generales y globalizadores (Belitz y col., 2009). El olor y aroma de los quesos dependen de un gran número de compuestos volátiles de diversa naturaleza química, cada uno de los

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

cuales puede tener un carácter distintivo. Entre estos compuestos identificados se incluyen ácidos grasos, ésteres, metilcetonas, hidrocarburos, alcoholes de cadena corta y larga, alcoholes aromáticos, aldehídos, aminas, fenoles y compuestos azufrados. El gusto es otro aspecto del flavor. Se localiza en la cavidad oral, principalmente en la lengua. El estímulo primario del gusto son compuestos no volátiles que entran en contacto con los receptores gustativos. Este contacto crea las percepciones de las sensaciones gustativas básicas, que son el gusto salado, dulce, ácido, amargo y umami. Entre los compuestos que contribuyen directamente al gusto en quesos se incluye al ácido láctico (gusto ácido), cloruro de sodio y otras sales minerales presentes en menor proporción (gusto salado) y aminoácidos libres y péptidos de distintos tipos (gustos dulce, amargo y umami). Otro aspecto del flavor es el quemestésico. Este término se utiliza para describir el sistema sensorial responsable de detectar irritantes químicos. Esta detección es más general que aquella para el gusto y el aroma y ocurre principalmente en los ojos, nariz y boca. La percepción se relaciona con las características somatosensoriales del dolor y los cambios de temperatura y es la que se pone en juego cuando se perciben las sensaciones picantes, refrescantes o astringentes (Delahunty y Drake, 2004).

3.4. Aceleración de la maduración de quesos

3.4.1. Métodos para acelerar la maduración

Acelerar la maduración de quesos ha sido siempre un objetivo para bajar el costo que significa tener grandes volúmenes de producto almacenados durante periodos de tiempo prolongados. Los beneficios asociados son la disminución de los

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

costos de refrigeración, trabajo e inventariado, el aumento de la producción de quesos en países en vías de desarrollo, donde las inversiones en instalaciones para el almacenamiento de los quesos puede ser un factor limitante y la rápida producción de flavor en el queso ([Azarnia y col., 2006](#)). En el caso de los quesos duros, esta posibilidad resulta especialmente interesante debido a que son los quesos con mayor tiempo de maduración. Por lo tanto, con el objetivo de encontrar alternativas para acelerar la maduración de quesos, en las últimas décadas se realizaron numerosas investigaciones.

La implementación de una modificación en un proceso tecnológico se hace con el fin de obtener un determinado beneficio. Sin embargo, esta implementación puede tener desventajas, las que no deberían ir en detrimento del beneficio para el que fue concebida. Según [Walstra y col. \(2006\)](#), las condiciones generales para que un proceso de aceleración de la maduración sea exitoso son:

- Las propiedades del queso deben ser similares a aquellas correspondientes al producto que se toma como referencia (queso control).
- Se debe evitar que el queso madure en exceso.
- Los costos asociados a la aplicación de la nueva estrategia no deben exceder a los beneficios económicos que representa la disminución en el tiempo de maduración.
- Los aspectos legales y relacionados con la salud pública deben ser debidamente tenidos en cuenta.

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Entre las alternativas más comúnmente empleadas para la aceleración de la maduración de quesos, se incluyen la utilización de *slurries* de queso, el uso de enzimas exógenas agregadas en forma libre o microencapsuladas, el uso de cultivos iniciadores atenuados, cultivos adjuntos y cultivos iniciadores producidos por ingeniería genética y/o enzimas recombinantes, así como el uso de temperaturas de maduración elevadas (Azarnia y col., 2006; El Soda y Awad, 2011).

Los *slurries* de queso son el producto obtenido de incubar en condiciones óptimas una mezcla de cuajada fresca con un conjunto de enzimas específicas, de manera de obtener rápida y económicamente, un flavor intenso de queso. El procedimiento base consiste en mezclar la cuajada fresca con una solución de NaCl para hacer una emulsión de aproximadamente 40% de sólidos. A este preparado se agregan enzimas y otros aditivos y la mezcla es incubada en anaerobiosis a temperaturas mayores o iguales a 30°C por 4-5 días con agitación. Estos *slurries* de quesos han sido utilizados como ingrediente en la producción de quesos con el objetivo de acelerar la maduración, siendo conocidos como quesos modificados con enzimas (El Soda, 1993). Una importante desventaja de esta tecnología es la dificultad para poder controlar el proceso. Además es probable que ocurra contaminación microbiana, debido a la temperatura de incubación relativamente alta y por los períodos prolongados que se emplean (El Soda y Awad, 2011). Es por ello que actualmente los *slurries* de queso son utilizados principalmente en la elaboración de productos como las formulaciones de queso procesado, salsas y productos tipo

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

snack, con el objetivo de intensificar el gusto a queso o aportar flavor de queso a un producto no lácteo (Azarnia y col., 2006).

Una de las alternativas de aceleración de la maduración de quesos que más atención ha recibido es la de aumentar de manera artificial la cantidad de algunas de las enzimas que intervienen en la maduración, mediante el agregado de enzimas exógenas. Se ha probado el agregado de proteinasas, peptidasas, lipasas y esterases, provenientes de diversas fuentes, ya sea agregadas a la leche o a la cuajada, en forma individual o combinada (El Soda y Awad, 2011). Actualmente estas enzimas son comercializadas por distintas compañías, siendo las proteinasas de diversos orígenes las más usadas para acelerar la maduración de quesos. También se ha estudiado el uso de proteínas que actúen como activadores del plasminógeno (por ejemplo estreptoquinas) con el fin de aumentar la proteólisis por plasmina (Azarnia y col., 2006). El efecto del agregado de lipasas y esterases se ha investigado principalmente en aquellas variedades de queso en las que se conoce que la vía lipolítica tiene un aporte más significativo al flavor como por ejemplo en quesos Provolone, Caciocavallo y quesos azules. Entre las enzimas involucradas en el metabolismo de los hidratos de carbono, sólo se ha probado la β -galactosidasa con resultados dispares (El Soda y Awad, 2011).

En la elaboración del queso, las enzimas exógenas pueden ser incorporadas directamente con la leche, por adición directa a los bloques de queso, o durante la etapa de salado, si éste se realiza en seco (Azarnia y col., 2006). Las limitaciones

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

principales en el uso de enzimas exógenas dependen del método por el cual son incorporadas. Cuando las enzimas son incorporadas a la leche, sólo una pequeña cantidad es retenida en la cuajada, mientras que el resto se pierde en el suero, con lo que se incrementan mucho los costos. Además, otras dificultades que se presentan en la aplicación de esta tecnología son la reducción en el rendimiento quesero y defectos en el flavor debido a proteólisis durante la manufactura y en las etapas tempranas de maduración, así como la contaminación del suero de quesería con la enzima agregada. La adición de preparaciones comerciales de proteinasas puede conducir en muchos casos al desarrollo de gusto amargo así como al ablandamiento de la masa. El desarrollo de sabor amargo puede reducirse considerablemente con la adición de mezclas de proteinasas y peptidasas, pero los defectos de textura y flavor pueden seguir siendo un problema (El Soda y Awad, 2011). Por el contrario, en quesos que son salados en seco, como el Cheddar, la adición de enzimas a la cuajada es eficiente, ya que pueden incorporarse junto con la sal, inmediatamente antes del prensado. Sin embargo, en este caso surge como desventaja la presencia de zonas donde la enzima y su acción se han concentrado más, debido a una distribución ineficaz de la misma (El Soda y Awad, 2011). Una desventaja adicional de esta tecnología es la baja disponibilidad de enzimas comerciales aprobadas para ser usadas en la maduración de quesos. Como consecuencia, el uso directo de enzimas exógenas no es una práctica muy extendida para acelerar la maduración de quesos (Azarnia y col., 2006).

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

En un intento de no descartar el uso de enzimas exógenas para acelerar la maduración y a la vez superar las desventajas que surgen cuando son incorporadas en forma libre, se han desarrollado métodos de atrapamiento o encapsulación de enzimas antes de su adición al queso. Luego de la coagulación, las cápsulas quedan retenidas en la cuajada, evitando el contacto con sus sustratos hasta que ocurra la ruptura de la cápsula durante la maduración del queso. Uno de los métodos desarrollados consiste en la encapsulación de extractos libres de células de origen bacteriano dentro de cápsulas de grasa láctea o de células bacterianas enteras con sus sustratos adecuados, lo que posibilita la liberación de las enzimas dentro de la masa del queso y en condiciones más controladas. Este enfoque ha sido aplicado para la intensificación del flavor en quesos bajos en grasa y para la producción de queso con flavor intensificado para ser usado en la industria de *snacks*. Sin embargo, debido al bajo punto de fusión de la grasa láctea, estas cápsulas son inestables a las temperaturas de cocción de la cuajada y por lo tanto esta aplicación no es apropiada para muchos tipos de quesos. En otro método desarrollado, las proteinasas son encapsuladas utilizando κ -carragenatos o goma gellan y luego las cápsulas con enzimas son incorporadas a la leche durante la elaboración del queso. Las cápsulas de estos materiales mostraron tener mayor retención y menor pérdida de enzimas que en el caso de las de grasa láctea. Un tercer método consiste en inmovilizar enzimas dentro de vesículas fosfolipídicas llamadas liposomas, de manera de proteger a las proteínas lácteas de la acción de las enzimas durante el proceso de elaboración del queso y así limitar el desarrollo de sabor amargo y las pérdidas de rendimiento. La tecnología de los liposomas es un método científicamente atractivo, que ha sido

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

ampliamente usado en la industria farmacéutica, pero su uso, aunque promisorio, es aún limitado en la industria quesera. Entre las razones por las que esto ocurre se menciona que los ingredientes son costosos y que los materiales que generalmente son usados para producir los liposomas no son vistos como seguros o comestibles. Actualmente, también es una limitación la falta de métodos apropiados para la producción en gran escala y la baja eficiencia de encapsulación de los liposomas ([El Soda y Awad, 2011](#)).

Las bacterias pertenecientes al cultivo iniciador (SLAB), cumplen un rol importante durante la maduración y desarrollo del flavor en quesos. Sin embargo, una presencia excesiva de estos microorganismos con el fin de acelerar la maduración puede conducir a una sobreacidificación de la cuajada, con todas las desventajas tecnológicas que esto implica. Por lo tanto, es interesante desarrollar cultivos iniciadores con capacidad limitada de producir ácido y que sean capaces de liberar sus enzimas intracelulares a la masa del queso. Una manera de lograr este objetivo es utilizar células de supervivencia reducida mediante la exposición previa a condiciones agresivas, fenómeno conocido como atenuación. Existen diversas técnicas para producir fermentos primarios atenuados, entre las que se incluye el choque térmico por calentamiento o por congelación, el secado spray, el uso de liozimas y la inducción de mutantes ([El Soda y Awad, 2011](#)).

El desarrollo y la implementación de procedimientos cada vez más asépticos durante los procesos de recolección de la leche en los establecimientos rurales y de

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

manufactura del queso en las plantas industriales lácteas conducen a una dramática disminución en el número de NSLAB, las cuales realizan un aporte positivo en el desarrollo del flavor en quesos (El Soda y Awad, 2011). Con vistas a suplementar esta microflora perdida, intensificando así el desarrollo del flavor y la textura en quesos, se ha estudiado el agregado de diversos microorganismos, algunos de ellos identificados como integrantes habituales de la flora NSLAB, para favorecer diferentes tipos de reacciones proteolíticas y asociadas a la producción del flavor. Si bien se han obtenido resultados positivos, dada la complejidad de evaluar la influencia que cada especie y cepa de microorganismo tiene sobre la bioquímica de la maduración de quesos, son necesarios estudios adicionales para obtener conclusiones más generales (Azarnia y col., 2006).

En las últimas dos décadas se han desarrollado versiones genéticamente modificadas de las bacterias lácticas comúnmente presentes en quesos. Esta base de conocimiento está tan desarrollada que actualmente muchas bacterias lácticas han sido obtenidas usando vectores y marcadores genéticos de grado alimentario, lo que ha permitido que se lleven a cabo estudios sobre la incorporación de este tipo de microorganismos durante la elaboración de quesos. Las modificaciones genéticas se han realizado para favorecer la producción de algunas de las enzimas o para introducir cambios en la especificidad de proteinasas, en el balance de peptidasas y/o en las propiedades líticas de las bacterias en el queso. Sin embargo, la aplicación de esta tecnología tiene inconvenientes desde el punto de vista de la seguridad

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

alimentaria y debido a la falta de aceptación de los consumidores y la industria (Azarnia y col., 2006).

Un número importante de trabajos fue publicado en relación a la aceleración de la maduración de quesos mediante el uso de temperaturas de almacenamiento elevadas. Una mayor temperatura representa un riesgo en términos del posible crecimiento de contaminantes microbianos no deseados y la posibilidad de sobrevivencia de microorganismos patógenos o responsables de intoxicaciones alimentarias, lo que obliga a centrar la atención en la calidad de la leche y las condiciones higiénicas usadas para la producción de queso. Además, todas las reacciones bioquímicas involucradas en la maduración del queso pueden ser aceleradas por igual a temperaturas elevadas, pudiéndose así propiciar la aparición de flavor desbalanceado o características atípicas del flavor (Azarnia y col., 2006). Sin embargo, aumentar la temperatura de maduración ofrece a la industria el método que resulta tecnológicamente más simple y sumamente accesible desde el punto de vista económico, mediante el cual es posible acelerar las reacciones asociadas al desarrollo del flavor en un queso. Además, los menores costos de refrigeración pueden proveer un ahorro neto adicional al productor (El Soda y Awad, 2011). Otra ventaja es que los métodos de aceleración de la maduración por aumento de la temperatura no implican el agregado de ningún agente externo a la masa del queso. Así, son métodos cuya aplicación sería permitida para el caso de quesos cuya producción está regulada por la denominación de origen protegida (Ferraiza y col., 2004).

3.4.2. Aceleración de la maduración por aumento de la temperatura de almacenamiento

A medida que la industria de elaboración de quesos fue desarrollándose a escalas mayores, comenzó a crecer el interés por alternativas tecnológicas tendientes a lograr una reducción en el período de almacenamiento. Consecuentemente, durante la segunda mitad del siglo XX se profundizaron las investigaciones sobre este aspecto. Hacia el año 1992, unos 200 trabajos habían sido publicados abordando esta temática. Una de las primeras alternativas fue la de recurrir a aumentos en la temperatura a la que los quesos generalmente son almacenados. Ya en 1946, Sanders y col. presentaron un estudio en el que quesos Cheddar elaborados a partir de leche pasteurizada podían ser madurados en 3-4 meses sin defectos en el flavor y calidad, si la temperatura de almacenamiento era de 16°C, notablemente superior a la temperatura tradicional para este queso de alrededor de 8°C (El Soda, 1993). Esta alternativa de aumentar la temperatura de almacenamiento para acelerar la maduración de quesos, de acuerdo a leyes generales de la biología y la bioquímica, tiene como fundamento teórico que la mayor temperatura acelera la actividad de las enzimas involucradas en la maduración del queso, así como el crecimiento y la tasa metabólica de los microorganismos presentes, y que tienen efecto en el proceso de maduración (Law, 2001).

Una gran parte de las experiencias de aceleración de la maduración por aumento de temperatura consistieron en mantener la temperatura elevada y constante durante todo el período de almacenamiento. Así, se estudió el efecto de la elevación

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

de la temperatura de almacenamiento sobre índices relacionados con la proteólisis y la lipólisis, sobre el flavor mediante evaluación sensorial y sobre las características texturales mediante ensayos reológicos para quesos Manchego madurados a tres temperaturas (8, 12 y 16°C) y fabricados utilizando leche cruda y pasteurizada (Gaya y col., 1990). Se encontró que a mayor temperatura de maduración se obtuvo una textura más firme, debido a que el contenido de humedad disminuyó considerablemente. En el análisis sensorial se evaluaron dos parámetros globales: calidad e intensidad de flavor. La elevación de la temperatura no mejoró la calidad del flavor, aunque sí mejoró la intensidad del mismo. Mayores temperaturas de maduración aumentaron la proteólisis, ya que se observaron mayores niveles de contenidos de nitrógeno en distintos extractos. A 4 meses de maduración, los niveles de ácidos grasos libres totales fueron significativamente mayores a mayor temperatura empleada durante la maduración.

Folkertsma y col. (1996) usaron diferentes combinaciones temperatura-tiempo durante la maduración de quesos Cheddar a fin de estudiar el efecto de las diferentes condiciones ensayadas sobre la proteólisis, la lipólisis y los atributos sensoriales. Se maduraron quesos a 8, 12 y 16°C durante todo o parte del período de almacenamiento. Se observó que mayores temperaturas provocaron una aceleración de la proteólisis primaria, secundaria y la lipólisis. Además, durante los primeros tres meses, aquellos quesos madurados a temperaturas elevadas recibieron mayores puntajes por sus propiedades sensoriales que los madurados a la temperatura convencional de 8°C. Los quesos madurados a 12°C recibieron el mayor puntaje en

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

cuanto a textura y los madurados a 16°C, el mayor puntaje en cuanto a flavor. Sin embargo, en etapas más avanzadas de la maduración se observaron efectos negativos en las características sensoriales. Así por ejemplo, en quesos madurados a 16°C se observó pérdida de calidad en la textura por ablandamiento de la masa del queso desde los 6 meses en adelante. Se observaron también puntajes más bajos en atributos relacionados con el flavor en quesos madurados a 12 y 16°C con respecto a los quesos control.

Recientemente, [Pachlová y col. \(2012\)](#) investigaron el efecto de aumentar en 6°C la temperatura de maduración de queso Edam (llevando la temperatura a 16°C) sobre distintos aspectos de la maduración: composición microbiológica, análisis de textura, análisis sensorial, contenido de aminoácidos libres y de aminos biógenas. El queso control fue madurado durante 112 días y el experimental en la mitad de tiempo, es decir, 56 días. Se encontraron mayores recuentos de lactobacilos mesófilos durante los primeros 30 días en aquellos quesos madurados a mayor temperatura. Las concentraciones de aminoácidos libres también fueron significativamente afectadas por la mayor temperatura de maduración. A 56 días, las concentraciones de aminoácidos en los quesos experimentales eran alrededor del doble que en los quesos control a ese mismo tiempo, e igual a la de los quesos control a 112 días, sugiriendo un aumento de la actividad proteolítica. Durante todo el proceso de maduración, la formación de las aminos biógenas tiramina, putrescina y cadaverina en quesos experimentales fue mayor que en quesos control, probablemente debido a una mayor actividad de las decarboxilasas, de origen

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

microbiano. Estas concentraciones mayores se consideraron fuera del rango seguro para la salud. Tanto los quesos experimentales a 56 días como los quesos control a 112 días de maduración fueron evaluados por un panel de consumidores como quesos de buena calidad sensorial y sin defectos. Los parámetros evaluados indicaron que el aumento en la temperatura de maduración mencionado permitió reducir el tiempo de maduración a aproximadamente la mitad. Sin embargo, la temperatura de maduración elevada provocó una mayor producción de algunas aminos biógenas.

A pesar de que los beneficios de usar temperaturas de maduración elevadas están documentados desde hace años, esta tecnología aún no se ha implementado ampliamente a nivel comercial. Aparentemente, la razón es el temor al deterioro por microbios y a incrementos inespecíficos en las reacciones de maduración que conduzcan a un desbalance o impredecibilidad en la producción del flavor, lo cual no parece compensar los beneficios asociados a una disminución en el tiempo de almacenamiento ([Hannon y col., 2005](#)). Una alternativa para prevenir el posible deterioro del producto debido a la aplicación durante largos períodos de temperaturas elevadas es la de acortar la duración del intervalo de tiempo, esto es, usar una combinación de las condiciones de temperatura-tiempo de manera que la mayor parte del período de maduración transcurra a la temperatura convencional de almacenamiento de la variedad específica de queso, mientras que una temperatura elevada se use para un período de tiempo más reducido.

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Sobre la base de este concepto, entre 1983 y 1985 se publicó una serie de trabajos sobre distintas alternativas para acelerar la maduración de queso Cheddar por aumento de la temperatura de almacenamiento y se estudió el efecto que estas alternativas tenían sobre algunos parámetros relacionados con la proteólisis y las características sensoriales del queso. En una de las experiencias, [Aston y col. \(1983\)](#) pusieron énfasis en que el aumento de temperatura se implemente durante los primeros 1-2 meses del período total de maduración de 8 meses. Se estudiaron combinaciones temperatura-tiempo utilizando temperaturas de 13 y 20°C en comparación con los 8°C en que fueron madurados los quesos control y se encontraron mayores valores en índices de proteólisis a medida que la temperatura de maduración aumentaba respecto de aquellas habitualmente usadas para esta variedad de queso. No se observó el desarrollo de características sensoriales anómalas en ninguno de los tratamientos ensayados. En otra de las experiencias, [Fedrick y col. \(1983\)](#) ensayaron incrementos similares a los discutidos anteriormente, pero implementados en un período intermedio de la maduración (después de los tres primeros meses de maduración a una temperatura convencional de 8°C). También se encontró un mayor valor en índices de la proteólisis a mayor temperatura de maduración y mayor tiempo de aplicación de esta temperatura elevada con respecto de aquellas habitualmente usadas para esta variedad de queso. No se observó desarrollo de características sensoriales anómalas en ninguno de los tratamientos ensayados. Sin embargo, por razones de practicidad, los autores consideraron más conveniente que la temperatura elevada sea aplicada al principio del período de almacenamiento. Finalmente, [Aston y col. \(1985\)](#) ensayaron condiciones de

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

maduración más severas, empleando temperaturas de hasta 20°C durante más tiempo, incluso abarcando todo el período de maduración (quesos madurados durante 8 meses a 17.5 y 20°C). Al igual que en las experiencias anteriores, encontraron que los índices de avance de la proteólisis eran mayores a medida que crecía la severidad del tratamiento (es decir, a mayores temperaturas y a mayor tiempo en el que esta temperatura era mantenida). También encontraron que las características sensoriales de flavor del producto experimentaban mayores cambios. Sin embargo, la maduración a las temperaturas mayores a 15°C (17.5 y 20°C) durante períodos prolongados condujo al desarrollo de características sensoriales atípicas, que generó el rechazo del producto por parte de los examinadores. Como alternativas óptimas de maduración de los quesos, dentro del conjunto de las que fueron ensayadas, resultaron aquellas de 15°C durante todo el período y la de 20°C durante los primeros dos meses y luego de 8°C, ya que en ambos casos se encontraron alrededor de los 5 meses de maduración, características similares a las de los quesos control completamente madurados, resultando en una disminución del período de maduración de al menos 3 meses.

En un estudio más reciente sobre queso Cheddar, [Hannon y col. \(2005\)](#) aumentaron la temperatura durante períodos cortos de tiempo y estudiaron aspectos microbiológicos, sensoriales y relacionados con la proteólisis. Siendo las condiciones de maduración para quesos control de 8 meses a 8°C, los autores probaron elevar la temperatura de maduración a 12°C durante las primeras 6 semanas o implementar aumentos más dramáticos durante menor tiempo, a 20 y 30°C durante la primera

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

semana. Los recuentos finales de NSLAB resultaron similares para todos los tratamientos durante los últimos meses de maduración, pero en quesos madurados a mayor temperatura estos niveles se alcanzaron durante las primeras semanas. Estos mayores recuentos de NSLAB constituyen una fuente potencial de niveles aumentados de peptidasas, que podrían contribuir a acelerar la proteólisis y el desarrollo del flavor. Del análisis sensorial descriptivo cuantitativo se concluyó que el desarrollo del flavor fue acelerado en 2 meses mediante la elevación de la temperatura de maduración por cualquiera de las tres alternativas propuestas. Sin embargo, los tratamientos a 12°C durante 6 semanas o 20°C durante 1 semana resultaron en un desarrollo de flavor más controlado, con características sensoriales a 6 meses de maduración similares a las de los quesos control a 8 meses de maduración. Si bien todos los tratamientos dieron un resultado satisfactorio, el uso de temperaturas no tan elevadas (20°C durante 1 semana y posteriormente 8°C hasta completar el período o 12°C constante durante 6 semanas y luego 8°C hasta completar el período) aparecen como las alternativas más recomendadas, ya que conducen a una aceleración efectiva de la maduración, pero con un desarrollo del flavor más controlado que recurriendo a los 30°C.

También se estudió el efecto de diferentes combinaciones temperatura-tiempo sobre la lipólisis y las características sensoriales de quesos Cheddar ([O'Mahony y col., 2006](#)). Se estudiaron 7 combinaciones temperatura-tiempo durante 9 meses en un rango de temperatura de 4 a 12°C. Como consecuencia del aumento de temperatura, los autores encontraron mayores niveles en ácidos grasos libres, en

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

especial de aquellos de cadena corta (C4:0 a C8:0), que tienen umbrales de percepción menores y por lo tanto mayor impacto directo sobre el flavor. Se concluyó además que el uso de temperaturas elevadas durante etapas tempranas de la maduración (primeros 2 meses) provocó una mayor aceleración de la lipólisis que cuando se implementaron aumentos de temperatura similares en períodos posteriores. La maduración a altas temperaturas (12°C) provocó el desarrollo de perfiles de flavor y aroma de una intensidad característica del queso Cheddar maduro en un tiempo relativamente corto (4 meses), aun en el caso de quesos en que esta temperatura se mantuvo sólo durante los primeros 2 meses. Sin embargo, si se continúa la maduración hasta los 9 meses a esta temperatura (o a una temperatura luego reducida), resulta en una disminución en la intensidad del flavor típico y en el desarrollo de características de flavor y aroma que son consideradas atípicas para queso Cheddar maduro. Los recuentos de NSLAB finales fueron similares para todos los tratamientos, mientras que hubo diferencias entre los distintos tratamientos en la forma en que estos valores evolucionaron hasta llegar a su valor final máximo. En el caso de quesos en los que el incremento de temperatura fue aplicado al inicio de la maduración, se alcanzaron altos niveles de NSLAB en un tiempo más corto y estos niveles persistieron durante una mayor parte del período de almacenamiento. Este resultado sería de relevancia ya que en queso Cheddar fabricado utilizando leche pasteurizada, los principales agentes lipolíticos son las lipasas y esterases de las bacterias lácticas.

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Ferraza y col. (2004) estudiaron la evolución de las distintas poblaciones microbianas presentes en queso Zamorano madurado durante 6 meses a 15°C, siendo la temperatura control establecida para este queso de 10°C. Esta mayor temperatura se usó durante todo el período o sólo durante la parte inicial, media o final. No se observó efecto de la temperatura sobre los recuentos de la flora correspondiente al fermento primario, mientras que sí se observó un efecto en la flora NSLAB (compuesta principalmente de lactobacilos), especialmente en los casos en que las temperaturas elevadas eran aplicadas durante los primeros 60 días. Es interesante comparar los resultados obtenidos en quesos para los cuales los primeros 2 meses se mantuvieron a 10°C y luego 4 meses a 15°C con los obtenidos para el caso de aquellos que se mantuvieron a 15°C durante los primeros 2 meses y luego a 10°C hasta completar los 6 meses de maduración. En el caso de los primeros, se observó un lento desarrollo de los microorganismos que llegaron a recuentos del orden de 10^5 UFC/g queso a 2 meses de maduración. Luego con el aumento de temperatura los microorganismos sólo crecieron moderadamente, llegando a valores finales entre 10^6 y 10^7 UFC/g queso entre 4 y 6 meses de maduración. En el segundo caso, ya a los 15 días se encontraron recuentos de alrededor de 10^6 UFC/g queso y a los 2 meses, cantidades del orden de 10^7 UFC/g queso, para luego mantenerse en estos valores durante toda la maduración. En este estudio resulta evidente que un aumento inicial de temperatura incide con mayor efectividad en el desarrollo de las poblaciones de microorganismos NSLAB que cuando el aumento es aplicado en etapas posteriores.

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Existen antecedentes relacionados con el estudio del efecto del uso de temperaturas elevadas sobre la maduración de queso Reggianito (Sihufe y col., 2007; Sihufe y col., 2010a; Sihufe y col., 2010b; Sihufe y col., 2010c). Se usaron temperaturas de almacenamiento de 18°C, que fueron mantenidas durante todo el período de maduración de 6 meses (quesos experimentales), mientras que los quesos control fueron madurados a 12°C (temperatura convencionalmente utilizada en la industria). Los quesos fueron muestreados a 2, 4 y 6 meses de maduración en 2 zonas: central y periférica.

Se estudió la evolución de la lipólisis (Sihufe y col., 2007), mediante la medición por cromatografía gaseosa de los ácidos grasos libres saturados de cadena par de 6 a 18 átomos de carbono (C6:0 a C18:0) y de los ácidos grasos insaturados oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). Se encontró que las concentraciones de todos los AGL analizados fueron afectadas significativamente por el tiempo y la temperatura de maduración. En quesos madurados a 12°C, se observó que los niveles de los distintos AGL tuvieron una tendencia a aumentar hasta 4 meses de maduración y luego a mantenerse constantes, mientras que en los quesos experimentales todos los AGL medidos aumentaron durante los 6 meses de estudio, indicando una lipólisis moderadamente mayor por efecto del aumento de temperatura. Se observó una tendencia similar para el total de AGL, pero sólo hubo diferencias significativas entre quesos experimentales y control para esta cantidad durante los 2 últimos meses de almacenamiento. No se observaron cambios en la proporción relativa de los diferentes AGL por efecto de la temperatura o el tiempo de maduración.

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

Para el estudio de la degradación de las caseínas durante la maduración de queso Reggianito (Sihufe y col., 2010a) se usaron distintas metodologías que permitieron observar la evolución del proceso a los diferentes niveles en los que ocurre. La ruptura inicial de las caseínas se estudió mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida de la fracción extraída con urea 8.66 M (urea-PAGE) y mediante la cuantificación del contenido de nitrógeno presente en la fracción soluble en agua a pH 4.6. Para el seguimiento de la proteólisis secundaria se usaron técnicas de cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) para el estudio de los péptidos presentes en la fracción soluble en agua a pH 4.6 y para el estudio de los aminoácidos presentes en la fracción soluble en ácido sulfosalicílico 2.5%. El análisis de los geles obtenidos por urea-PAGE mostró una marcada disminución de α_{S1} - y β -caseína con el tiempo de maduración, especialmente durante los 2 primeros meses y para α_{S1} -caseína. Esta degradación fue significativamente mayor al usarse una temperatura de maduración elevada. Los valores de nitrógeno en la fracción soluble a pH 4.6, expresados en referencia a los valores de nitrógeno total como índice de maduración, presentaron una tendencia similar y se observaron valores de índice de maduración para quesos madurados a 18°C que ya a 2 meses de maduración eran mayores a los presentes en quesos control al final del período de maduración. De los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de la fracción soluble en agua a pH 4.6 se estudiaron 36 picos, de los cuales 26 resultaron significativamente afectados por el tiempo y la temperatura de maduración. En general, las áreas de estos picos crecieron con el tiempo de maduración y debido al aumento de la temperatura. De manera similar, la mayor temperatura de maduración

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de aminoácidos libres, observándose mayores concentraciones en quesos madurados a 18°C. La cantidad de aminoácidos libres totales en quesos madurados a temperatura elevada a 4 meses de maduración fue mayor que la correspondiente a los quesos control madurados a 12°C a 6 meses de maduración.

Para el estudio de las características sensoriales de los quesos se realizó un análisis sensorial descriptivo cuantitativo llevado a cabo por un panel sensorial entrenado que utilizó 10 términos descriptivos que cubrían aspectos texturales, de aspecto visual, olor y flavor de los quesos (Sihufe y col., 2010b). Todos los atributos sensoriales evaluados tuvieron valores significativamente afectados por el tiempo y la temperatura de maduración, pero hubo diferencias en cuanto a la forma en que fueron afectados. Un primer grupo, que incluyó atributos relacionados con la textura (corte granular, fracturabilidad, textura visual y oral), se caracterizó por presentar valores que permanecieron constantes durante la maduración en quesos control, pero que disminuyeron notablemente con el tiempo en quesos madurados a 18°C. El segundo grupo incluyó a los atributos aroma, gusto salado y flavor genuino. Los puntajes para estos atributos asignados para quesos control fueron ligeramente menores a aquellos correspondientes a los quesos madurados a 18°C durante todo el período estudiado. En un tercer grupo, los atributos flavor residual, gusto amargo y color permanecieron prácticamente constantes para quesos control y mostraron una clara tendencia a crecer durante la maduración a 18°C. Los autores destacan en este trabajo que los quesos Reggianito madurados durante 2 meses a la temperatura

Capítulo 3 - Fundamentos teóricos

elevada de 18°C presentaron las características sensoriales de un queso Reggianito maduro, ya que fueron similares a las de quesos almacenados a 12°C durante 6 meses. Además, es importante mencionar que si bien a partir de 4 meses y en quesos madurados a 18°C se observaron valores diferentes en algunos de los atributos sensoriales con respecto a los quesos control, no se observó el desarrollo de características sensoriales que fueran consideradas atípicas para queso Reggianito.

Con el fin de establecer la estrategia más conveniente para acelerar la maduración de queso Reggianito almacenado a 18°C, se usó el análisis de componentes principales con 78 variables relacionadas con la información recolectada en los estudios de la lipólisis, proteólisis y análisis sensorial para quesos Reggianito madurados a 12 y 18°C (Sihufe y col., 2010c). Así, se estableció un tiempo óptimo de maduración de queso Reggianito a 18°C de 2 a 3 meses para obtener un queso de características propias de queso Reggianito maduro. Se concluyó que es posible disminuir el tiempo de maduración de queso Reggianito a un tercio o a la mitad recurriendo a una aceleración por aumento de 6°C en la temperatura de almacenamiento y manteniendo esta temperatura constante.

Capítulo 4

Materiales y métodos

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1. Quesos

Para el presente diseño experimental, se emplearon 20 quesos Reggianito de forma cilíndrica (7.8 ± 0.1 kg de peso, 23.7 ± 0.2 cm de diámetro y 15.3 ± 0.2 cm de altura) elaborados con leche proveniente de un mismo silo, según metodología estándar (Gallino, 1994), en la planta industrial de la empresa Milkaut S.A. (Franck, Santa Fe, Argentina). Los quesos fueron salados por inmersión en salmuera y recibidos en nuestro laboratorio un día después de concluida esta etapa. Dos quesos fueron utilizados para determinar la composición inicial, mientras que los 18 quesos restantes fueron almacenados bajo las diferentes condiciones de maduración propuestas.

4.1.1. Maduración de los quesos

Se ensayaron tres condiciones de maduración diferentes. Seis quesos fueron almacenados de la manera tradicionalmente usada en la industria -12°C y 85% de humedad relativa (HR) durante 6 meses— los cuales fueron identificados como quesos control (quesos C). Seis quesos se almacenaron a 20°C y 85% HR durante los primeros 15 días y luego hasta 6 meses a 12°C y 85% HR (quesos E₁); otros 6 quesos se almacenaron a 20°C y 85% HR los primeros 30 días y luego hasta 6 meses a 12°C

y 85% HR (quesos E₂). En la Tabla 4.1., se resumen las condiciones de maduración mencionadas.

Tabla 4.1. Condiciones usadas para la maduración de queso Reggianito.

Queso	Condición de maduración*
C	12°C durante 6 meses
E₁	20°C durante 15 días, luego 12°C hasta completar 6 meses
E₂	20°C durante 30 días, luego 12°C hasta completar 6 meses

* En todos los casos, 85% HR.

4.1.2. Muestreo de los quesos

La toma de muestra de los quesos se llevó a cabo por duplicado a los 61, 124 y 180 días de maduración. En primer lugar, se realizó un corte paralelo a las caras planas del cilindro, de manera tal de obtener una placa de 5 cm de espesor, la cual se destinó al análisis de los atributos sensoriales del queso. De la placa restante, de aproximadamente 10 cm de altura, se obtuvieron las muestras que se utilizaron en el resto de los análisis realizados. Con el objetivo de obtener una muestra que sea representativa de los procesos fisicoquímicos y bioquímicos que ocurren durante la maduración, se obtuvieron muestras de la parte central de cada queso utilizando un molde cilíndrico de 12 cm de diámetro. De esta manera, se obtuvieron muestras de geometría cilíndrica (12 cm de diámetro y 10 cm de altura), que luego fueron ralladas para su posterior análisis.

4.2. Análisis fisicoquímico

Para la determinación del contenido de humedad, se utilizó un horno microondas CEM AVC 80 (CEM, Matthews, NC, Estados Unidos). El contenido de grasa se determinó según el método de extracción con solventes, decantación y posterior pesada de acuerdo con las normas de la International Dairy Federation (IDF, 1969). El contenido de grasa sólo se determinó para la composición inicial de los quesos. Para la determinación de nitrógeno se usó el método de Kjeldahl, según el procedimiento semiautomático establecido por Büchi Labortechnik AG (1998), utilizando: un digester automático Büchi 430 (Büchi, Flawil, Suiza), una unidad de destilación Büchi 322 (Büchi, Flawil, Suiza), una unidad de control Büchi 342 (Büchi, Flawil, Suiza) y un titulador automático Mettler DL40RC (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Suiza). Para el cálculo del contenido de proteína total, el contenido de nitrógeno se multiplicó por un factor de 6.38 para expresar los resultados como contenido de proteína láctea. El contenido de cloruro se determinó utilizando el método de titulación potenciométrica sugerido por IDF-ISO-AOAC (AOAC, 1990). La titulación se realizó con AgNO_3 0.1 N, utilizando un titulador automático Mettler DL40RC (Mettler Instrumente AG, Greifensee, Suiza). El pH se determinó con un electrodo de penetración para alimentos sólidos pH Spear (Oakton Instruments, Vernon Hills, IL, Estados Unidos). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado, a excepción del contenido de cloruro que fue realizado por triplicado.

4.3. Análisis microbiológico

Para los recuentos microbiológicos, se usaron 10 g de queso rallado, los cuales se suspendieron en 90 mL de una solución estéril de citrato de sodio 2% y se homogeneizaron en esterilidad, obteniéndose así una dilución 1/10. Se prepararon 3 diluciones decimales seriadas, mezclando 10 mL de la solución a diluir con 90 mL de agua de peptona estéril 0.1%, que fueron sembradas en placas de agar MRS (Biokar, Beauvais, Francia) e incubadas en simultáneo durante 3 días a las temperaturas de 30 y 42°C. La observación microscópica de la morfología celular de las colonias crecidas en las placas confirmó la presencia de una flora compatible con lactobacilos. Tras la incubación, se procedió al recuento de colonias y los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias (UFC/g queso). La temperatura de incubación de 42°C fue seleccionada para promover el crecimiento de la flora del fermento primario, consistente fundamentalmente en lactobacilos termófilos (Reinheimer y col., 1996). Por otro lado, la temperatura de incubación de 30°C fue seleccionada para obtener los recuentos tentativos de la flora láctica no perteneciente al fermento primario (NSLAB) compuesta principalmente por lactobacilos mesófilos (Bude Ugarte y col., 2006).

4.4. Seguimiento de la proteólisis

4.4.1. Análisis electroforético

La electroforesis se define como la migración de moléculas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Las moléculas se mueven a través del medio a una velocidad que depende de su carga y de su peso molecular. En el caso particular de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para la separación de biomoléculas de diversos orígenes. La matriz utilizada es una mezcla del monómero acrilamida y un agente de entrecruzamiento (generalmente bisacrilamida). Los geles de poliacrilamida se forman por la copolimerización de la acrilamida y la bisacrilamida, iniciada por un sistema para la generación de radicales libres que incluye persulfato de amonio y tetrametiletilendiamina (TEMED). Las cadenas poliméricas están entrecruzadas de manera aleatoria, resultando en un gel con una porosidad característica. El tamaño de poro del gel se regula según dos factores: la concentración de acrilamida y la cantidad de entrecruzador. En la actualidad, prácticamente todas las técnicas de electroforesis unidimensionales en geles de poliacrilamida son en sistemas de buffer discontinuos, en los que la muestra atraviesa primero un gel de apilamiento y luego un gel de resolución, cada uno de ellos con una cierta porosidad y pH ([Chevalier, 2011](#)).

La preparación de la muestra normalmente involucra su disolución en un buffer (que por lo general contiene un agente reductor, como el β -mercaptoetanol)

Capítulo 4 - Materiales y métodos

previamente a la electroforesis. La grasa puede ser eliminada de la muestra mediante centrifugación y un soluto como el glicerol suele ser agregado para aumentar la densidad de la muestra y facilitar su siembra en los pocillos del gel. Luego de la corrida electroforética, las proteínas o péptidos son fijados en su posición dentro del gel por desnaturalización y/o precipitación para prevenir su difusión, que resultaría en una menor resolución de la técnica. Para fijar las bandas, comúnmente se utilizan soluciones de TCA al 12%, ácido acético o solventes orgánicos. La técnica más ampliamente utilizada para visualizar las bandas de proteínas es la de tinción directa o indirecta utilizando el colorante Coomassie Blue o el Amido Black, seguida de etapas de lavado para la decoloración hasta que el fondo del gel sea claro. Sin embargo, debido a que sólo los péptidos relativamente grandes se tiñen en estas condiciones, esta etapa es sólo usada en la detección de proteínas del suero lácteo, caseínas y sus productos inmediatos como consecuencia de la proteólisis primaria. Luego de la tinción, los electroforetogramas son usualmente fotografiados o escaneados en una computadora. La dificultad para obtener datos cuantitativos es una limitación importante de la técnica, ya que la cantidad de colorante que toma el gel es función de las proteínas presentes en él y del protocolo empleado para la tinción y decoloración, por lo que PAGE debe ser considerada solamente como una técnica analítica semi-cuantitativa ([Chevalier, 2011](#)).

Si bien el método para la separación de proteínas por electroforesis que usa un gel de poliacrilamida discontinuo como medio de soporte y SDS para desnaturalizar las proteínas (SDS-PAGE) es muy usado para el análisis de proteínas

Capítulo 4 - Materiales y métodos

del suero lácteo, no resulta adecuado para el análisis de las caseínas, debido a que algunas de ellas presentan una migración similar y por lo tanto no son tan bien resueltas como con urea-PAGE. En la técnica de urea-PAGE, la urea despliega parcialmente a las proteínas durante su proceso de solubilización. La técnica de urea-PAGE generalmente es usada sólo para la separación de las caseínas. El uso de urea brinda una buena solubilización de las proteínas hidrofóbicas de la micela de caseína. Las caseínas son luego resueltas de acuerdo a sus cargas y se pueden observar bandas bien separadas de las α_{S1} -, β - y κ -caseínas. La α_{S2} -caseína es observada como varias bandas entre las bandas de α_{S1} - y β -caseína, debido a los distintos grados de fosforilación que presenta. Varios sistemas de buffer conteniendo urea han sido usados, incluyendo los buffers Tris-HCl/glicina y Tris-EDTA-borato a pH ácido, pero la técnica más común es el uso de buffers conteniendo urea a pH alcalino, como por ejemplo Tris-glicina (pH 8.9) conteniendo urea 6 M ([Chevalier, 2011](#)).

En el presente estudio, la obtención de los extractos de cada muestra y el análisis electroforético de los mismos se realizó según lo propuesto por [Zorrilla \(1993\)](#). Se disolvieron 3 g de queso en 25 mL de una solución de urea 8.66 M. Posteriormente, la materia grasa fue eliminada por filtración en frío y los extractos fueron almacenados en freezer a -20°C . El análisis electroforético de las fracciones se realizó usando geles de poliacrilamida verticales discontinuos y buffers anódicos. Los geles fueron preparados según la forma propuesta por [McKenzie \(1971\)](#) para el análisis de caseína entera o γ -caseína. La corrida electroforética se divide en dos etapas. En una primera etapa, las muestras atraviesan el gel de apilamiento, que

Capítulo 4 - Materiales y métodos

ayuda a concentrar las bandas y que por tener menor concentración de acrilamida tiene un mayor tamaño de poro. En la segunda etapa, de separación, las distintas caseínas presentes en la muestra migran diferencialmente a lo largo del gel de separación, de poros de menor tamaño, en función de la carga y el tamaño molecular que poseen. Para poder identificar las bandas correspondientes a α_{s1} -caseína y β -caseína se utilizaron estándares comerciales en cada uno de los extremos de los geles (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Estados Unidos).

El equipamiento utilizado fue el siguiente: equipo de electroforesis LKB-2001 (LKB Produkter AB, Bromma, Suecia), fuente de suministro de potencia LKB-2197 (LKB Produkter AB, Bromma, Suecia) y baño termostático con circulación forzada LKB-2219 (LKB Produkter AB, Bromma, Suecia). La corriente eléctrica estuvo fijada en un valor constante de 50 mA y la temperatura fue mantenida en 15°C. Para observar el frente de corrida se utilizó azul de bromofenol. Los geles fueron coloreados usando Coomassie Blue R 250 (LKB Produkter AB, Bromma, Suecia). A partir de los geles ya coloreados se obtuvieron imágenes digitales, mediante el uso de un escáner UMAX Power Look 1120 (UMAX Technologies, Dallas, TX, Estados Unidos). Las imágenes así obtenidas fueron procesadas usando el programa Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos), para obtener valores de áreas relativas para cada banda de interés. Los valores de área relativa de cada banda (valores de IOD, densidad óptica integrada) fueron obtenidos por duplicado. La relación entre el área de pico y la concentración de la banda se consideró lineal (Lesage y col., 1993).

4.4.2. Obtención de la fracción soluble en agua a pH 4.6

Las caseínas son insolubles en muchos solventes, pero los péptidos producidos a partir de su degradación sí pueden ser solubles, observándose un aumento en la proporción de nitrógeno soluble con el avance de la proteólisis. Este es el principio en el que se basa un conjunto de métodos ampliamente utilizados para el seguimiento de la proteólisis durante la maduración de quesos, debido a que péptidos de distinto tamaño pueden ser precipitados diferencialmente mediante una cuidadosa selección de los solventes. Muchos de estos sistemas de solventes se utilizan además para extraer péptidos, como una primera etapa de purificación o para su uso posterior en determinadas técnicas analíticas, tales como técnicas cromatográficas (McSweeney y Fox, 1997).

En el presente estudio, se obtuvo para cada muestra de queso la correspondiente fracción soluble en agua a pH 4.6, de acuerdo al método propuesto por Kuchroo y Fox (1982a). Se mezclaron 20 g de queso rallado con 30 mL de agua destilada. Esta mezcla fue homogeneizada con un equipo Ultra-Turrax T25 (IKA Werke, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Alemania) durante 2 min, llegando a una velocidad de 16000 rpm y a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se mantuvo en un baño termostático a 40°C durante 1 h y luego, utilizando HCl 1 N y bajo agitación, se acidificó hasta llegar a pH 4.6 con una lectura estable durante 5 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 4800 rpm durante 30 min a 5°C, utilizando una centrífuga con termostatación Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Alemania). La capa de grasa formada en la superficie fue

eliminada y entonces se separó el sobrenadante del precipitado, siendo este último descartado. El sobrenadante se trasvasó a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a volumen con agua destilada. Por último, el contenido del matraz se filtró usando papel Whatman N° 42 (Whatman Int. Ltd., Maidstone, Reino Unido), obteniéndose así, a partir del filtrado recogido, la fracción soluble en agua a pH 4.6 (FS). El volumen de filtrado obtenido para cada muestra fue fraccionado en tubos de 10 mL y se almacenaron en freezer a -20°C para análisis posteriores.

4.4.3. Obtención de la fracción soluble en ácido sulfosalicílico 2.5%

Para el fraccionamiento y separación de péptidos pequeños y aminoácidos, a menudo es deseable precipitar a todos aquellos compuestos más grandes, para obtener un extracto que permita, por ejemplo, cuantificar los aminoácidos libres presentes en el queso. El ácido fosfotúngstico (PTA) es un precipitante de proteínas muy discriminativo, ya que sólo los aminoácidos libres (con la excepción de lisina y arginina) y los péptidos de alrededor de 600 Da son solubles en PTA 5%. El nitrógeno soluble en PTA 1, 2.5, 5, 6 ó 6.5% ha sido usado ampliamente como un índice del nivel de aminoácidos libres presentes en queso. Por otra parte, el ácido 5-sulfosalicílico (SSA) ha sido usado en concentraciones cercanas al 3% para preparar extractos de quesos aptos para el análisis de aminoácidos libres, o como un índice del nivel de nitrógeno correspondiente a los aminoácidos libres. Finalmente, otro agente desproteinizante utilizado es el ácido pícrico, pero tiene las desventajas de mantener disueltos algunos péptidos pequeños, además de que su presencia interfiere en la posterior determinación de nitrógeno por Kjeldahl o mediante métodos

espectrofotométricos (McSweeney y Fox, 1997).

Para el análisis del contenido de aminoácidos libres en las muestras de queso Reggianito se obtuvo la fracción soluble en ácido sulfosalicílico 2.5% de acuerdo al método propuesto por Kuchroo y Fox (1982b). Sobre 10 mL de la FS se agregaron 2 mL de una solución de ácido sulfosalicílico 15% como agente precipitante de los péptidos presentes. La mezcla fue centrifugada a 4800 rpm durante 30 min a 20°C. El sobrenadante se ajustó hasta un pH cercano a 4 utilizando NaOH 1 N, constituyendo la fracción soluble en ácido sulfosalicílico 2.5% (FS-SSA), la cual fue almacenada en tubos a -20°C para análisis posteriores.

4.4.4. Determinación del índice de maduración

El nivel de nitrógeno en la FS es considerado un indicador de la cantidad de productos propios de la proteólisis secundaria: péptidos medianos y pequeños, aminoácidos y sus productos de degradación (McSweeney y Fox, 1997). El índice de maduración (IM), definido como la relación porcentual entre el contenido de nitrógeno en la FS (NS) con respecto al nitrógeno total (NT),

$$IM = \frac{NS}{NT} 100 \quad (4.1)$$

constituye un parámetro de utilidad para evaluar, de manera general, el grado de degradación que presentan las caseínas en el queso (Sousa y col., 2001). La determinación de los valores de NS y NT fue realizada por el método de

Kjeldahl, según se detalló en la sección 4.2.

4.4.5. Análisis de la FS por RP-HPLC

Los métodos de análisis cromatográfico, los cuales combinan las etapas de separación y análisis de los componentes de una muestra, suelen ser muy útiles para el análisis de muestras complejas como es el caso de la leche y los productos lácteos, motivo por el cual, diversas técnicas han sido desarrolladas y estandarizadas. De forma general, se puede decir que todos aquellos compuestos que pueden ser disueltos se pueden analizar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando metodologías que separen por tamaño, carga, solubilidad o actividad biológica de dichos compuestos.

La metodología cromatográfica más comúnmente usada para propósitos analíticos es la cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC). La fase estacionaria de las columnas es no polar, generalmente compuesta por sílice silanizada, con cadenas carbonadas compuestas por 8 a 18 átomos de carbono acopladas a grupos silanoles. Así, una gran cantidad de moléculas orgánicas pueden ser separadas, dependiendo del grado de polaridad de la fase móvil. Además, operando a pH menor a 3 los grupos silanoles están protonados y no interfieren con la metodología. En este sentido, un protocolo estándar de trabajo con gradientes de elución y a bajo pH ha sido desarrollado para el análisis de proteínas y péptidos, el cual es ampliamente utilizado para analizar hidrolizados

Capítulo 4 - Materiales y métodos

de caseína y comparar perfiles peptídicos en fracciones solubles en agua durante la maduración de quesos (Ardö y col., 2011).

El equipamiento utilizado para realizar el análisis de la FS fue un sistema cromatográfico Waters (Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos), consistente en una bomba binaria Waters 1525 Series, inyector automático Waters 717plus, degasificador en línea AF, detector de absorbancia dual Waters 2487 y un software Waters Breeze System. La columna fue mantenida a temperatura constante utilizando un controlador Eppendorf TC-50 (Eppendorf North America Inc., Madison, MA, Estados Unidos).

La separación cromatográfica de los péptidos presentes en la FS se llevó a cabo utilizando un gradiente binario y una columna de C18 (250 x 4.6 mm y 300 Å de diámetro de poro) Microsorb-MV (Varian Inc., Palo Alto, CA, Estados Unidos). Una alícuota de la FS se filtró a través de una membrana de nylon de 0.2 µm Alltech (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, Estados Unidos) y 100 µL se inyectaron en el equipo para su análisis cromatográfico. En la Tabla 4.2., se detallan las condiciones en las que se realizaron las corridas. Todos los solventes utilizados para las fases móviles fueron de grado HPLC. Se realizó una corrida cromatográfica por cada FS obtenida.

Tabla 4.2. Condiciones usadas para el análisis cromatográfico de la FS.

Solvente A	0.1% de ácido trifluoracético en agua			
Solvente B	0.1% de ácido trifluoracético en acetonitrilo : agua (60:40)			
	Tiempo (min)	Condición de elución	Solvente A (%)	Solvente B (%)
Gradiente	10	I	100	0
	80	G	20	80
	15	I	20	80
Caudal	1 mL / min			
Volumen de inyección	100 μ L			
Temperatura de la columna	30°C			
Longitud de onda del detector	214 nm			

I: etapa isocrática; G: etapa de gradiente de solventes.

4.4.6. Análisis de la FS-SSA por RP-HPLC

El análisis por RP-HPLC de algunas moléculas orgánicas pequeñas tales como aminoácidos, aminas, ácidos carboxílicos y α -cetoácidos es comúnmente llevado a cabo luego de una reacción de derivatización. Un ejemplo característico es el análisis cromatográfico de aminoácidos, los cuales son típicamente derivatizados en el grupo amino primario con los reactivos o-

Capítulo 4 - Materiales y métodos

ftalaldehído y ácido 3-mercaptopropiónico. Luego, la separación cromatográfica se lleva a cabo a un pH cercano a la neutralidad de acuerdo a las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos. El coeficiente de variación de la metodología suele encontrarse en un rango que va desde el 5-10%, y un inconveniente asociado a la técnica es que los derivados fluorescentes no son estables por mucho tiempo (Ardö y col., 2011).

A partir de la FS-SSA, se determinó el contenido de aminoácidos libres usando el procedimiento de derivatización con o-ftalaldehído descrito por Verdini y col. (2002). Se mezclaron 200 μ L de cada muestra con 200 μ L de dodecil sulfato de sodio al 2% en buffer borato de sodio (pH 9.5) y 200 μ L de solución derivatizante y se dejó reaccionar durante 1 min. Para detener la reacción se agregaron 400 μ L de buffer fosfato de potasio 0.1 M (pH 4.5). La solución resultante fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0.2 μ m Alltech (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, Estados Unidos) y luego se inyectaron 10 μ L del extracto. Se utilizó el sistema cromatográfico Waters (Waters Corporation, Milford, MA, Estados Unidos) descrito en el inciso 4.4.4. para el análisis cromatográfico de la FS, pero utilizando un detector de fluorescencia FL-2 (Isco, Inc., Lincoln, NE, Estados Unidos). La columna utilizada fue Microsorb-MV (250 x 4.6 mm) C18, de 100 Å de diámetro de poro (Varian Inc., Palo Alto, CA, Estados Unidos), termostataada utilizando como controlador de temperatura el horno Eppendorf TC-50 (Eppendorf North America Inc., Madison, MA, Estados Unidos). En la Tabla 4.3., se detallan las condiciones en

Capítulo 4 - Materiales y métodos

las que se realizaron las corridas. Los aminoácidos se identificaron de acuerdo a su orden de elución por comparación con cromatogramas obtenidos en trabajos anteriores en condiciones cromatográficas similares (Verdini, 2002; Ramo, 2008).

Para cuantificar los aminoácidos presentes se construyeron curvas de calibración con estándares de los siguientes aminoácidos: ácido glutámico (Glu), ácido aspártico (Asp), asparagina (Asn), glutamina (Gln), glicina (Gly), histidina (His), alanina (Ala), isoleucina (Ile), leucina (Leu), tirosina (Tyr), lisina (Lys), treonina (Thr), triptófano (Trp), metionina (Met), valina (Val), fenilalanina (Phe), serina (Ser) y arginina (Arg) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Estados Unidos).

Para cada uno de los aminoácidos evaluados se obtuvo una curva de calibración trabajando con 6 concentraciones diferentes por triplicado. Para cada curva se realizó una regresión lineal por mínimos cuadrados, obteniéndose así los parámetros de la ecuación:

$$y = a + b x \quad (4.2)$$

donde y es la señal medida, a es la ordenada al origen, b es la pendiente y x es la concentración del analito en estudio. Para la validación del procedimiento, se calcularon cifras de mérito que permitan evaluar la precisión, linealidad, sensibilidad y rango lineal de los métodos analíticos empleados (Sihufe, 2003).

Capítulo 4 - Materiales y métodos

Tabla 4.3. Condiciones usadas para el análisis cromatográfico de la FS-SSA.

Solvente A	tetrahidrofurano:metanol:acetato de sodio 0.05 M a pH 5.9 (1:19:80)			
Solvente B	metanol:acetato de sodio 0.05 M a pH 5.9 (80:20)			
	Tiempo (min)	Condición de elución	Solvente A (%)	Solvente B (%)
Gradiente	1	I	100	0
	5	G	86	14
	5	I	86	14
	5	G	50	50
	4	I	50	50
	6	G	25	75
	4	I	25	75
	6	G	0	100
	4	I	0	100
Caudal	1.3 mL / min			
Volumen de inyección	10 µL			
Temperatura de la columna	40°C			
Detector	$\lambda_{\text{excitación}} = 305 - 395$; $\lambda_{\text{emisión}} = 430 - 470$			
Sensibilidad del detector	0.2 unidades de absorbancia (AUF) Constante de tiempo = 0.5 s			

I: etapa isocrática; G: etapa de gradiente de solventes.

Para evaluar la **precisión** de un método, es decir el grado de dispersión de valores repetidamente ensayados sobre una misma muestra, una alternativa es el

cálculo del Coeficiente de Variación (CV).

$$CV\% = \frac{SD}{M} 100 \quad (4.3)$$

donde SD es la desviación estándar y M es la media aritmética del conjunto de datos.

Para evaluar la **linealidad**, se utilizó el coeficiente de correlación (r) de la regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados, que brinda una estimación numérica del grado de asociación lineal que tienen la variable dependiente y con la variable independiente x.

Como aproximación para conocer los mínimos niveles de concentración a los que el analito puede ser detectado por el método en estudio, es decir la **sensibilidad** del método, se calculó la sensibilidad analítica (γ), que es una relación entre la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de la medida:

$$\gamma = \frac{b}{S_R} \quad (4.4)$$

siendo S_R la desviación estándar de los residuos.

En relación a la sensibilidad del método, también se calcularon el límite de detección y el límite de cuantificación. El **límite de detección (LD)** puede definirse como la mínima concentración de analito que produce una señal significativamente

diferente a la del blanco y se calculó mediante la expresión:

$$LD = 3.3 \left(\frac{S_R^{bc}}{b} \right) \quad (4.5)$$

donde S_R^{bc} corresponde a la desviación estándar de los residuos correspondientes a una curva de calibración en la zona de bajas concentraciones del analito en estudio.

El **límite de cuantificación (LQ)** corresponde a la menor concentración del analito que puede ser determinada con una cierta precisión y exactitud y se calculó según:

$$LQ = 10 \left(\frac{S_R^{bc}}{b} \right) \quad (4.6)$$

El **rango lineal** es el intervalo de concentraciones del analito para el cual se puede usar el modelo de regresión lineal obtenido. El rango lineal se expresó como el intervalo de concentraciones entre el LQ (límite inferior) y la máxima concentración del analito en estudio para la cual se probó el método.

4.5. Análisis de los ácidos grasos libres

La cromatografía gaseosa (GC) es una metodología ampliamente usada para analizar compuestos volátiles o aquellos potencialmente volátiles luego de una reacción de derivatización y que a su vez sean estables térmicamente ([Ardö](#)

y col., 2011). En este sentido, GC acoplada a un detector de ionización de llama (FID) ha sido la metodología más comúnmente utilizada y se ha transformado en la técnica de rutina dominante para cuantificar niveles de ácidos grasos libres en quesos. En dicha metodología, el aislamiento de los AGL presentes en la muestra es un paso fundamental ya que suele ser complicado combinar una buena extracción de los AGL y de la grasa presente en el queso. Es por ello que se suelen utilizar diferentes solventes orgánicos en el proceso de extracción propuesto por la mayoría de los métodos de referencia empleados para tal fin (Collins y col., 2003). En el presente estudio, la separación se fundamenta en la retención de los ácidos grasos libres en una fase estacionaria con alúmina y la elución posterior con una solución de ácido fórmico al 6% en diisopropil éter (Deeth y col., 1983).

4.5.1. Preparación de la muestra

A 1 g de queso rallado, se agregaron 5 mL de dietil éter conteniendo 1 mL de estándares internos de: C5:0, C13:0, C15:0 y C17:0 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estado Unidos), 0.1 mL de H₂SO₄ 4 N y 2.5 g de Na₂SO₄ anhidro granular. Se trituro completamente la muestra con varilla de vidrio y se dejó reposar al menos 1 h a temperatura ambiente y luego se agregaron 5 mL de hexano. Se clarificó la solución por centrifugación (1250 rpm durante 10 min a temperatura ambiente).

4.5.2. Aislamiento de los AGL

El volumen total de la solución hexano-dietil éter preparado anteriormente fue agregado cuidadosamente a una columna de alúmina preparada conteniendo 1 g de alúmina neutra calidad cromatográfica (Merck, Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos). La solución se pasó por la columna dos veces. Luego, 5 mL de una mezcla 1:1 v/v de hexano/dietil éter se pasaron dos veces por la columna para remover los triglicéridos que pudieron haber quedado allí retenidos. El eluato total se desechó. La columna, con los AGL adsorbidos, se secó por aplicación de vacío al final de la misma y luego el interior se transfirió a un tubo de vidrio con tapa a rosca. Al tubo con la alúmina, se agregó 1 mL de ácido fórmico al 6% en diisopropil éter y se mezcló el contenido. La mezcla se centrifugó (2000 g, 5 min) y una alícuota de 1 μ L del sobrenadante se inyectó en un cromatógrafo gaseoso.

4.5.3. Análisis cromatográfico

Para el análisis cromatográfico de las muestras obtenidas se utilizó un cromatógrafo gaseoso Shimadzu CG-17A, equipado con detector de ionización de llama (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Se utilizó una columna capilar de sílice fundida Nukol[®] (Supelco, Inc. Bellefonte, PA, Estados Unidos) de dimensiones 30 m x 0.32 mm con 0.25 μ m de espesor de capa estacionaria. La temperatura del inyector y del detector se fijó en 250°C y la relación de abertura del *split* fue de 1:80. Las condiciones referidas a las rampas de temperatura empleadas durante la corrida cromatográfica se resumen en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Condiciones usadas para el análisis cromatográfico de los ácidos grasos libres.

Carrier	N ₂ a un caudal de 3 mL / min		
	Tiempo (min)	Rampa de temperatura (°C/min)	Temperatura (°C)
Condiciones de corrida	0	0	100
	6.9	16	210
	30	0	210
Temperatura del inyector		250°C	
Temperatura del detector		250°C	

4.6. Análisis de los compuestos volátiles

Los numerosos compuestos involucrados en el desarrollo del aroma durante la maduración de quesos suelen provenir principalmente de tres rutas metabólicas: catabolismo de la lactosa, lactato y citrato, lipólisis y proteólisis. Las moléculas derivadas de estos procesos metabólicos generalmente comprenden ácidos grasos, cetonas, alcoholes, lactonas, ésteres, aldehídos, compuestos sulfurados, aminas y pirazinas. La presencia o ausencia de dichos compuestos, así como la concentración y proporción en que se encuentran, son características particulares de cada variedad de queso (Le Quéré, 2011).

Capítulo 4 - Materiales y métodos

La determinación de los compuestos volátiles en productos lácteos suele llevarse a cabo a través del uso de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Probablemente la etapa más crítica en todo el proceso analítico reside en la técnica de preparación de la muestra que se emplea para aislar y concentrar a los compuestos volátiles provenientes de la matriz láctea. En este sentido, una metodología de extracción muy utilizada en los últimos años es la microextracción en fase sólida (SPME), la cual implica el uso de una fina barra (fibra) de sílice fundida (en general posee un diámetro de 0.11 mm y una longitud de 1 cm) recubierta con un polímero adsorbente/absorbente ([Marsili, 2011](#)).

Se considera que existen dos alternativas para poner en contacto a la fibra de SPME con la muestra: por inmersión directa en la misma o a través del llamado muestreo de espacio de cabeza. En el caso de los productos lácteos, los cuales suelen contener importantes niveles de grasas, hidratos de carbono y proteínas, la toma de muestra a través del espacio de cabeza resulta la más adecuada. En este caso, la fibra de SPME se ubica en el espacio de cabeza libre que queda por encima de la muestra, la cual se calienta para promover la liberación de los compuestos volátiles presentes. Así, los volátiles liberados hacia el espacio de cabeza quedan retenidos en la fibra, la cual posteriormente se ubica en el puerto de inyección del cromatógrafo, provocándose la desorción térmica de los compuestos retenidos y su posterior transporte hacia la columna donde se producirá la separación de los mismos. Existe un número importante

Capítulo 4 - Materiales y métodos

de variedades de fibras aptas para su uso en SPME, las cuales poseen afinidades específicas con diferentes tipos de compuestos. La metodología de SPME ha demostrado ser muy adecuada para su uso en productos lácteos, ya que posee la capacidad de retener un mayor número de compuestos en comparación con otros métodos de extracción (Marsili, 2011).

4.6.1. Preparación de la muestra

Se pesaron 5 g de queso y se colocaron en un vial de vidrio de 30 mL (Wolf y col., 2010), tapado con septa de teflón/silicona de 20 mm de diámetro y herméticamente cerrado con un precinto de aluminio que se mantuvo refrigerado hasta el momento del análisis.

4.6.2. Microextracción en fase sólida (SPME)

Para la adsorción de los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza de los viales, se utilizó una fibra para SPME Stable Flex DVB/CAR/PDMS 50/30 μm (Supelco, Inc. Bellefonte, PA, Estados Unidos), de 1 cm de longitud, sostenida y protegida por un sistema de ensamblaje o *holder* (Supelco, Inc. Bellefonte, PA, Estados Unidos) para regular en forma manual la exposición de la fibra. Antes de usarla por primera vez, la fibra fue acondicionada térmicamente en el puerto de inyección del equipo, según lo recomendado por los fabricantes (1 h, 270°C).

4.6.3. Análisis cromatográfico

Los análisis se realizaron por cromatografía gaseosa en un equipo Hewlett Packard HP 5890 series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, Estados Unidos), equipado con un inyector split/splitless y un detector FID. Los compuestos desorbidos de la fibra fueron separados en una columna capilar de sílice fundida Alltech ECTM-Wax (Alltech, Deerfield, IL, Estados Unidos) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de la capa de fase estacionaria.

La muestra en el vial fue acondicionada térmicamente en un baño de arena durante 10 min a 40°C (Wolf y col., 2010), de manera que los compuestos volátiles se repartan dentro del vial entre el espacio de cabeza y la muestra, hasta llegar a un estado de equilibrio. Para la adsorción sobre la fibra de los compuestos volátiles, ésta fue expuesta durante 30 min a 40°C (Wolf y col., 2010; Randazzo y col., 2008). Los compuestos volátiles fueron desorbidos de la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo, con la válvula de purga cerrada (modo *splitless*) durante 5 min a 230°C. En la Tabla 4.5., se muestran las condiciones cromatográficas usadas.

Tabla 4.5. Condiciones usadas para el análisis cromatográfico de los compuestos volátiles.

Carrier	N ₂ a un caudal de 1 mL / min		
	Tiempo (min)	Rampa de temperatura (°C/min)	Temperatura (°C)
Condiciones de corrida	10	0	40
	18.3	6	150
	8	10	230
	9	0	230
Temperatura del inyector	250°C		
Temperatura del detector	280°C		

4.6.4. Índice de Kováts

Una vez obtenidos los cromatogramas donde se observan los distintos picos correspondientes a los compuestos volátiles presentes en la muestra, resulta de interés conocer la identidad química de dichos compuestos. Una alternativa que ayuda a la identificación es la comparación de los tiempos de retención de los picos en el cromatograma con el de compuestos puros inyectados por separado, tales como el tiempo de retención de alcanos. Teniendo en cuenta los tiempos de retención de cada compuesto incógnita y los tiempos de retención de los alcanos en estado puro se

pueden determinar los índices de Kováts. El uso a los fines de identificación de este valor se fundamenta en que resulta propio de cada compuesto, ya que no depende de las condiciones operativas, a excepción de la polaridad de la columna cromatográfica utilizada (Bianchi y col., 2007).

Para la determinación del índice de Kováts de los compuestos, se inyectó en modo split 1:40 en forma directa 1 μ L de una mezcla de los alcanos C7 - C40 disueltos en hexano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). Los índices de Kováts (IK) fueron determinados según la expresión utilizada en Bianchi y col. (2007). Para un compuesto desconocido x:

$$IK(x) = 100 \left[z + \frac{RT(x) - RT(z)}{RT(z+1) - RT(z)} \right] \quad (4.7)$$

donde z es el número de átomos de carbono correspondiente al alcano eluido inmediatamente antes del compuesto desconocido, RT(x) es el tiempo de retención del compuesto desconocido x, mientras que RT(z) y RT(z+1) son los tiempos de retención de los alcanos eluidos inmediatamente antes y después del compuesto desconocido x, respectivamente.

4.7. Análisis sensorial

Las pruebas de evaluación sensorial descriptiva involucran un conjunto de técnicas que buscan diferenciar un rango de productos sobre la base de todas sus características sensoriales y determinar una descripción cuantitativa de todos los

Capítulo 4 - Materiales y métodos

atributos y descriptores sensoriales. En el caso particular de los productos lácteos, las características sensoriales que pueden ser analizadas incluyen todas aquellas que se relacionan con el aroma, la apariencia, al flavor, la textura, el gusto residual y el sonido de un producto que pueda ayudar a distinguirlo de otros ([Drake y Delahunty, 2011](#)).

Se realizó un análisis descriptivo cuantitativo usando 10 atributos sensoriales (Tabla 4.6.) que fueron evaluados por un panel de 7 jueces entrenados perteneciente al Instituto de Tecnología de Alimentos (Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral) liderado por la Prof. Nora G. Sabbag. El léxico utilizado para el análisis de queso Reggiano fue desarrollado con anterioridad por los miembros del panel ([Candiotti y col., 2002](#); [Sihufe y col., 2010b](#)). Se obtuvieron muestras de los quesos a los 61, 124 y 180 días de maduración y la evaluación sensorial se realizó el mismo día en que las muestras fueron obtenidas. Antes de cada sesión de evaluación, los miembros del panel participaron en una sesión de calibración usando muestras de queso Reggiano adquiridas en comercios locales, para consensuar sobre el uso de términos y escalas. Las muestras consistieron en sectores circulares de 10 cm de radio, 1 cm de longitud de arco y 1 cm de altura, aproximadamente, cortadas evitando el área cercana a la superficie del queso. Las muestras, identificadas por números aleatorios fueron presentadas en un orden también aleatorio y evaluadas en ensayos independientes. El puntaje de los atributos sensoriales se asignó mediante la marca sobre escalas no estructuradas de 10 cm, ancladas en los extremos. La evaluación sensorial se realizó en cabinas individuales

en un laboratorio de análisis sensorial, que cumple con los estándares internacionales para el diseño de este tipo de espacios de trabajo (IRAM, 2012). En las diferentes sesiones de análisis, cada evaluador tenía libre acceso a agua y galletitas de agua sin sal para limpiar el paladar entre cada muestra evaluada. Durante el análisis sensorial de la muestras, cada atributo sensorial fue evaluado dos veces por cada juez.

4.8. Análisis estadístico

El tiempo de maduración y la combinación temperatura/tiempo fueron los factores principales para el análisis de la varianza (ANOVA), el cual fue llevado a cabo usando el software Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, Estados Unidos). Cuando las diferencias entre los efectos de tratamiento resultaron significativas ($P < 0.05$), se realizó una comparación múltiple de medias usando el análisis de la mínima diferencia significativa (LSD). Para reducir la dimensionalidad de los datos obtenidos se usó el análisis de componentes principales (PCA). Esencialmente, el PCA proporciona un medio para reducir un número elevado de variables interdependientes (correlacionadas) a unas pocas variables independientes (no correlacionadas), o principales, que son combinaciones lineales de las variables originales y explican la mayor parte de la variación en el conjunto de datos originales (Coker y col., 2005). Este análisis fue llevado a cabo utilizando el software Minitab (Minitab Inc., State College, PA, Estados Unidos).

Tabla 4.6. Atributos - descriptores utilizados para el análisis sensorial de los quesos.

Atributo - Descriptor	Explicación	Escala (1 - 9)
Aroma	Intensidad total de aroma percibido	Aroma suave - Aroma intenso
Color	Color del queso	Claro - Oscuro
Aspecto de la masa	Número de grietas, de ojos mecánicos, etc.	Mucho - Nada
Corte granular	Percepción de partículas de tamaño moderado en la superficie del queso luego de la ruptura	Nada - Mucho
Fracturabilidad	Grado de ruptura	Mucho - Nada
Sensación al paladar	Se evalúa si la masa es rugosa, pastosa o arenosa	Mucho - Nada
Flavor genuino	Intensidad de flavor percibido	Sin flavor - Flavor intenso
Flavor residual	Flavor residual agradable o desagradable	Sin flavor residual - Flavor residual intenso
Salado	Gusto salado	Sin gusto salado - Muy salado
Amargo	Gusto amargo	Sin gusto amargo - Muy amargo

Capítulo 5

Resultados y discusión

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. Análisis fisicoquímico

Con el objetivo de obtener los datos de composición inicial de las muestras, 2 quesos fueron analizados inmediatamente después del salado por inmersión (tiempo de salado: 7 días). Los resultados se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Valores iniciales promedio y desviaciones estándar de los parámetros fisicoquímicos evaluados en queso Reggiano.

Parámetro	Valor
Humedad (g/100 g queso)	40.1 ± 0.2
Proteína total (g/100 g queso)	33.1 ± 0.3
Grasa (g/100 g queso)	20.8 ± 1.5
Cloruro (g/100 g queso)	ND
pH	5.24 ± 0.02
IM (%)	4.9 ± 0.4

ND: no detectable.

El contenido de cloruro resultó no detectable. En quesos salados por inmersión en salmuera, en los momentos iniciales de la maduración toda la sal transferida al queso se encuentra concentrada en un espesor superficial delgado y su

Capítulo 5 - Resultados y discusión

concentración es casi nula en el centro (Guinee y Fox, 2004). Además, el cloruro originalmente presente en la leche suele perderse con el lactosuero durante el desuerado de la cuajada. El valor de pH medido es compatible con el hecho de que luego de la coagulación, la cuajada continúa acidificándose hasta que por el efecto del salado que inhibe a la flora SLAB, el pH se detiene en un valor cercano a 5 (Fox, 2011a). Como resultado de la escasa degradación inicial de las caseínas, el nivel de nitrógeno presente en la fracción soluble a pH 4.6 es relativamente bajo, y consecuentemente eso también se ve reflejado en el IM.

En la Tabla 5.2., se muestran los valores medios de pH, contenido humedad, contenido de cloruro, así como el IM obtenidos para cada tratamiento durante el período de maduración estudiado. En el Anexo (Tablas A.1-A.5.), se muestran los valores de las determinaciones individuales.

Se observaron valores de pH que variaron en forma moderada y que durante todo el período permanecieron en valores similares a los referidos previamente por otros autores para este tipo de queso (Hynes y col., 2003; Sihufe y col., 2007; Wolf y col., 2010). Es importante destacar que, si bien los valores de pH fueron significativamente afectados tanto por el tiempo como por la temperatura de maduración, siempre se encontraron en un rango considerado como seguro para descartar una posible contaminación con microorganismos no habituales (como por ejemplo, contaminación por hongos).

Tabla 5.2. Valores medios y desviaciones estándar correspondientes a los parámetros fisicoquímicos evaluados durante la maduración de los quesos.

Queso	Tiempo (días)	pH	Humedad (g/100 g queso)	Cloruro (g/100 g queso)	IM (%)
C	61	5.54 ± 0.01 ^{cd}	37.9 ± 0.0 ^a	0.55 ± 0.04 ^a	12.8 ± 0.1 ^a
	124	5.36 ± 0.03 ^a	36.9 ± 0.1 ^c	0.88 ± 0.01 ^c	17.5 ± 1.0 ^c
	180	5.70 ± 0.02 ^{ef}	36.1 ± 0.4 ^e	1.04 ± 0.01 ^d	20.7 ± 1.2 ^d
E₁	61	5.56 ± 0.04 ^d	37.7 ± 0.1 ^{ab}	0.59 ± 0.02 ^a	14.8 ± 0.1 ^b
	124	5.41 ± 0.01 ^{ab}	36.7 ± 0.5 ^{cd}	0.92 ± 0.05 ^c	19.8 ± 0.8 ^d
	180	5.76 ± 0.02 ^{fg}	35.8 ± 0.1 ^e	1.08 ± 0.01 ^d	23.0 ± 0.5 ^e
E₂	61	5.60 ± 0.10 ^{de}	37.2 ± 0.1 ^{bc}	0.70 ± 0.02 ^b	17.2 ± 0.8 ^c
	124	5.45 ± 0.01 ^{bc}	36.3 ± 0.2 ^{de}	0.92 ± 0.01 ^c	20.9 ± 0.2 ^d
	180	5.83 ± 0.02 ^g	35.9 ± 0.0 ^e	1.06 ± 0.00 ^d	25.0 ± 1.5 ^f
Condición de maduración		*	*	*	*
Tiempo de maduración		*	*	*	*
Interacción		NS	NS	*	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-g}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Tanto la combinación temperatura-tiempo como el tiempo de maduración afectaron de manera significativa los valores correspondientes a los contenidos de humedad y de cloruro. Para todos los tratamientos evaluados, el contenido de humedad durante la maduración disminuyó, mientras que el de cloruro aumentó durante el almacenamiento de los quesos. Dicho comportamiento resulta característico en quesos madurados sin envoltura y salados por inmersión en salmuera, en los que paulatinamente ocurre una pérdida continua de agua por evaporación y una redistribución del contenido salino, de manera que finalmente se igualan las concentraciones de sal en las distintas zonas del queso y desaparece el gradiente formado tras el salado (Simal y col., 2001).

La combinación temperatura-tiempo modificó las distribuciones de sal y humedad en el queso sólo en las etapas iniciales de la maduración. Hacia el final del período de maduración los contenidos de humedad y cloruro resultaron similares para todos los quesos, llegando a niveles de aproximadamente 36% y 1%, respectivamente. Los valores observados resultaron similares a los informados por otros autores y para esta variedad de queso (Candioti y col., 2002; Sihufe y col., 2007; Wolf y col., 2010). El efecto de una mayor temperatura de almacenamiento sobre el contenido de cloruro en el centro del queso durante los primeros meses puede ser explicado teniendo en cuenta que el aumento de temperatura favorece los procesos difusivos (Sihufe y col., 2003).

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Con respecto a la evolución del contenido de humedad, resulta de interés notar que en ningún momento de la maduración de los quesos experimentales, se registró un contenido de humedad significativamente menor que aquel correspondiente a los quesos control a 180 días. Una mayor pérdida de humedad provocaría una consecuente disminución del peso de los quesos, representando un perjuicio económico, es decir, una desventaja del método estudiado para la aceleración de la maduración. Además, una excesiva pérdida de humedad podría también alterar algunas propiedades sensoriales del producto, como por ejemplo, aquellas vinculadas al desarrollo de la textura.

Los valores correspondientes al IM observados para los quesos control durante todo el período de almacenamiento fueron similares a aquellos informados por otros autores para este queso (Hynes y col., 2003, Sihufe y col., 2007; Wolf y col., 2010). Por otro lado, los valores de IM en los quesos experimentales fueron significativamente afectados por la combinación temperatura-tiempo y por el tiempo de maduración. Como resultado del proceso de proteólisis que ocurre durante la maduración, se observó un incremento significativo del IM con el tiempo de maduración. Como puede observarse en la Figura 5.1., para cualquier tiempo de maduración, los valores para quesos experimentales (E_1 y E_2) resultaron notablemente mayores que para quesos control. Más aún, los valores de IM para quesos experimentales a 124 días de maduración resultaron similares a los valores de quesos control a 180 días de maduración. Es decir, los quesos experimentales mostraron a 124 días un nivel de nitrógeno soluble (valor asociado con el contenido

Capítulo 5 - Resultados y discusión

de péptidos pequeños y medianos, aminoácidos y productos de degradación) que resulta similar al de un queso control a 180 días de maduración. Finalmente, a 180 días de maduración se observó un IM significativamente mayor para quesos E₂ que para quesos E₁.

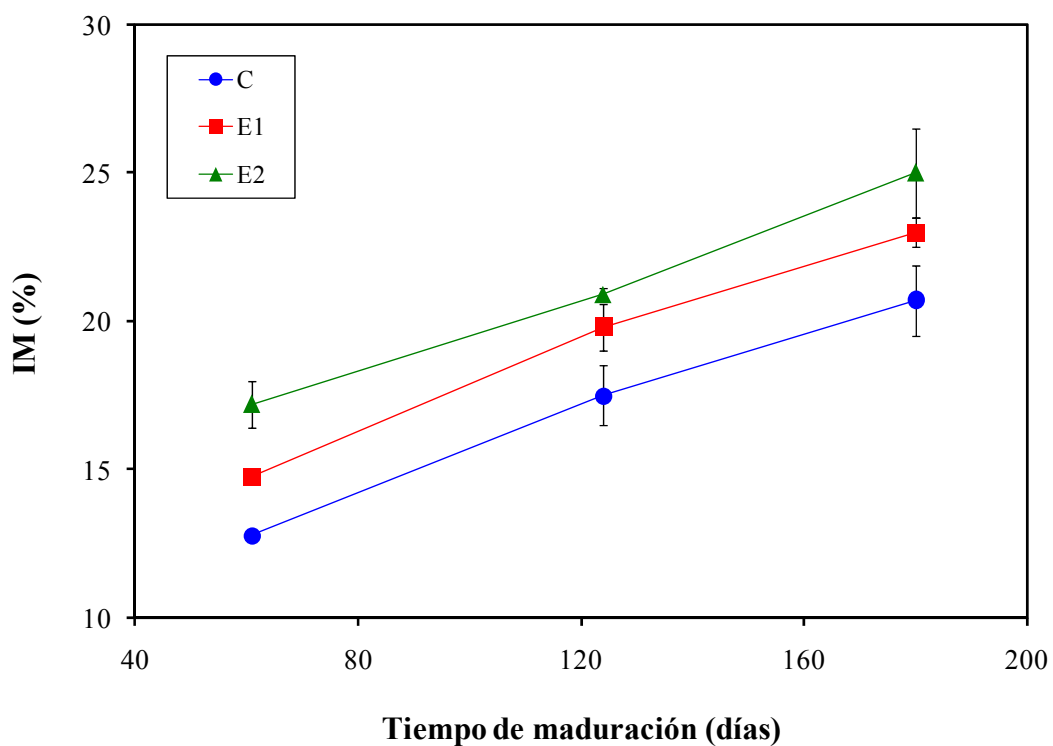


Figura 5.1. Valores de IM para los quesos estudiados. Las barras indican la desviación estándar.

5.2. Análisis microbiológico

En los cultivos obtenidos como resultado de la incubación a 42°C, se observaron recuentos de SLAB en el orden de 10^6 - 10^7 UFC/g queso inmediatamente después de la etapa de salado. Desde los 61 días de maduración en adelante, hubo una disminución drástica de estas poblaciones y los recuentos resultaron prácticamente nulos ($< 10^3$ UFC/g queso). Similarmente, [Coppola y col. \(2000\)](#) y [Giraffa y col. \(1997\)](#) informaron que los lactobacilos termófilos disminuyen progresivamente durante las primeras etapas de la maduración en los quesos duros italianos Parmigiano Reggiano y Grana Padano, que al igual que el queso Reggianito son manufacturados utilizando cultivos naturales de suero lácteo (conteniendo lactobacilos termófilos) como fermento primario.

Para los cultivos a 30°C, los cuales se consideran representativos de la presencia de NSLAB, el valor del recuento bacteriano al inicio de la maduración fue de $1.9 \pm 0.4 \times 10^7$ UFC/g queso. Los valores para las diferentes combinaciones temperatura-tiempo a 61, 124 y 180 días de maduración se muestran en la Tabla 5.3. En el Anexo (Tabla A.6.), se muestran los valores de las determinaciones individuales.

De acuerdo al ANOVA, los recuentos en placa correspondientes a NSLAB fueron afectados significativamente por el tiempo de maduración y por la combinación temperatura-tiempo. Desde los 61 días en adelante, hubo una disminu-

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Tabla 5.3. Valores promedio y desviaciones estándar para los recuentos microbiológicos correspondientes a los cultivos en MRS a 30°C.

Queso	Tiempo (días)	Log UFC/g queso
C	61	8.50 ± 0.20 ^g
	124	7.70 ± 0.10 ^{ef}
	180	7.20 ± 0.30 ^{cde}
E ₁	61	8.02 ± 0.03 ^{fg}
	124	6.73 ± 0.01 ^{bcd}
	180	5.80 ± 0.90 ^a
E ₂	61	7.50 ± 0.20 ^{def}
	124	6.51 ± 0.05 ^{abc}
	180	6.10 ± 0.40 ^{ab}
Condición de maduración		*
Tiempo de maduración		*
Interacción		NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-g}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

ción en el recuento de NSLAB con el tiempo de maduración para todos los tratamientos. Los valores observados para los quesos experimentales E₁ y E₂ fueron similares durante la maduración, siendo ambos un orden log menor que aquellos para quesos control desde 124 días de maduración en adelante. Estos resultados sugieren que sólo ocurren cambios limitados y controlados en el crecimiento de lactobacilos mesófilos cuando se incrementa la temperatura de almacenamiento en las etapas

iniciales de la maduración de queso Reggiano. Más aún, los valores de pH discutidos en la sección anterior refuerzan la idea de una aceleración de la maduración controlada desde el punto de vista microbiológico.

5.3. Seguimiento de la proteólisis

5.3.1. Análisis electroforético por urea-PAGE

A través del ensayo de urea-PAGE fue posible identificar y cuantificar 5 fracciones caseínicas con movilidades electroforéticas diferentes (Figura 5.2.), a través de la utilización de reactivos estándar de α_{S1} - y β -caseína y de la comparación con la ubicación de las bandas de acuerdo a trabajos anteriores para las restantes fracciones (Sihufe y col., 2010a). En la Tabla 5.4., se observan los valores de densidad óptica integrada (IOD) para las fracciones analizadas, informados como la relación del valor de IOD de cada banda integrada respecto de su valor de IOD inicial (IOD₀), de manera tal que las diferencias que pudieron observarse en la intensidad de la tinción de cada gel no interfirieran en las inferencias con respecto a los cambios en la concentración de las caseínas. De esta manera, valores menores que 1 indican una disminución y valores mayores que 1 indican un aumento en cada fracción respecto del valor inicial. En el Anexo (Tablas A.7.-A.11.), se muestran los valores de las determinaciones individuales.

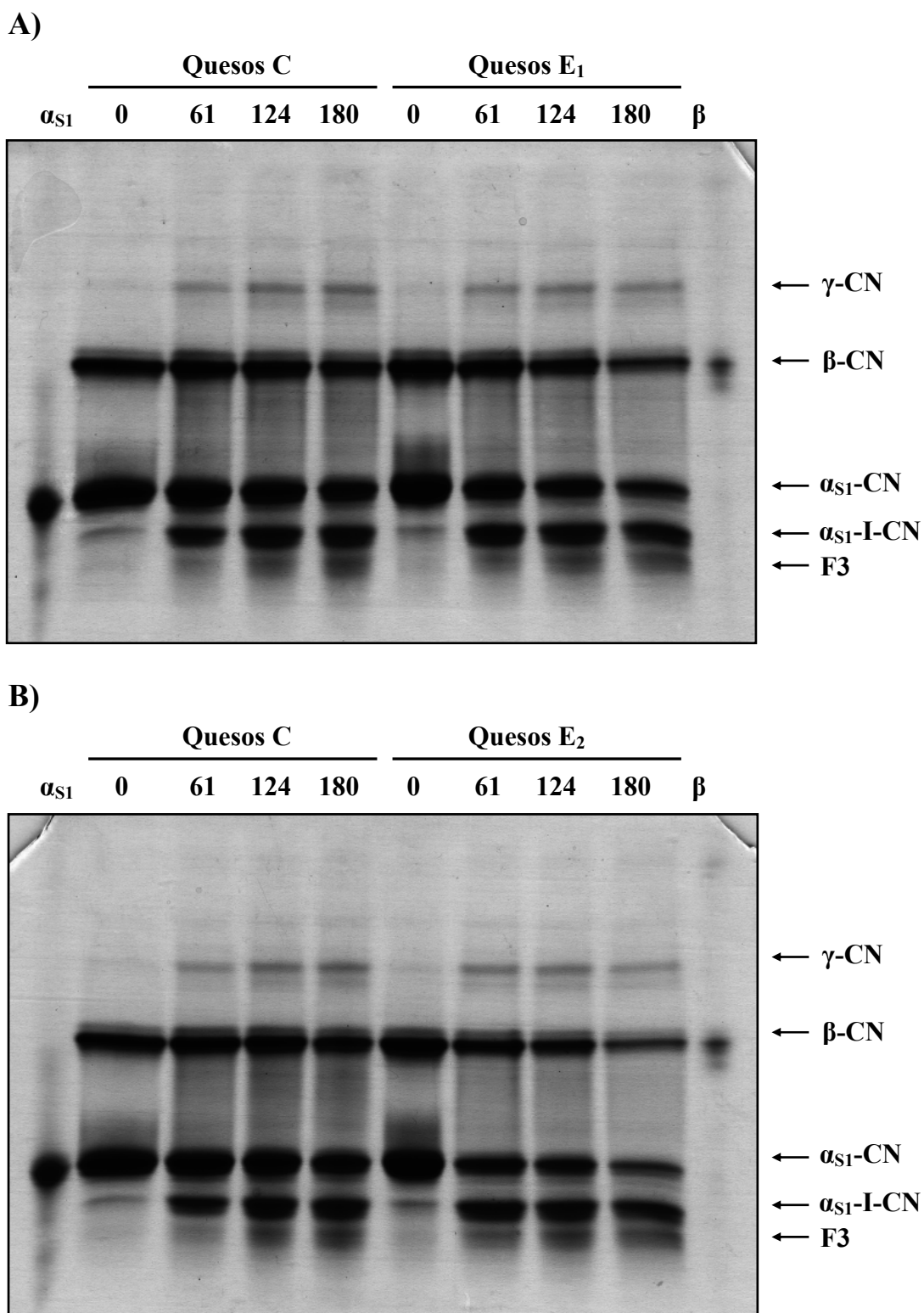


Figura 5.2. Electroforetogramas de queso Reggiano correspondientes a: A) Quesos C y E₁; B) Quesos C y E₂. Los números indican días de maduración.

Tabla 5.4. Valores medios y desviaciones estándar de la relación IOD/IOD₀ para las fracciones analizadas por urea-PAGE.

Queso	Tiempo (días)	α_{S1} -caseína	α_{S1-I} -caseína	β -caseína	γ -caseína	F3
C	61	0.83 ± 0.03 ^e	10.1 ± 0.3 ^{bcd}	0.95 ± 0.00 ^e	3.2 ± 0.2 ^a	1.4 ± 0.4 ^{ab}
	124	0.55 ± 0.05 ^d	13.2 ± 1.1 ^e	0.66 ± 0.04 ^d	5.3 ± 0.0 ^{cd}	2.5 ± 0.4 ^{cd}
	180	0.32 ± 0.08 ^{bc}	9.4 ± 1.7 ^{bc}	0.39 ± 0.07 ^{bc}	5.6 ± 0.1 ^d	3.0 ± 0.9 ^d
E ₁	61	0.58 ± 0.09 ^d	11.2 ± 1.6 ^{cde}	0.50 ± 0.08 ^c	3.5 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.1 ^a
	124	0.41 ± 0.02 ^c	10.8 ± 0.5 ^{cde}	0.32 ± 0.00 ^{ab}	4.8 ± 0.4 ^{bc}	1.7 ± 0.1 ^{abc}
	180	0.35 ± 0.02 ^{bc}	8.9 ± 2.1 ^{abc}	0.24 ± 0.03 ^a	5.3 ± 0.3 ^{cd}	2.3 ± 0.7 ^{bcd}
E ₂	61	0.28 ± 0.04 ^b	13.0 ± 1.1 ^{de}	0.66 ± 0.07 ^d	4.2 ± 0.0 ^b	1.1 ± 0.0 ^a
	124	0.16 ± 0.02 ^a	7.4 ± 1.9 ^{ab}	0.38 ± 0.02 ^b	5.1 ± 0.7 ^{bc}	1.4 ± 0.2 ^{ab}
	180	0.13 ± 0.01 ^a	6.1 ± 0.6 ^a	0.26 ± 0.02 ^a	5.6 ± 0.3 ^d	1.5 ± 0.1 ^{abc}
Condición de maduración		*	NS	*	NS	*
Tiempo de maduración		*	*	*	*	*
Interacción		*	*	*	NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-c}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Las fracciones caseínicas mayoritarias (α_{S1} - y β -caseína) disminuyeron con el tiempo de maduración, especialmente durante los primeros 124 días de almacenamiento. La disminución de la α_{S1} -caseína fue acompañada durante los primeros 2 meses de un incremento de las fracciones α_{S1} -I-caseína y F3, que son de menor peso molecular y se originan como consecuencia de la hidrólisis de aquella (Tabla 5.4.). El tratamiento temperatura-tiempo afectó significativamente la degradación de α_{S1} -caseína, observándose mayor degradación de la proteína en los quesos experimentales que en los quesos control y a su vez mayor degradación en los quesos E₂ que en los E₁ a igual tiempo de almacenamiento. Además, a 124 días, hubo una mayor (para los quesos E₂) o similar degradación (para los quesos E₁) de dicha fracción respecto a la observada en los quesos C hacia el final del período estudiado. Para el caso del tratamiento E₂, la disminución de la α_{S1} -caseína a 61 días es comparable (alrededor de 70%) con la observada para los quesos C a 180 días (Tabla 5.4.).

En general, los niveles de α_{S1} -I-caseína aumentaron de manera importante al comienzo del período de almacenamiento, para luego disminuir durante los últimos meses. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que la α_{S1} -I-caseína es el fragmento (f24-199) proveniente de la degradación de la α_{S1} -caseína, pero es a su vez susceptible de ser degradada por las enzimas presentes dando fragmentos menores (Fox y McSweeney, 1996). A partir de 124 días de maduración, se observó una mayor degradación de la α_{S1} -I-caseína para los quesos experimentales,

Capítulo 5 - Resultados y discusión

fundamentalmente para los E₂, lo cual sugiere una mayor liberación de péptidos de menor peso molecular, que pueden servir de sustrato para reacciones posteriores.

Los niveles de degradación de β -caseína también fueron afectados de forma significativa por el tratamiento, siendo éstos mayores en quesos experimentales que en quesos control, sin que se observen diferencias significativas entre los valores correspondientes a los quesos E₁ y E₂. Similarmente a lo observado para la α _{S1}-caseína, el nivel de degradación de la proteína a 61 ó 124 días en quesos experimentales fue comparable a los niveles observados para los quesos control a 124 ó 180 días, respectivamente.

La disminución de la β -caseína resultó en un importante aumento en las γ -caseínas. El aumento observado para las γ -caseínas ocurrió principalmente durante los primeros 61 días del período de almacenamiento de los quesos, luego siendo menor hasta los 180 días. Los quesos E₂ mostraron valores de γ -caseína significativamente mayores que los quesos control a 61 días de maduración, mientras que no hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos durante el resto del período evaluado.

5.3.2. Análisis de la FS por RP-HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa de las fracciones solubles en fase acuosa es uno de los métodos utilizados con mayor frecuencia para la caracterización de la proteólisis secundaria en quesos. Debido a su utilidad para el

Capítulo 5 - Resultados y discusión

análisis de péptidos medianos a pequeños, es considerada una técnica de alto poder discriminativo, y una de las más valiosas para evaluar autenticidad y calidad en quesos (Parente y col., 2012). En este estudio, los perfiles cromatográficos resultaron similares a aquellos informados por otros autores para queso Reggianito (Hynes y col., 2004; Sihufe y col., 2010a).

Se seleccionaron 16 picos cromatográficos (Figura 5.3.), los cuales totalizaron alrededor de un 90% del área bajo la curva de los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC de la fracción soluble en agua a pH 4.6, y que eluyeron entre los 4 y los 96 minutos de corrida. En el Anexo (Tabla A.12.), se muestran los valores de las determinaciones individuales. Mediante ANOVA, se observó que 14 de los 16 picos cromatográficos estuvieron significativamente afectados ($P < 0.05$) por el tiempo de maduración, mientras que 12 de ellos resultaron afectados por la combinación temperatura-tiempo.

Se obtuvieron perfiles cromatográficos similares para aquellas muestras correspondientes a los quesos C, E₁ y E₂ (Figura 5.4.). Las diferencias se observaron sólo en relación a las diferentes alturas de los picos, indicando que las condiciones de maduración estudiadas afectaron principalmente la velocidad de la proteólisis y no a las vías mediante las cuales ésta ocurre.

El área total de los 16 picos también resultó significativamente afectada tanto por el tiempo de maduración como por la combinación temperatura-tiempo. El área

Capítulo 5 - Resultados y discusión

total aumentó significativamente durante la maduración. Se observaron mayores valores de área total para quesos E₂ que para quesos E₁, y para los últimos con respecto a los quesos control, a excepción de lo observado a 124 días de maduración, donde los valores de área para los quesos experimentales E₁ y E₂ resultaron similares. El área total para los quesos experimentales a 124 días de maduración resultó similar a la de los quesos control a 180 días de maduración, lo cual mantiene relación con aquellas observaciones correspondientes a la evolución del IM en las diferentes muestras analizadas.

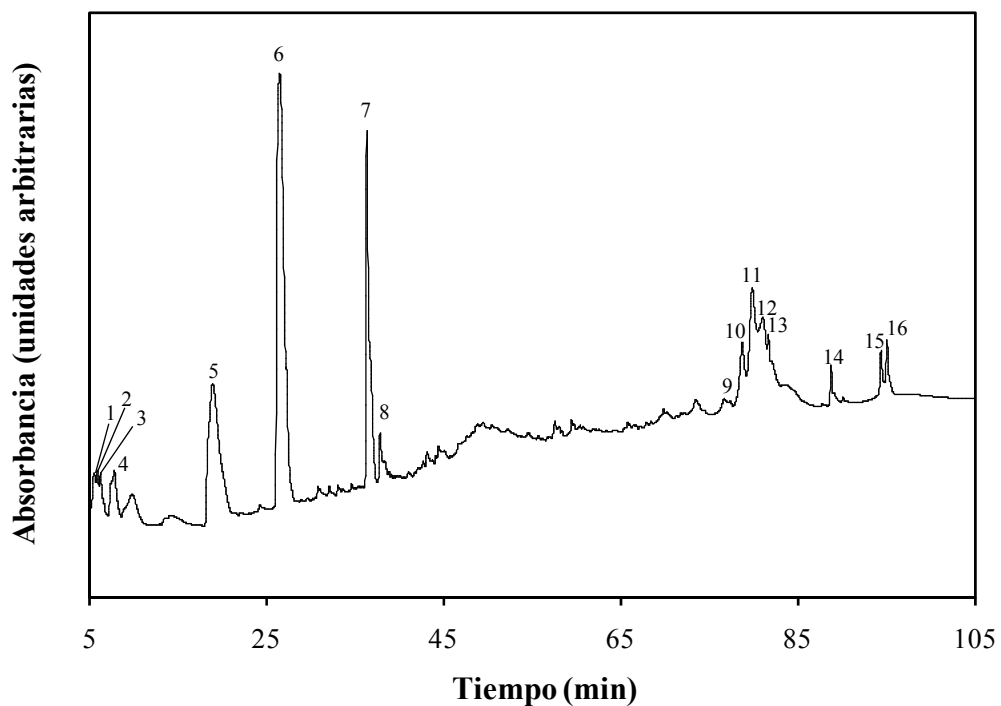
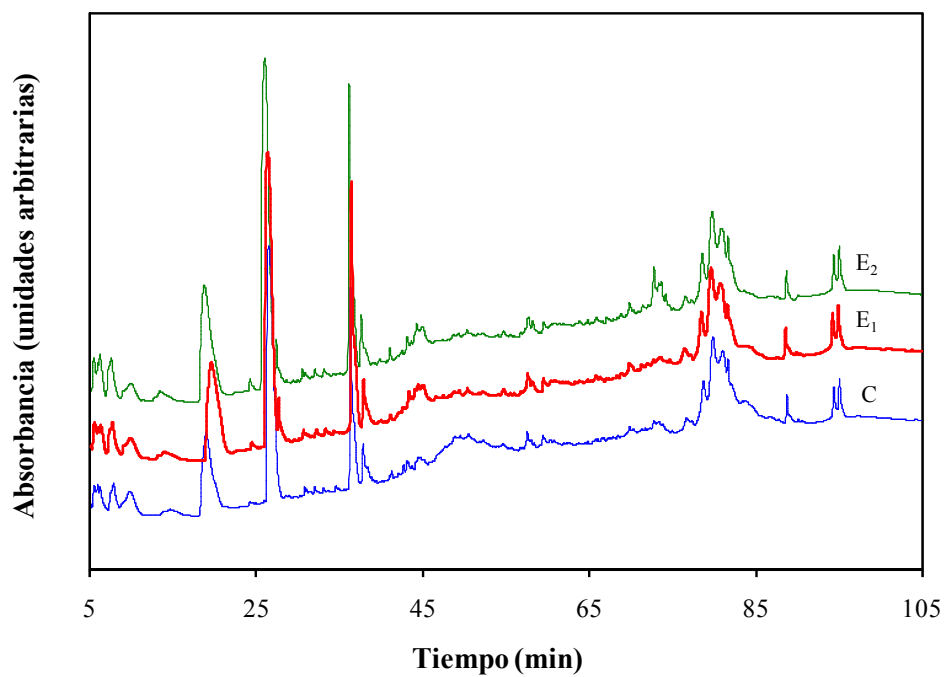


Figura 5.3. Cromatograma característico de la FS para el análisis de péptidos en una muestra de queso C a 180 días de maduración. Los números indican los picos seleccionados para su análisis.

A)



B)

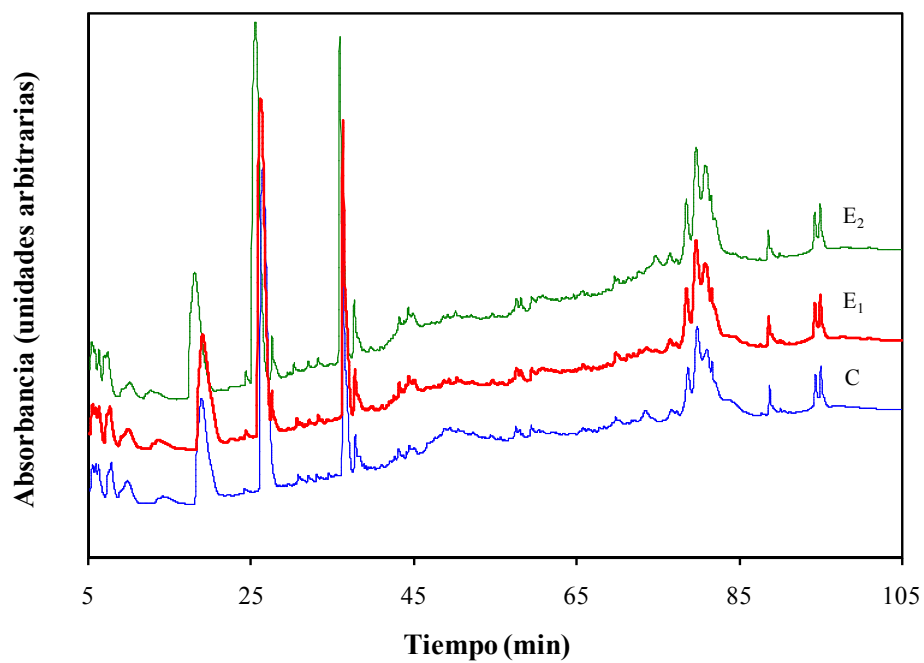


Figura 5.4. Cromatogramas de la FS para el análisis de péptidos en los quesos estudiados a: A) 124 días; B) 180 días de maduración.

5.3.3. Análisis de la FS-SSA por RP-HPLC

Para la validación del método analítico de determinación de aminoácidos por RP-HPLC, se inyectó una mezcla de soluciones estándar de 18 aminoácidos. Se utilizaron 7 diluciones diferentes de la solución estándar madre y se evaluó cada una de ellas por triplicado para obtener aquellos parámetros que permitan validar el procedimiento analítico. En la Tabla 5.5., se muestran los parámetros relacionados con la validación del método cromatográfico, para lo cual se evaluó precisión, linealidad, sensibilidad y rango lineal del método analítico utilizado. Los resultados obtenidos son aceptables para la metodología propuesta y resultaron comparables a los determinados por otros autores que han evaluado el contenido de aminoácidos libres en muestras de queso por RP-HPLC ([Verdini, 2002](#); [Ramo, 2008](#)).

A partir de las curvas de calibración correspondientes, se obtuvieron las concentraciones de 14 de los aminoácidos utilizados, dado que los pares Ser-His y Thr-Arg coeluyeron, de manera que no fue posible su cuantificación (Figura 5.5.). En la Tabla 5.6., se observan los valores de concentración de los aminoácidos determinados. En el Anexo (Tabla A.13.), se muestran los valores de las determinaciones individuales.

Tabla 5.5. Parámetros correspondientes a la validación de la determinación de aminoácidos libres por RP-HPLC.

Aminoácido	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	γ (L/mg)	Rango lineal (mg/L)	CV% máx.	r
Asp	0.32	0.98	27.35	0.98 - 103.06	12.38	0.9895
Glu	0.19	0.58	53.74	0.58 - 203.54	7.03	0.9972
Asn	0.13	0.41	74.57	0.41 - 71.09	4.99	0.9986
Gln	0.13	0.38	86.46	0.38 - 85.73	3.30	0.9989
Gly	0.29	0.89	50.68	0.89 - 46.39	10.70	0.9969
Thr	0.12	0.37	76.05	0.37 - 61.14	5.01	0.9986
Arg	0.27	0.80	53.99	0.80 - 96.58	5.61	0.9973
Ala	0.21	0.64	68.39	0.64 - 68.71	6.99	0.9983
Tyr	0.23	0.70	52.10	0.70 - 81.50	5.39	0.9971
Trp	0.21	0.62	50.68	0.62 - 115.79	5.92	0.9969
Met	0.13	0.38	70.79	0.38 - 66.84	3.03	0.9984
Val	0.15	0.44	47.37	0.44 - 51.79	7.65	0.9965
Phe	0.17	0.52	62.00	0.52 - 65.90	5.21	0.9979
Ile	0.17	0.53	50.10	0.53 - 40.37	7.57	0.9968
Leu	0.18	0.55	62.75	0.55 - 51.21	5.22	0.9980
Lys	0.31	0.93	55.03	0.93 - 218.03	10.54	0.9974

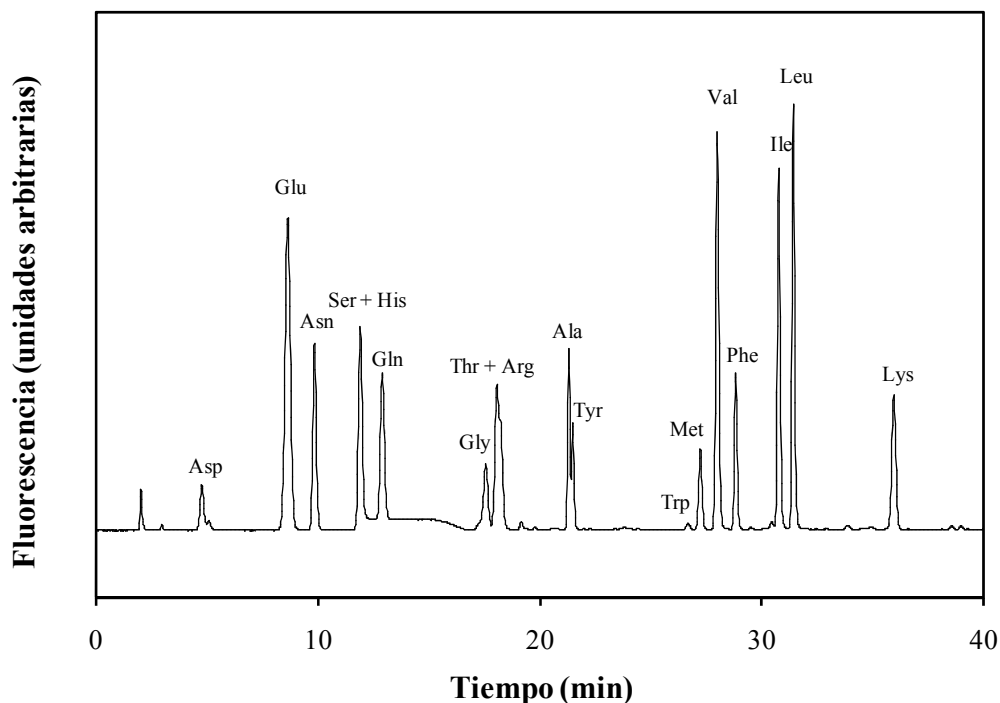


Figura 5.5. Cromatograma característico correspondiente a la determinación de aminoácidos libres en una muestra de queso C a 180 días de maduración.

Los aminoácidos Glu, Lys, Leu, Val e Ile estuvieron presentes en mayor concentración en todas las muestras de quesos, representando en conjunto alrededor del 60% de la concentración total de aminoácidos libres y alcanzando, hacia el final del período de maduración, valores individuales por encima de 200 mg/100 g queso para los 3 tratamientos evaluados (Tabla 5.6). [Hynes y col. \(2005\)](#) y [Sihufe y col. \(2010a\)](#) también informaron la presencia mayoritaria de estos aminoácidos en queso Reggiano. Es interesante destacar que Glu, Val, Leu y Lys, además de Pro, son los aminoácidos presentes en mayor concentración en otras variedades de quesos duros

Tabla 5.6. Concentraciones promedio (mg/100 g queso) y desviaciones estándar correspondientes a los aminoácidos libres determinados durante la maduración de queso Reggianito.

Queso	Tiempo (días)	Asp	Glu	Asn	Gln	Gly
C	61	43.8 ± 2.4 ^a	355.5 ± 12.9 ^a	108.6 ± 3.1 ^a	118.5 ± 8.1 ^a	37.5 ± 1.9 ^a
	124	69.0 ± 6.0 ^b	512.9 ± 58.7 ^{bc}	150.3 ± 17.1 ^{bcd}	157.5 ± 24.6 ^{abc}	63.1 ± 6.7 ^b
	180	108.8 ± 26.2 ^{cd}	675.8 ± 143.3 ^{de}	186.5 ± 38.6 ^{de}	178.5 ± 44.6 ^c	82.8 ± 14.7 ^{cde}
E ₁	61	51.6 ± 2.9 ^{ab}	388.4 ± 12.1 ^{ab}	121.4 ± 1.6 ^{ab}	128.3 ± 3.1 ^{ab}	42.2 ± 2.2 ^a
	124	94.9 ± 2.1 ^c	611.7 ± 16.3 ^{cde}	178.2 ± 5.4 ^{cde}	170.0 ± 6.0 ^{bc}	71.4 ± 2.4 ^{bcd}
	180	120.3 ± 5.1 ^d	737.5 ± 35.4 ^e	205.9 ± 9.7 ^e	184.2 ± 1.7 ^{cd}	97.5 ± 12.1 ^e
E ₂	61	60.2 ± 11.8 ^{ab}	486.8 ± 70.8 ^{abc}	144.5 ± 18.9 ^{abc}	147.0 ± 8.8 ^{abc}	65.6 ± 4.6 ^{bc}
	124	70.0 ± 3.8 ^b	556.7 ± 7.5 ^{cd}	159.3 ± 2.8 ^{bcd}	162.7 ± 3.5 ^{abc}	85.9 ± 3.6 ^{de}
	180	150.8 ± 9.3 ^e	963.4 ± 64.1 ^f	258.0 ± 20.8 ^f	227.2 ± 31.9 ^d	143.3 ± 11.8 ^f
Condicion de maduración		*	*	*	NS	*
Tiempo de maduración		*	*	*	*	*
Interacción		*	NS	NS	NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-f}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Tabla 5.6. (cont.). Concentraciones promedio (mg/100 g queso) y desviaciones estándar correspondientes a los aminoácidos libres determinados durante la maduración de queso Reggianito.

Queso	Tiempo (días)	Ala	Tyr	Trp	Met	Val
C	61	78.2 ± 0.3 ^a	45.6 ± 4.8 ^a	16.6 ± 0.3 ^a	39.3 ± 1.7 ^a	133.2 ± 5.4 ^a
	124	97.9 ± 9.4 ^{ab}	60.1 ± 16.4 ^{ab}	38.1 ± 1.7 ^d	63.2 ± 6.6 ^b	193.1 ± 21.8 ^{ab}
	180	116.7 ± 24.1 ^{bc}	85.6 ± 11.4 ^{bc}	46.7 ± 2.8 ^e	83.2 ± 15.9 ^d	249.9 ± 60.5 ^{bc}
E ₁	61	77.1 ± 1.1 ^a	47.4 ± 5.1 ^a	22.0 ± 2.1 ^b	44.5 ± 1.1 ^a	151.3 ± 3.2 ^a
	124	111.1 ± 3.0 ^{bc}	71.2 ± 2.1 ^{abc}	41.0 ± 0.4 ^d	75.2 ± 2.0 ^{bcd}	238.3 ± 9.6 ^{bc}
	180	123.9 ± 7.0 ^c	89.7 ± 5.7 ^c	48.4 ± 0.2 ^e	90.4 ± 4.4 ^d	280.2 ± 14.8 ^c
E ₂	61	106.8 ± 14.0 ^{bc}	70.2 ± 3.0 ^{abc}	31.6 ± 1.6 ^c	65.4 ± 8.5 ^{bc}	190.8 ± 29.4 ^{ab}
	124	109.4 ± 5.5 ^{bc}	83.8 ± 8.2 ^{bc}	48.8 ± 0.1 ^e	78.9 ± 0.2 ^{cd}	216.1 ± 6.4 ^b
	180	172.8 ± 4.2 ^d	145.2 ± 25.4 ^d	70.2 ± 0.3 ^f	131.7 ± 4.7 ^e	385.7 ± 30.5 ^d
Condicion de maduración		*	*	*	*	*
Tiempo de maduración		*	*	*	*	*
Interacción		*	NS	*	*	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-f}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Tabla 5.6. (cont.). Concentraciones promedio (mg/100 g queso) y desviaciones estándar correspondientes a los aminoácidos libres determinados durante la maduración de queso Reggianito.

Queso	Tiempo (días)	Phe	Ile	Leu	Lys	Total
C	61	84.5 ± 4.2 ^a	88.1 ± 2.5 ^a	174.1 ± 4.8 ^a	274.9 ± 3.6 ^a	1598.6 ± 52.2 ^a
	124	138.7 ± 15.8 ^b	143.1 ± 16.4 ^{bc}	237.3 ± 28.6 ^{ab}	404.3 ± 44.8 ^{ab}	2328.5 ± 274.5 ^{bc}
	180	182.5 ± 39.0 ^c	205.4 ± 45.6 ^d	303.1 ± 63.1 ^{bc}	522.0 ± 134.6 ^{bc}	3027.6 ± 664.4 ^d
E ₁	61	96.6 ± 4.1 ^a	101.8 ± 5.9 ^{ab}	188.3 ± 6.0 ^a	267.6 ± 15.0 ^a	1729.1 ± 65.5 ^{ab}
	124	161.4 ± 5.7 ^{bc}	173.8 ± 10.7 ^{cd}	277.0 ± 10.2 ^{bc}	424.6 ± 13.6 ^{ab}	2699.9 ± 84.0 ^{cd}
	180	192.2 ± 12.2 ^c	215.8 ± 7.5 ^d	316.3 ± 16.9 ^c	517.0 ± 27.9 ^{bc}	3219.4 ± 157.1 ^d
E ₂	61	161.4 ± 22.6 ^{bc}	139.3 ± 19.1 ^{bc}	294.2 ± 44.0 ^{bc}	283.6 ± 130.5 ^a	2247.3 ± 126.4 ^{abc}
	124	184.3 ± 3.0 ^c	171.6 ± 2.5 ^{cd}	306.3 ± 0.7 ^c	493.8 ± 3.3 ^{abc}	2727.6 ± 26.7 ^{cd}
	180	307.0 ± 22.3 ^d	308.2 ± 24.7 ^e	492.8 ± 30.6 ^d	658.6 ± 233.3 ^c	4414.9 ± 513.9 ^e
Condicion de maduración		*	*	*	NS	*
Tiempo de maduración		*	*	*	*	*
Interacción		*	NS	NS	NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-f}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Capítulo 5 - Resultados y discusión

tales como Parmigiano-Reggiano, Pecorino Romano, Canestrato Pugliese, Fossa, Mahón y Manchego ([Gobbetti y col., 2007](#)).

En numerosas variedades de quesos, el aminoácido Glu es responsable de contribuir en gran medida al sabor umami, actuando de esta manera como un intensificador del sabor ([Drake y col., 2007](#)). En queso Reggianito, niveles elevados de este aminoácido se han encontrado repetidamente, lo que sugiere una influencia significativa de este compuesto sobre la intensidad del flavor en esta variedad de queso. También pudo observarse la presencia en cantidades relativamente altas de los aminoácidos de cadena lateral ramificada (Val, Leu e Ile) que totalizaron más del 20% de los aminoácidos totales en los quesos madurados durante 180 días. Estos aminoácidos, sumados al grupo de los aminoácidos aromáticos y metionina, se encuentran formando el grupo de los principales precursores de los compuestos volátiles de aroma y sabor en queso ([Yvon y Rijnen, 2001](#)).

Los resultados de ANOVA mostraron que el tiempo de maduración y la combinación temperatura-tiempo afectaron significativamente las concentraciones de todos los aminoácidos estudiados, a excepción de Gln y Lys que no resultaron afectados por la combinación temperatura-tiempo. La concentración de todos los aminoácidos aumentó con el tiempo de maduración. En lo que concierne a la combinación temperatura-tiempo, en los quesos E₂ a 180 días de maduración, se observaron niveles más elevados para la mayoría de los aminoácidos estudiados con respecto a los quesos C y E₁.

Capítulo 5 - Resultados y discusión

El contenido total de aminoácidos en quesos E₁ y E₂ a 61 y 124 días de maduración resultó similar al correspondiente a quesos C a 124 y 180 días de maduración, respectivamente, lo que indica que entre 2 y 4 meses de maduración, los quesos experimentales muestran niveles de aminoácidos libres similares a los de quesos control con 2 meses más de maduración (Figura 5.6., Tabla 5.6.).

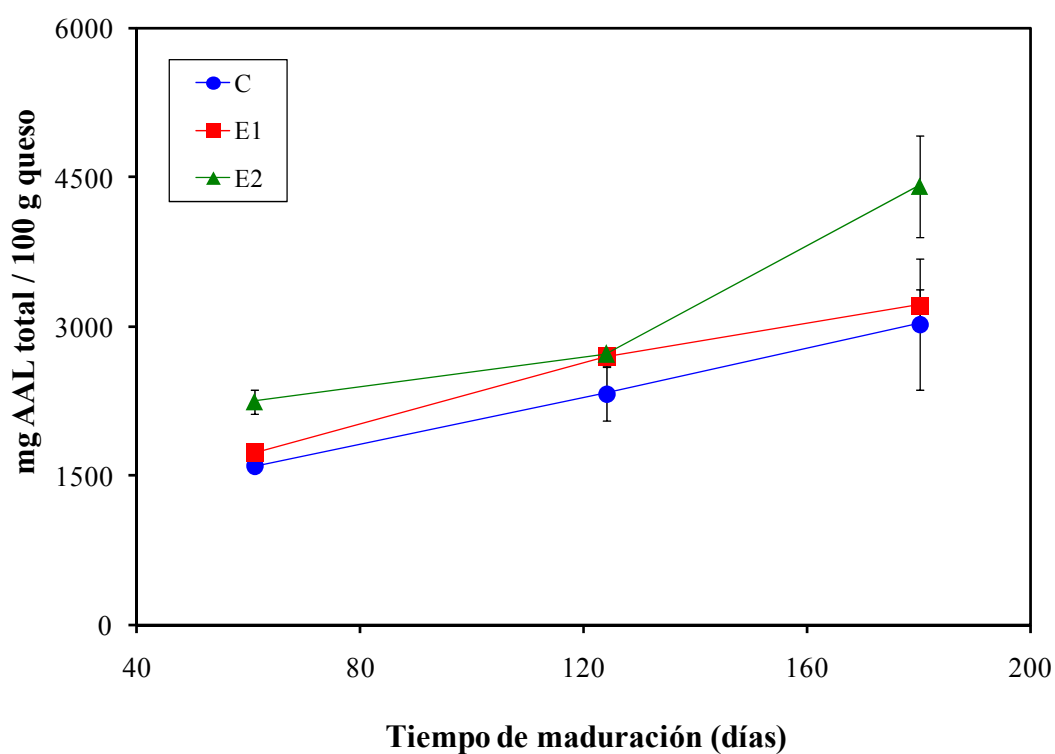


Figura 5.6. Valores de concentración de total de aminoácidos libres en los quesos estudiados. Las barras indican la desviación estándar.

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Si bien la combinación temperatura-tiempo afectó de manera significativa la concentración de la gran mayoría de los aminoácidos, esto no alteró la contribución relativa que cada aminoácido tiene en el perfil hacia el final del período de maduración, ya que se observan patrones de distribución similares para los aminoácidos libres en los quesos para los distintos tratamientos estudiados (Figura 5.7.).

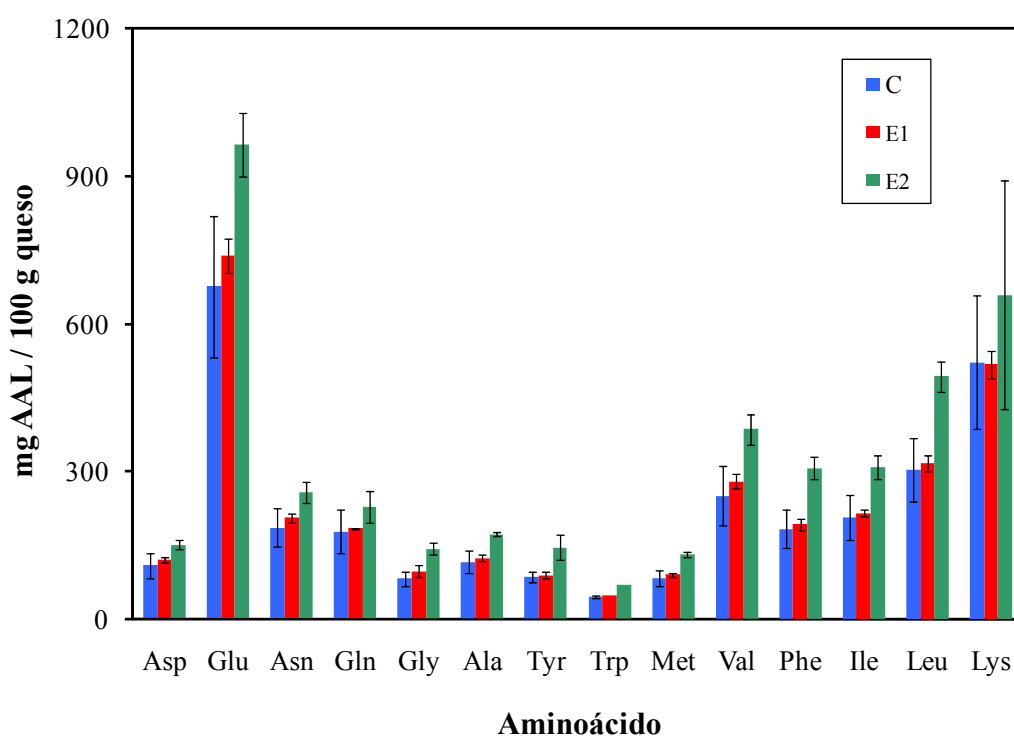


Figura 5.7. Niveles individuales de aminoácidos libres en los quesos estudiados a 180 días de maduración.

5.4. Seguimiento de la lipólisis: análisis de los ácidos grasos libres

Mediante una extracción previa con solventes orgánicos y posterior análisis cromatográfico de las muestras de queso Reggianito, se cuantificó un total de 9 AGL (C4:0-C18:1) (Figura 5.8.), observándose los valores de concentración para cada uno de ellos en la Tabla 5.7. En el Anexo (Tabla A.14.), se muestran los valores de las determinaciones individuales.

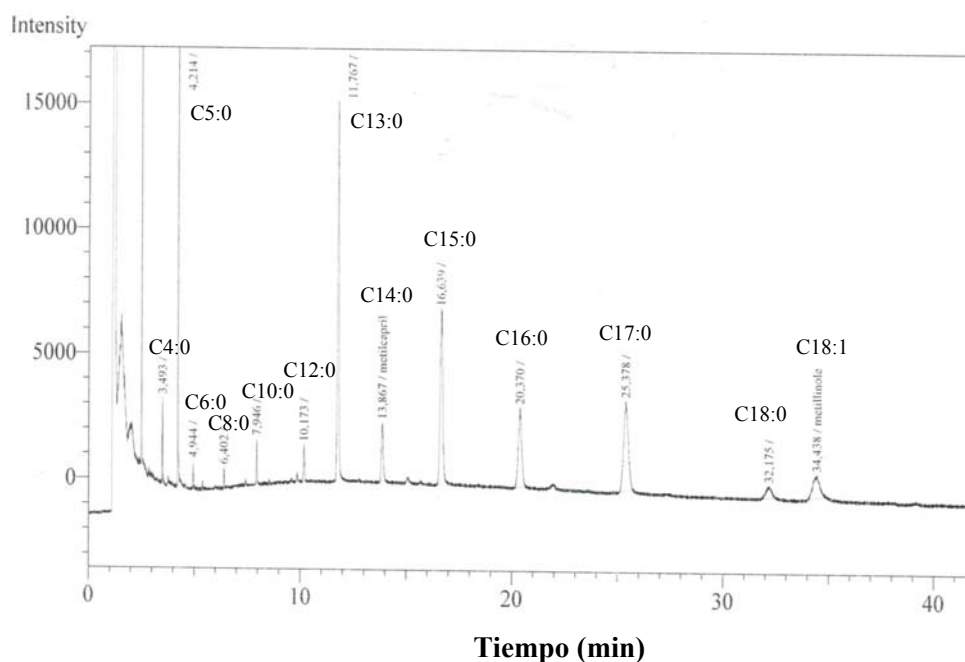


Figura 5.8. Cromatograma característico correspondiente a la determinación de ácidos grasos libres en una muestra de queso C a 180 días de maduración.

Los AGL mayoritarios fueron (en orden de importancia): C16:0, C18:1, C18:0 y C14:0, totalizando en conjunto alrededor del 80% del total de AGL en todas las muestras analizadas. Además de ser frecuente en otras variedades de quesos, en

Tabla 5.7. Concentraciones promedio (mg/100 g queso) y desviaciones estándar correspondientes a los ácidos grasos libres determinados durante la maduración de queso Reggianito.

Queso	Tiempo (días)	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1
C	61	3.9 ± 1.3 ^a	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.6	4.0 ± 1.7	5.7 ± 2.6	17.9 ± 8.2	28.8 ± 8.5	8.1 ± 3.2	23.8 ± 5.7
	124	5.8 ± 2.1 ^{abc}	1.9 ± 0.7	2.3 ± 1.0	4.6 ± 1.7	6.7 ± 2.5	20.1 ± 7.2	33.3 ± 8.0	8.0 ± 2.1	25.2 ± 7.9
	180	6.3 ± 1.0 ^{bc}	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.1	4.8 ± 0.3	7.3 ± 0.5	23.0 ± 1.5	34.2 ± 2.5	8.3 ± 0.4	26.7 ± 0.5
E ₁	61	4.5 ± 0.1 ^{ab}	1.4 ± 0.0	1.6 ± 0.1	3.4 ± 0.4	4.9 ± 0.4	15.5 ± 1.6	29.3 ± 1.4	9.5 ± 4.0	21.9 ± 2.5
	124	5.5 ± 0.5 ^{abc}	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.2	3.4 ± 0.5	4.9 ± 0.1	16.8 ± 0.4	28.6 ± 1.7	4.9 ± 1.2	20.3 ± 5.3
	180	5.7 ± 0.2 ^{abc}	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.1	2.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2	13.1 ± 0.0	26.6 ± 1.0	3.2 ± 0.3	15.5 ± 1.5
E ₂	61	5.1 ± 0.3 ^{abc}	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	3.6 ± 1.0	5.2 ± 1.8	15.4 ± 4.0	28.1 ± 2.6	5.8 ± 1.2	23.0 ± 3.2
	124	6.3 ± 0.3 ^{bc}	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	4.6 ± 0.3	6.7 ± 1.4	20.9 ± 5.9	30.8 ± 3.1	7.2 ± 1.4	27.6 ± 8.4
	180	6.8 ± 0.2 ^c	1.9 ± 0.0	1.8 ± 0.0	3.7 ± 0.3	5.2 ± 0.6	16.3 ± 1.7	31.1 ± 0.5	6.9 ± 0.3	27.6 ± 1.9
Condición de maduración		*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tiempo de maduración		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Interacción		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-c}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Capítulo 5 - Resultados y discusión

trabajos anteriores con queso Reggianito también se ha observado la misma predominancia de los mismos AGL (Perotti y col., 2005; Sihufe y col., 2007), lo cual se explica claramente teniendo en cuenta que estos 4 AGL son los mayoritarios en la composición de los triglicéridos de la grasa láctea bovina (Taylor y MacGibbon, 2011).

No se observaron efectos significativos de los factores tiempo de maduración, y combinación temperatura-tiempo para cada uno de los AGL estudiados, a excepción del caso del ácido butírico (C4:0) donde se observó un efecto significativo del tiempo de almacenamiento de los quesos, observándose mayores niveles para este AGL a 124 y 180 días de maduración (Tabla 5.7.). Como puede verse en la Figura 5.9., para aquellos quesos madurados durante 180 días, la combinación temperatura-tiempo no alteró los perfiles de AGL, ya que la contribución relativa al perfil de cada AGL se mantiene relativamente constante, observándose patrones de distribución similares para todos los AGL determinados.

Con respecto a la concentración de AGL totales, en el caso de Sihufe y col., (2007) y Perotti y col. (2008) se encontraron niveles de aproximadamente 2000 y 1800 mg/kg queso, respectivamente, para muestras de quesos madurados a 12°C durante 6 meses. Wolf y col. (2010) analizaron muestras de queso Reggianito pertenecientes a distintas marcas comerciales adquiridas en diferentes períodos del año. Los autores informaron un nivel promedio de AGL totales de alrededor de 2000 mg/kg queso, pero observaron una alta dispersión entre los valores para las distintas

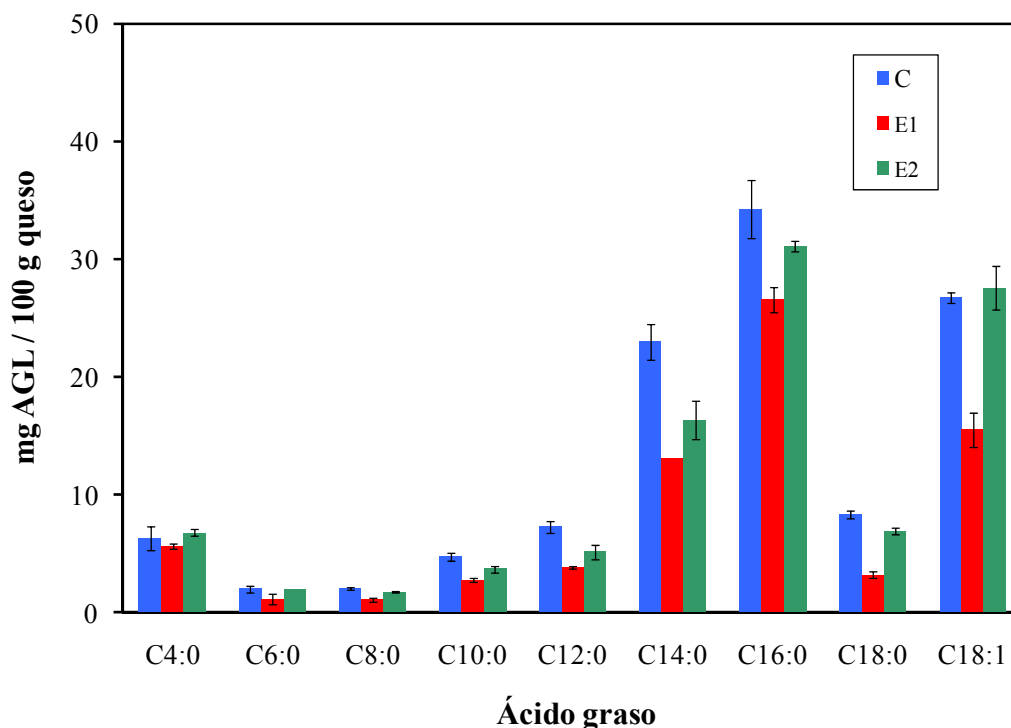


Figura 5.9. Niveles individuales de ácidos grasos libres en los quesos estudiados a 180 días de maduración.

muestras analizadas, encontrándose los valores en un rango aproximado de 1200-3800 mg/kg queso. Este nivel de lipólisis es considerado por algunos autores como moderado y similar al observado para otras variedades de quesos duros (por ejemplo, queso Cheddar) y semiduros (por ejemplo, queso Emmental) (Collins y col., 2004).

En el presente estudio, el nivel de AGL totales observado al final del período de maduración para los quesos control resultó ser de alrededor de 1100 mg/kg queso, y fue similar al observado para los quesos experimentales madurados durante 180

Capítulo 5 - Resultados y discusión

días (Figura 5.10.). Si se tiene en cuenta además, que para la mayoría de los AGL analizados, no se observó efecto significativo debido los factores analizados, es posible afirmar que las combinaciones temperatura-tiempo propuestas no fueron causa de modificaciones importantes tanto en los niveles de lipólisis característicos como en la proporción relativa de los AGL determinados durante el almacenamiento de los quesos.

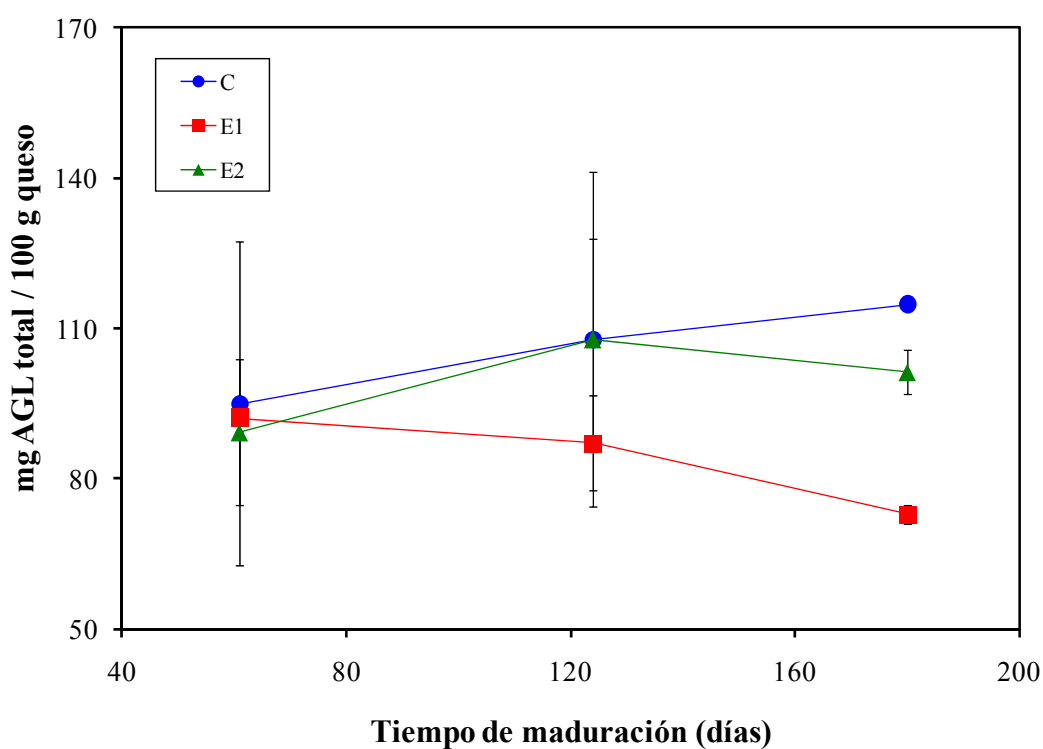


Figura 5.10. Valores de concentración de total de ácidos grasos libres en los quesos estudiados. Las barras indican la desviación estándar.

5.5. Análisis de los compuestos volátiles

5.5.1. Perfiles cromatográficos de los compuestos volátiles

Mediante el uso de la técnica de cromatografía gaseosa, previa extracción de los compuestos por SPME, se detectó un total de 62 picos en todas las muestras de queso analizadas, los cuales eluyeron en los primeros 32 min de corrida. Del total de picos, 46 de ellos (representando más del 90% del área total en cada cromatograma obtenido) fueron seleccionados para un estudio más detallado (Figura 5.11.). Estos picos estuvieron presentes en todas las muestras de queso a partir de 61 días de maduración. Teniendo en cuenta sus áreas cromatográficas, se realizó un ANOVA para cada uno de ellos. En algunos cromatogramas, los picos 12a - 12b y 14a - 14b, no presentaron una resolución adecuada, por lo tanto sus áreas se sumaron para el análisis estadístico (Tabla 5.9.). En el Anexo (Tabla A.15.), se muestran los valores de las determinaciones individuales.

Del total de picos estudiados, el área cromatográfica de la mitad de ellos no fue significativamente afectada por ninguno de los factores principales analizados (tiempo de maduración y combinación temperatura-tiempo). En los 23 picos restantes, la combinación temperatura-tiempo afectó significativamente a 14 de ellos, el tiempo de maduración afectó a otros 2 y ambos factores afectaron significativamente los 7 picos restantes. En los picos en que el tiempo resultó un factor significativo, se observó un comportamiento dispar. En algunos de ellos (picos 3, 10, 14, 15 y 32), se observó que sus valores de área cromatográfica aumentaron

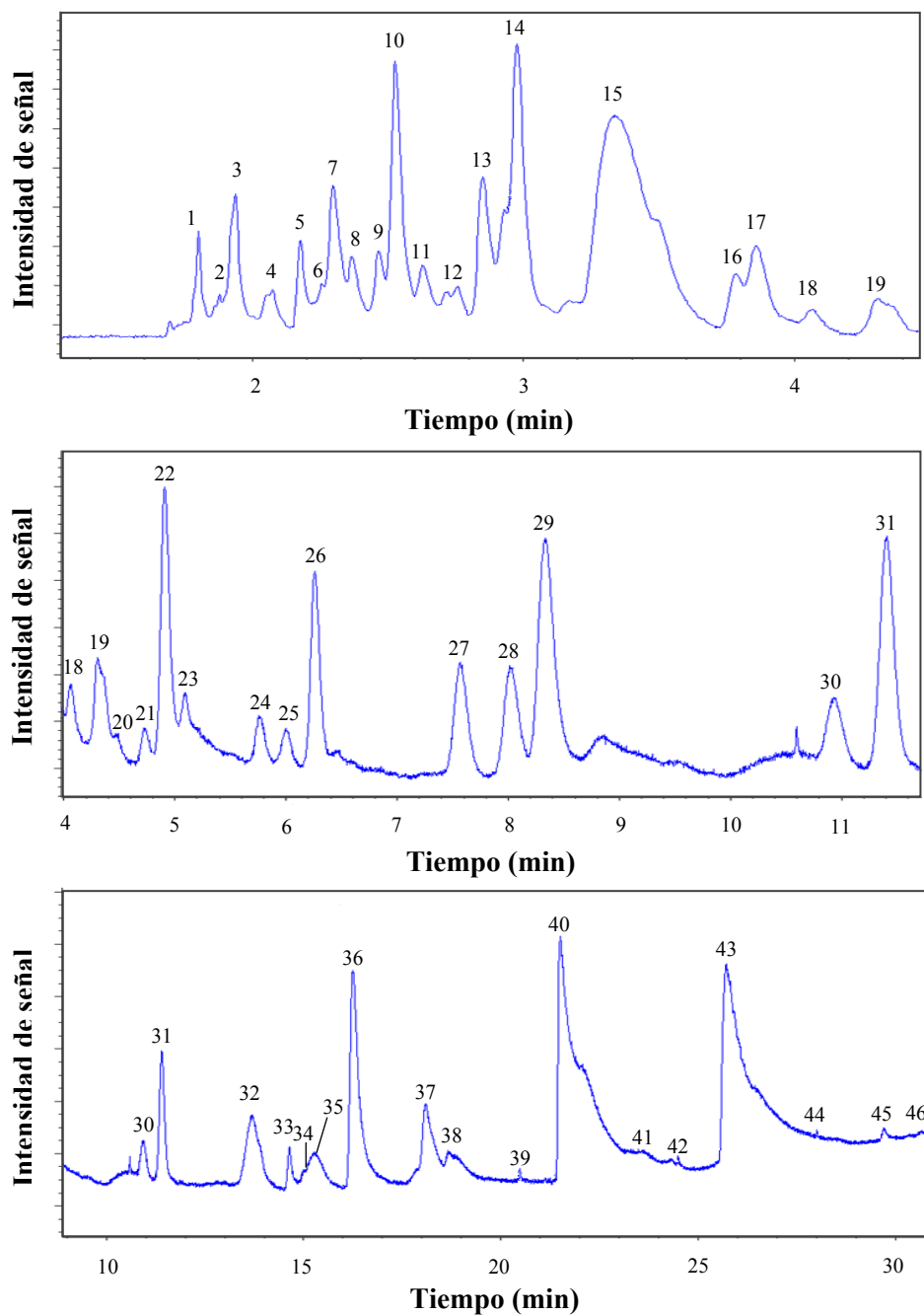


Figura 5.11. Cromatograma característico para el análisis de compuestos volátiles en una muestra de queso C a 180 días de maduración. Los números indican los picos seleccionados para su análisis.

*Capítulo 5 - Resultados y discusión***Tabla 5.9.** Valores de tiempos de retención (t_R), índices de Kováts (IK) y resultados de ANOVA de los compuestos volátiles en queso Reggianito.

Pico	t_R promedio (min)	IK	Condición de maduración	Tiempo de maduración	Interacción
1	1.795	615	NS	NS	NS
2	1.874	660	NS	NS	NS
3	1.914	683	NS	*	NS
4	2.059	750	NS	NS	NS
5	2.170	798	*	NS	NS
6	2.237	810	NS	NS	NS
7	2.293	819	NS	NS	NS
8	2.358	829	NS	NS	NS
9	2.461	845	NS	NS	NS
10	2.522	855	*	*	NS
11	2.618	870	NS	NS	NS
12a	2.712	885	NS	NS	NS
12b	2.745	891	NS	NS	NS
13	2.842	903	NS	NS	NS
14a	2.922	908	*	*	NS
14b	2.967	912	*	*	NS
15	3.340	938	*	*	NS
16	3.774	968	*	NS	NS
17	3.843	973	*	*	NS
18	4.054	988	NS	NS	NS
19	4.318	1003	NS	NS	NS
20	4.471	1007	NS	NS	NS
21	4.715	1015	NS	NS	NS

Las últimas tres columnas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Los picos 12a - 12b y 14a - 14b en algunos cromatogramas se resolvieron adecuadamente y en otros coeluyeron. El análisis estadístico se realizó a partir de sus áreas sumadas, mientras que los valores de IK se calcularon a partir de los t_R promedio en los casos en que los picos tuvieron resolución adecuada.

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Tabla 5.9. (cont.). Valores de tiempos de retención (t_R), índices de Kováts (IK) y resultados de ANOVA de los compuestos volátiles en queso Reggianito.

Pico	t_R promedio (min)	IK	Condición de maduración	Tiempo de maduración	Interacción
22	4.904	1021	NS	NS	NS
23	5.081	1026	*	NS	NS
24	5.755	1047	NS	NS	NS
25	5.989	1054	*	NS	NS
26	6.250	1062	NS	NS	NS
27	7.542	1101	*	NS	NS
28	7.997	1109	*	NS	NS
29	8.312	1115	*	NS	NS
30	10.912	1161	*	NS	NS
31	11.374	1169	*	NS	NS
32	13.745	1215	*	*	*
33	14.622	1237	*	NS	NS
34	14.954	1245	*	*	NS
35	15.313	1254	*	NS	NS
36	16.264	1277	*	*	NS
37	18.100	1330	*	NS	NS
38	18.702	1350	*	NS	NS
39	20.482	1409	NS	NS	NS
40	21.564	1451	NS	*	NS
41	23.557	1531	*	NS	*
42	24.499	1572	NS	NS	NS
43	25.865	1634	NS	NS	*
44	28.019	1738	NS	NS	NS
45	29.749	1830	NS	NS	NS
46	30.817	1893	NS	NS	NS

Las últimas tres columnas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Capítulo 5 - Resultados y discusión

con el tiempo de almacenamiento, mientras que en otros (picos 17, 34, 36 y 40) la tendencia fue la opuesta. Debido a la diversidad de vías metabólicas responsables de la formación de compuestos volátiles durante la maduración de quesos, existen familias de compuestos que tienen tendencia a aumentar su concentración durante toda la maduración, mientras que otras, por ser a su vez sustratos de reacciones posteriores, pueden presentar una tendencia a disminuir en las etapas finales de la maduración. Así por ejemplo, [Delgado y col. \(2011\)](#) observaron que durante la maduración de queso Ibores, la cantidad asociada a algunos grupos de compuestos aumentó durante los primeros 60 días de maduración y disminuyó durante los siguientes 30 días, particularmente en el caso de algunas cetonas. Éste también suele ser el comportamiento habitual de los aldehídos, comúnmente considerados compuestos transitorios en la maduración de quesos, ya que una vez producidos son transformados por reducción u oxidación a alcoholes o ácidos, respectivamente ([Le Quéré, 2011](#)).

Con respecto a la combinación temperatura-tiempo, se observó para el caso de 14 picos que los quesos control tuvieron mayores valores de área que los quesos experimentales, mientras que en otros 7 picos se observaron mayores valores en quesos experimentales. En el caso de los 7 picos en los que se constató que ambos factores (tiempo de maduración y combinación temperatura-tiempo) tuvieron efecto significativo, se observó en general un comportamiento similar. Esto es, cuando las áreas aumentaron con el tiempo de maduración en los quesos control, este comportamiento también fue observado en los quesos experimentales.

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Análogamente, cuando se observó una disminución de las áreas cromatográficas de algunos picos con el tiempo de maduración, tal comportamiento fue observado tanto para los quesos control como para los experimentales. Estos resultados indicarían que los aumentos de la temperatura de almacenamiento propuestos no alteran las rutas químicas de formación/desaparición de los compuestos volátiles durante la maduración de queso Reggianito pero sí modifican sus concentraciones.

A partir de los 61 días de maduración, no se observó la aparición o desaparición de picos cromatográficos para las combinaciones temperatura-tiempo estudiadas. Así, los cambios que se observaron en el perfil de compuestos volátiles se debieron a incrementos o disminuciones en la concentración de los distintos compuestos individuales presentes. Además, se observó que el área total en el comienzo del almacenamiento (día 0) era notablemente menor que el área total cuantificada desde 61 días de maduración en adelante. Particularmente, los picos 15, 27, 28, 30, 32, 40, 43 y 45 no fueron detectados al comienzo de la maduración, siendo algunos de ellos los que presentaron las mayores áreas en muestras correspondientes a 61 días en adelante. Esto indicaría que en los primeros 2 meses de almacenamiento es el momento en que ocurren la mayoría de los cambios que definen el perfil de compuestos volátiles característico de queso Reggianito.

Desde los 2 meses de maduración en adelante, no se observaron diferencias significativas en los valores de área total de las distintas muestras de queso con respecto al tiempo de maduración y a la combinación temperatura-tiempo, lo cual

sugiere que la concentración total de compuestos volátiles presentes en el queso no experimentó cambios durante los últimos 4 meses de almacenamiento. Además, no se observaron diferencias entre los distintos cromatogramas obtenidos, por lo que se podría afirmar que la aplicación de una temperatura elevada al comienzo de la maduración no alteró el perfil de compuestos volátiles característico de queso Reggianito.

5.5.2. Identificación de compuestos a partir de los datos obtenidos de los cromatogramas

Entre las herramientas analíticas que suelen ser usadas para la identificación de compuestos volátiles analizados por cromatografía gaseosa se encuentran:

- El uso de la espectrometría de masas que permite la comparación de los espectros de masas correspondientes a los compuestos que eluyen en los distintos picos cromatográficos con espectros de masas disponibles en bases de datos. Dada la alta especificidad de dichos espectros, los cuales funcionan como una huella digital del compuesto, si es posible superponer dos espectros similares, es muy probable que se identifique un compuesto.
- La comparación del tiempo de retención de un pico correspondiente a un compuesto incógnita con el tiempo de retención de un compuesto puro analizado en las mismas condiciones cromatográficas y que se supone está

Capítulo 5 - Resultados y discusión

presente en la muestra. Si los tiempos de retención resultan similares, es posible identificar el compuesto.

- La comparación del IK calculado con el IK de compuestos puros. Si el IK calculado para un pico incógnita es similar al IK de un compuesto ya tabulado, hay mayor probabilidad de que se identifique el compuesto. Además, como sugieren [Bianchi y col. \(2007\)](#), se deberían obtener diferencias en los valores de IK de alrededor de 100 unidades para compuestos análogos que sólo difieren en un átomo de carbono en el largo de su cadena, diferencias en los valores de IK de alrededor de 200 cuando difieren en dos átomos de carbono, etc. Así por ejemplo, se espera que el compuesto 1-butanol tenga un IK mayor en 100 unidades que el 1-pentanol o que el compuesto ácido hexanoico tenga un IK mayor en 200 unidades que el correspondiente al ácido butírico, lo cual proporciona una ayuda adicional para estimar en qué parte de un cromatograma deberían encontrarse ciertos compuestos de interés.
- La comparación de los compuestos volátiles identificados en trabajos anteriores en variedades de quesos similares a la que se está estudiando ayuda a identificar aquellos compuestos que son más frecuentes e importantes, así como la cantidad relativa en la que se encuentran y cualquier otra información adicional que pueda obtenerse.

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Es importante destacar que la información que se obtiene a partir de todos estos elementos de prueba es complementaria y ayuda a la identificación, pero que el análisis de los compuestos volátiles mediante la combinación de las técnicas de cromatografía gaseosa con la detección por espectrometría de masas es actualmente considerada esencial para lograr una caracterización química de los compuestos volátiles presentes en alimentos, en especial aquellos en los que están presentes formando mezclas complejas (Le Quéré, 2004).

En el presente estudio, algunos compuestos pudieron ser identificados usando la información disponible. A partir de los valores de los tiempos de retención (t_R) de los picos que se detectaron en los cromatogramas correspondientes a las muestras de queso y de los t_R de la mezcla de alcanos analizada en las mismas condiciones cromatográficas (Tabla 5.10), se determinaron los valores correspondientes a los índices de retención lineal o índices de Kováts. En la Tabla 5.9., se muestran los valores de IK obtenidos para los 48 picos cromatográficos analizados.

Se pudo identificar al etanol como el compuesto correspondiente al pico 15, con un t_R promedio de 3.34 min y un valor de IK de 938. Para ello se tuvo en cuenta que el etanol puro analizado bajo las mismas condiciones cromatográficas eluyó a 3.375 min, que Bianchi y col. (2007) informan un valor de IK de 932 para este compuesto y además que a partir de los 61 días de maduración este pico fue el de mayor área en todos los cromatogramas, lo cual es coincidente con lo informado por

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Wolf y col. (2010), quienes identificaron al etanol como uno de los tres compuestos volátiles con mayor área relativa en muestras de queso Reggianito.

Tabla 5.10. Valores de tiempos de retención (t_R) de la mezcla de alcanos usados en los cálculos del IK de los compuestos volátiles.

Compuesto	Número de átomos de carbono	t_R (min)
n-hexano	C6	1.769
n-heptano	C7	1.943
n-octano	C8	2.176
n-nonano	C9	2.803
n-decano	C10	4.228
n-undecano	C11	7.471
n-dodecano	C12	13.149
n-tridecano	C13	17.178
n-tetradecano	C14	20.246
n-pentadecano	C15	22.837
n-hexadecano	C16	25.146
n-heptadecano	C17	27.264
n-octadecano	C18	29.237
n-nondecano	C19	30.943
n-eicosano	C20	32.410

De igual manera, se propone que el pico 40 que eluye a un t_R promedio de 21.564 min y tiene un IK de 1451 corresponde al ácido acético (C2:0) y que el pico 43 que eluye a un t_R promedio de 25.865 min y tiene un valor de IK de 1634 corresponde a ácido butírico (C4:0). Dichas observaciones se proponen teniendo en cuenta que a partir de los 61 días de maduración, estos picos están dentro de los tres

Capítulo 5 - Resultados y discusión

más importantes (de mayor área) en todos los cromatogramas analizados, lo cual coincide con lo reportado por [Wolf y col. \(2010\)](#), quienes trabajando con muestras de queso Reggiano informaron a ambos como dos de los tres compuestos volátiles con mayor área relativa. Además, [Ziino y col. \(2005\)](#) informaron para estos compuestos valores de IK de 1461 (ácido acético) e IK de 1635 (ácido butírico), los cuales son muy similares a los obtenidos en este estudio.

Similarmente se propone que el pico 45 que eluye a un t_R de 29.749 min y tiene un IK de 1830 corresponde al ácido caproico (C6:0). Como respaldo de la afirmación con respecto a los ácidos grasos C2:0, C4:0 y C6:0, de acuerdo con la expresión de cálculo de los IK, se espera que compuestos similares químicamente que sólo difieren en cuanto al número de átomos de carbono tengan una diferencia de aproximadamente 100 unidades en el valor de IK por cada átomo de carbono que se agrega a la cadena. Así, se observó un ΔIK cercano a 200 unidades entre los picos propuestos como C6:0 y C4:0, al igual que al comparar los IK de C4:0 y C2:0 (Tabla 5.9).

Es importante mencionar que, si bien la obtención de índices de Kováts para compuestos volátiles presentes en los quesos analizados empleando la combinación SPME-GC y utilizando el detector FID no posibilita por sí misma la identificación de los compuestos resueltos en el cromatograma, constituye una herramienta que proporciona información muy confiable de manera sencilla y que puede ser de gran

ayuda para complementar estudios de la fracción volátil de muestras de queso Reggianito por SPME-GC usando un espectrómetro de masas como detector.

5.6. Análisis sensorial

En la Tabla 5.11., se muestran los valores promedio para los 10 atributos sensoriales estudiados según los diferentes tratamientos aplicados durante la maduración de queso Reggianito. En el Anexo (Tabla A.16.), se muestran los valores de las determinaciones individuales.

Los puntajes de los atributos para quesos madurados a 12°C durante 180 días son similares a aquellos obtenidos en otros trabajos para quesos Reggianito madurados bajo las mismas condiciones (Candiotti y col., 2002; Sihufe y col., 2010b). Del análisis de la evolución de los 10 atributos sensoriales evaluados para los quesos control desde 61 días hasta 180 días de maduración, puede concluirse que los atributos flavor genuino y gusto salado son los que más cambian y son fundamentalmente los responsables de la diferencia que hay entre un queso Reggianito maduro con 180 días de almacenamiento y uno inmaduro de 61 días.

El aumento en los atributos de flavor genuino y gusto salado con el tiempo de maduración puede ser explicado considerando algunos de los diferentes eventos que ocurren durante la maduración de quesos. Como es sabido, durante la maduración ocurren numerosas vías bioquímicas como por ejemplo el catabolismo del citrato y el

Tabla 5.11. Valores promedio y desviaciones estándar de los atributos sensoriales determinados durante la maduración de queso Reggianito.

Queso	Tiempo (días)	Aroma	Color	Aspecto de la masa	Corte granular	Fracturabilidad
C	61	4.3 ± 0.1 ^{ab}	5.1 ± 0.1 ^{bc}	8.1 ± 0.0	7.8 ± 0.2 ^{bc}	8.6 ± 0.0 ^{bcd}
	124	4.0 ± 0.4 ^a	4.4 ± 0.3 ^a	8.1 ± 0.0	8.0 ± 0.1 ^{cd}	8.8 ± 0.1 ^e
	180	4.1 ± 0.2 ^{ab}	5.3 ± 0.2 ^{bc}	8.1 ± 0.0	7.5 ± 0.3 ^{ab}	8.6 ± 0.0 ^{ab}
E ₁	61	5.1 ± 0.9 ^{ab}	5.5 ± 0.2 ^c	8.0 ± 0.1	7.6 ± 0.1 ^{ab}	8.6 ± 0.2 ^{bcd}
	124	4.7 ± 1.4 ^{ab}	4.8 ± 0.7 ^{ab}	8.0 ± 0.0	8.1 ± 0.1 ^{cd}	8.8 ± 0.0 ^{de}
	180	5.2 ± 1.0 ^{ab}	4.8 ± 0.2 ^{ab}	7.9 ± 0.2	7.5 ± 0.2 ^{ab}	8.6 ± 0.0 ^{abc}
E ₂	61	5.5 ± 0.5 ^{ab}	5.4 ± 0.1 ^{bc}	8.0 ± 0.1	7.8 ± 0.2 ^{bc}	8.6 ± 0.2 ^{ab}
	124	5.4 ± 0.7 ^{ab}	5.3 ± 0.1 ^{bc}	8.0 ± 0.1	8.3 ± 0.1 ^d	8.8 ± 0.0 ^{cde}
	180	5.7 ± 0.1 ^b	4.9 ± 0.1 ^{abc}	7.9 ± 0.0	7.3 ± 0.3 ^a	8.4 ± 0.1 ^a
Condición de maduración		*	NS	NS	NS	NS
Tiempo de maduración		NS	*	NS	*	*
Interacción		NS	NS	NS	NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-c}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$).

Tabla 5.11. (cont.). Valores promedio y desviaciones estándar de los atributos sensoriales determinados durante la maduración de queso Reggianito.

Queso	Tiempo (días)	Sensación al paladar	Flavor genuino	Flavor residual	Salado	Amargo
C	61	7.6 ± 0.2	4.4 ± 0.4 ^a	2.7 ± 0.3	4.4 ± 0.0 ^a	2.4 ± 0.1 ^a
	124	7.6 ± 0.4	5.6 ± 0.5 ^{ab}	3.3 ± 0.0	4.4 ± 0.0 ^a	2.6 ± 0.6 ^{ab}
	180	7.8 ± 0.4	5.7 ± 0.2 ^b	2.5 ± 0.4	5.2 ± 0.1 ^{bc}	3.0 ± 0.2 ^{bc}
E ₁	61	7.6 ± 0.2	5.1 ± 0.3 ^{ab}	2.9 ± 0.2	4.6 ± 0.7 ^a	2.8 ± 0.0 ^{abc}
	124	7.5 ± 0.2	5.6 ± 1.3 ^{ab}	3.4 ± 0.3	4.7 ± 0.1 ^{ab}	3.0 ± 0.2 ^{bc}
	180	7.0 ± 0.4	6.1 ± 0.4 ^b	3.2 ± 0.6	5.4 ± 0.1 ^c	3.1 ± 0.0 ^{bc}
E ₂	61	7.6 ± 0.2	5.1 ± 0.5 ^{ab}	3.1 ± 0.1	4.5 ± 0.5 ^a	2.9 ± 0.1 ^{bc}
	124	7.5 ± 0.0	5.9 ± 0.1 ^b	2.7 ± 0.1	5.2 ± 0.0 ^{bc}	3.0 ± 0.1 ^{bc}
	180	7.2 ± 0.2	5.9 ± 0.4 ^b	2.8 ± 0.5	5.5 ± 0.2 ^c	3.2 ± 0.1 ^c
Condición de maduración		NS	NS	NS	NS	*
Tiempo de maduración		NS	*	NS	*	NS
Interacción		NS	NS	NS	NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA para los diferentes factores analizados.

^{a-c}: Los valores promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*: Efecto significativo ($P < 0.05$). NS: Efecto no significativo ($P > 0.05$)

Capítulo 5 - Resultados y discusión

lactato, la lipólisis y la proteólisis, que contribuyen al desarrollo del flavor en quesos (McSweeney, 1997). Así, en estudios previos se informó sobre una clara asociación entre el desarrollo de aroma y flavor genuino con la producción de aminoácidos libres y ácidos grasos libres durante la maduración de queso Reggianito (Sihufe y col. 2010b). En este sentido, en el presente estudio fue posible observar que el contenido de aminoácidos totales a 180 días era aproximadamente el doble que a 61 días de maduración.

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). En este sentido, tanto los contenidos de cloruro medidos como los puntajes asignados desde el punto de vista sensorial para este atributo pueden ser claramente relacionadas con dicho comportamiento (Tabla 5.2.).

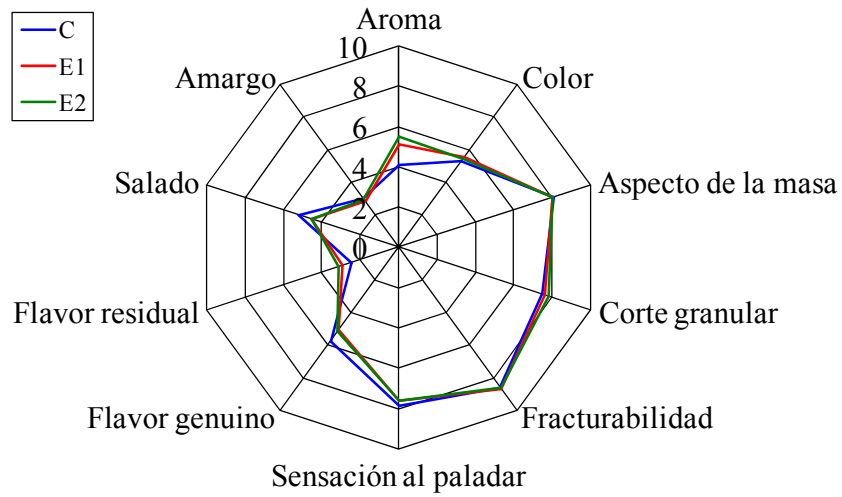
Sihufe y col. (2010a) estudiaron la influencia que tiene una temperatura de maduración elevada (18°C), aplicada durante todo el período de maduración, sobre las características sensoriales de queso Reggianito. Los autores hallaron que la temperatura de maduración afectó de manera significativa todos los atributos sensoriales. Particularmente, los puntajes para los atributos aspecto de la masa, corte granular, fracturabilidad y sensación al paladar en quesos madurados a 18°C mostraron una clara tendencia a disminuir con el tiempo de maduración, mientras

Capítulo 5 - Resultados y discusión

que aquellos correspondientes a los atributos color, gusto amargo y flavor residual en quesos madurados a 18°C mostraron una tendencia opuesta. Pese a que los valores para estos atributos no correspondían a características sensoriales atípicas en queso Reggianito, en general es deseable tener características sensoriales que sean, en líneas generales, similares a las de los quesos control. En este estudio, los puntajes asignados a los atributos sensoriales de los quesos experimentales madurados durante 61 y 124 días de maduración fueron muy similares a aquellos correspondientes a quesos control completamente maduros (Figura 5.12.).

No se observó efecto significativo ($P > 0.05$) de la interacción entre los factores tiempo de maduración y combinación temperatura-tiempo (Tabla 5.11.). El factor combinación temperatura-tiempo solo afectó de manera significativa los atributos de aroma y gusto amargo. Por lo tanto, puede afirmarse que el uso de temperaturas de maduración elevadas resulta en una aceleración suave y moderada en el desarrollo de las características sensoriales de queso Reggianito. Además, en el presente trabajo de Tesis se pudo comprobar que la aplicación de temperaturas de maduración elevadas al inicio de la maduración produjo como resultado que las concentraciones de las caseínas mayoritarias disminuyeron, mientras que los niveles de péptidos y aminoácidos aumentaron a velocidades mayores en quesos experimentales, pero siguiendo un patrón similar que en quesos control, lo que refuerza la idea de una aceleración controlada de la maduración en queso Reggianito.

A)



B)

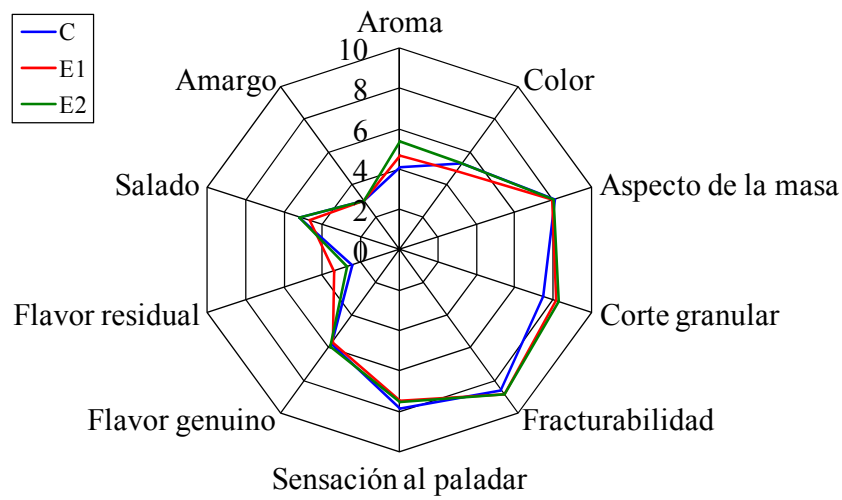


Figura 5.12. Comparación de los valores medios de los atributos sensoriales de los quesos C a 180 días con quesos experimentales a: A) 61 días; B) 124 días de maduración.

Capítulo 5 - Resultados y discusión

Mediante PCA, la información correspondiente a los análisis sensoriales de los quesos fue resumida en un gráfico *biplot* (Figura 5.13.), donde se muestran los *loadings* (información relacionada con los parámetros medidos) y los *scores* (información referida a las muestras de queso estudiadas) de los primeros 2 componentes principales. Los componentes principales PC1 y PC2 explicaron el 35.8% y 22.2% de la variabilidad total, respectivamente. Teniendo en cuenta que los valores del PC1 de las muestras se distribuyen de derecha a izquierda (desde 61 a 180 días de maduración), se puede afirmar que el primer componente principal se puede relacionar claramente con el tiempo de maduración. Por otro lado, no se pudo encontrar una asociación clara con algún factor para la distribución de los *scores* correspondientes al PC2.

Los atributos relacionados con la textura del queso (aspecto de la masa, corte granular, fracturabilidad y sensación al paladar) caracterizan a los quesos con poco tiempo de maduración, probablemente debido a que es durante un estadio temprano del almacenamiento, donde los quesos sufren los mayores cambios (Figura 5.13.). De manera similar, los atributos relacionados con el flavor del queso (aroma, flavor genuino, gusto salado y gusto amargo) correlacionaron mejor con las muestras de quesos con mayor tiempo de almacenamiento, según puede observarse claramente en el *biplot* (Figura 5.13.). Finalmente, teniendo en cuenta la posición relativa de las muestras a lo largo del eje correspondiente al PC1, se puede llegar a inferir que los quesos experimentales a 61 y 124 días de maduración tuvieron un tiempo de maduración equivalente al de los quesos control a 180 días de maduración.

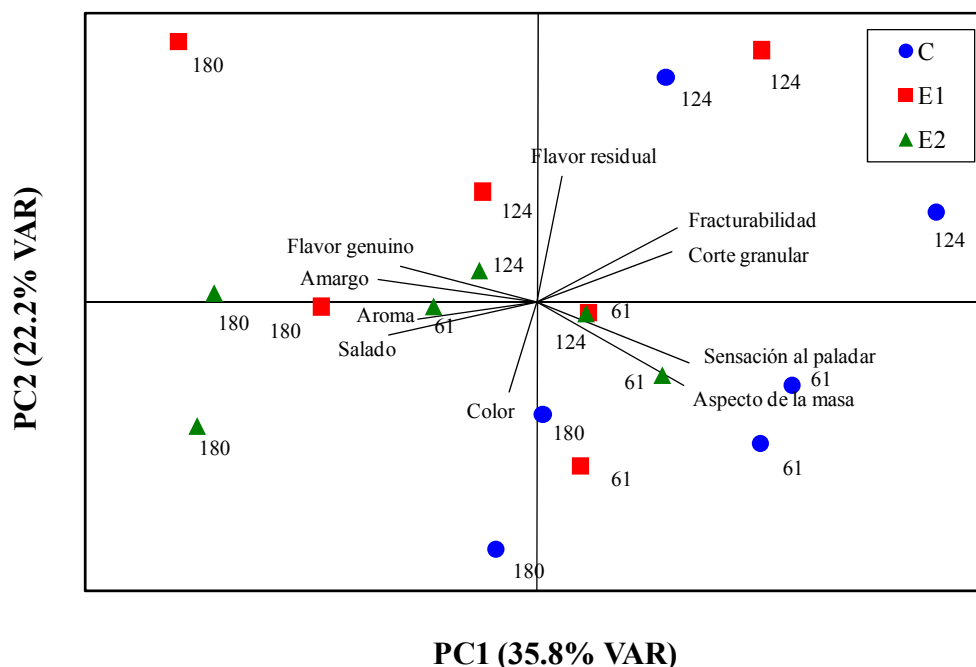


Figura 5.13. Gráfico *biplot* correspondiente al PCA de los datos de la evaluación sensorial de los quesos estudiados. Los números indican los días de maduración de las muestras.

5.7. Análisis de Componentes Principales

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de maduración, así como la combinación temperatura-tiempo que resulte más adecuada teniendo en cuenta toda la información disponible, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). En este análisis se consideraron dos factores, el tiempo de maduración (61, 124 y 180 días de maduración) y la combinación temperatura-tiempo bajo la cual fueron madurados (quesos C, E₁ y E₂). Se tuvieron en cuenta un total de 101 variables

Capítulo 5 - Resultados y discusión

provenientes de los análisis realizados: IM (%), 5 fracciones del análisis de las fracciones caseínicas principales por urea-PAGE (IOD relativa), 16 picos provenientes del análisis por RP-HPLC de la fracción soluble en agua a pH 4.6 (área de pico/100 g queso), las concentraciones de 14 aminoácidos determinadas mediante RP-HPLC de la fracción soluble en SSA 2.5% (mg AAL/100 g queso), las concentraciones de 9 ácidos grasos libres determinados mediante cromatografía gaseosa (mg AGL/100 g queso), las áreas de 46 picos correspondientes al análisis de compuestos volátiles mediante cromatografía gaseosa (área de pico/100 g queso) y los puntajes asignados por el panel a los 10 atributos sensoriales evaluados. Como resultado, el conjunto de los datos consistió en una matriz de 18 muestras de queso y 101 parámetros medidos sobre dichas muestras. Dado que las variables analizadas difieren en magnitud, se realizó el PCA basado en una matriz de correlación (Coker y col., 2005).

En la Figura 5.14., se presenta una gráfica bidimensional o *biplot* de los 2 primeros componentes principales, los cuales resultaron responsables del 56.4% de la variabilidad total observada. El PC1 (38.6% VAR) se relacionó claramente con el tiempo de maduración, debido a que las muestras (*scores*) se distribuyen de izquierda a derecha a lo largo del eje que representa al primer componente principal. Por otro lado, el PC2 (17.8% VAR) separó a las muestras en el espacio por efecto de las condiciones de maduración de los quesos, ya que se observó una separación en distintas zonas del eje de abscisas para *scores* correspondientes a los distintos tratamientos evaluados para almacenar los quesos (Figura 5.14.). A fin de

Capítulo 5 - Resultados y discusión

profundizar la información que proporciona el *biplot* y para hacer más clara la observación acerca de las asociaciones o vínculos que existen entre los parámetros medidos para el seguimiento de las vías bioquímicas durante la maduración de queso Reggiano y aquellos atributos sensoriales que lo caracterizan, se procedió a analizar por separado la información global previamente resumida en la Figura 5.14.

En la Figura 5.15., se muestra la distribución de los *loadings* correspondientes a las técnicas de seguimiento de la proteólisis, además de los correspondientes a los

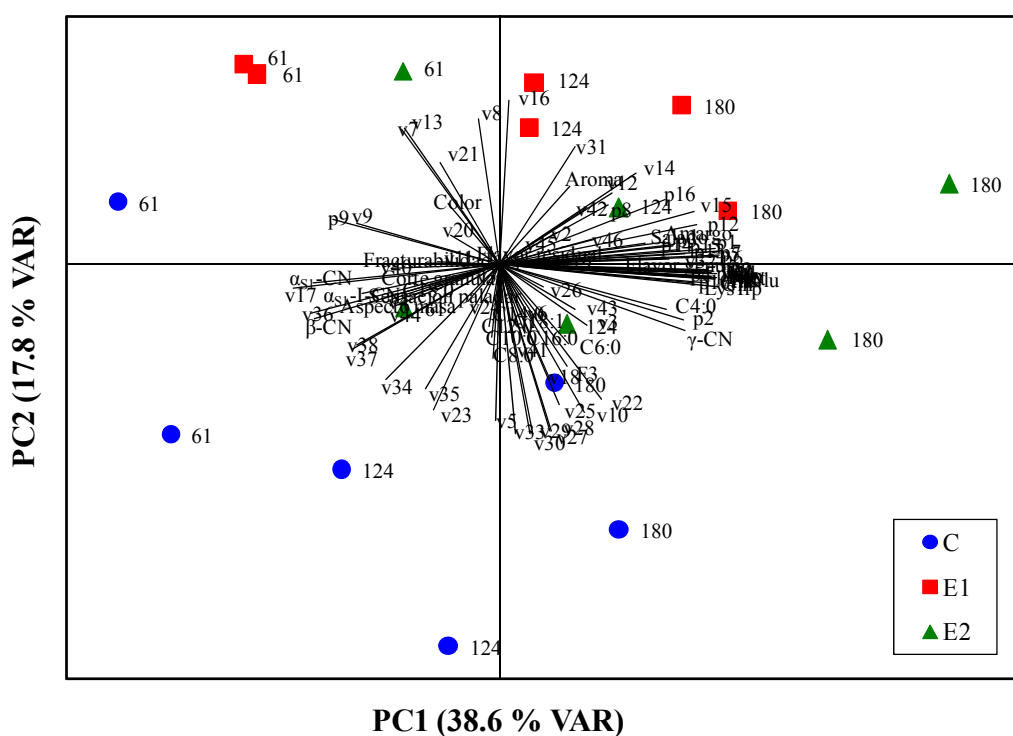


Figura 5.14. Gráfico *biplot* correspondiente al PCA de los datos de proteólisis, lipólisis, análisis de compuestos volátiles y análisis sensorial de los quesos estudiados. Los números indican los días de maduración de las muestras.

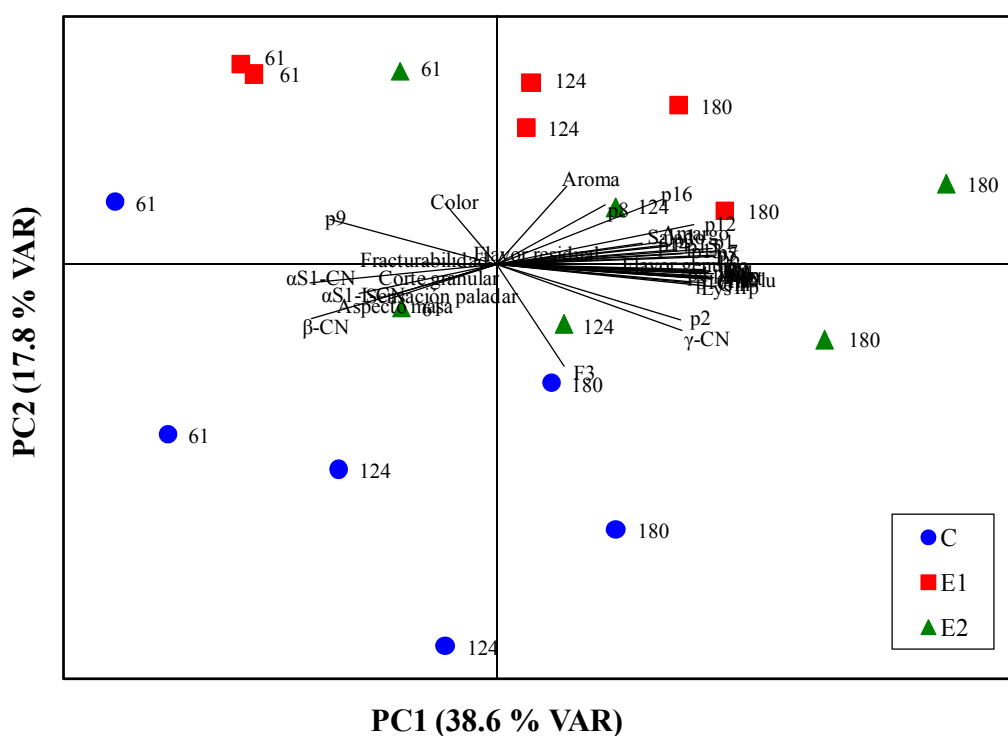
Capítulo 5 - Resultados y discusión

atributos sensoriales evaluados. Puede observarse cómo los distintos parámetros medidos se separan a lo largo del eje correspondiente al PC1 en función del comportamiento que han tenido durante la maduración. Así, puede observarse que aquellos atributos sensoriales que se relacionan con la textura del queso (fracturabilidad, corte granular, sensación al paladar y aspecto de la masa) se vinculan claramente con la degradación de las fracciones de caseínas más importantes evaluadas por urea-PAGE (α_{S1-} , α_{S1-I} y β -caseína) que ocurre fundamentalmente en estadios tempranos de la maduración (Figura 5.15.). Dicha observación resalta el papel fundamental que se atribuye a la degradación de las caseínas mayoritarias para el desarrollo de la textura de queso maduro.

La tendencia a crecer a medida que avanza la maduración que se observó para las fracciones F3 y γ -caseína, para la mayoría de los picos analizados por RP-HPLC y para todos los AAL se ve claramente reflejada en el hecho de que los *loadings* correspondientes a estos parámetros estén todos ubicados en el lado derecho de la gráfica del *biplot* (Figura 5.15.). Además, se destaca la asociación existente entre todos estos parámetros (que permiten hacer un seguimiento de la proteólisis secundaria) y la evolución del atributo flavor genuino, ya mencionado como una de las características sensoriales que mejor permite diferenciar un queso Reggianito inmaduro de uno maduro. Resulta de particular interés la asociación entre el atributo amargo y algunos picos cromatográficos observados en la zona final de los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC (picos con características hidrofóbicas). Esto no sorprende ya que es conocida la relación entre péptidos hidrofóbicos y el

desarrollo de sabor amargo en quesos (Engel y col., 2001; McSweeney y Sousa, 2000).

En el caso de los AGL, el escaso o nulo efecto del tiempo de maduración y de la combinación temperatura-tiempo sobre las concentraciones individuales se vió reflejada en los pequeños valores para los *loadings*, con excepción de C4:0. El ácido butírico, C4:0, aumentó moderadamente durante la maduración, de acuerdo con el valor positivo registrado para el PC1 *loading* (Figura 5.16.).



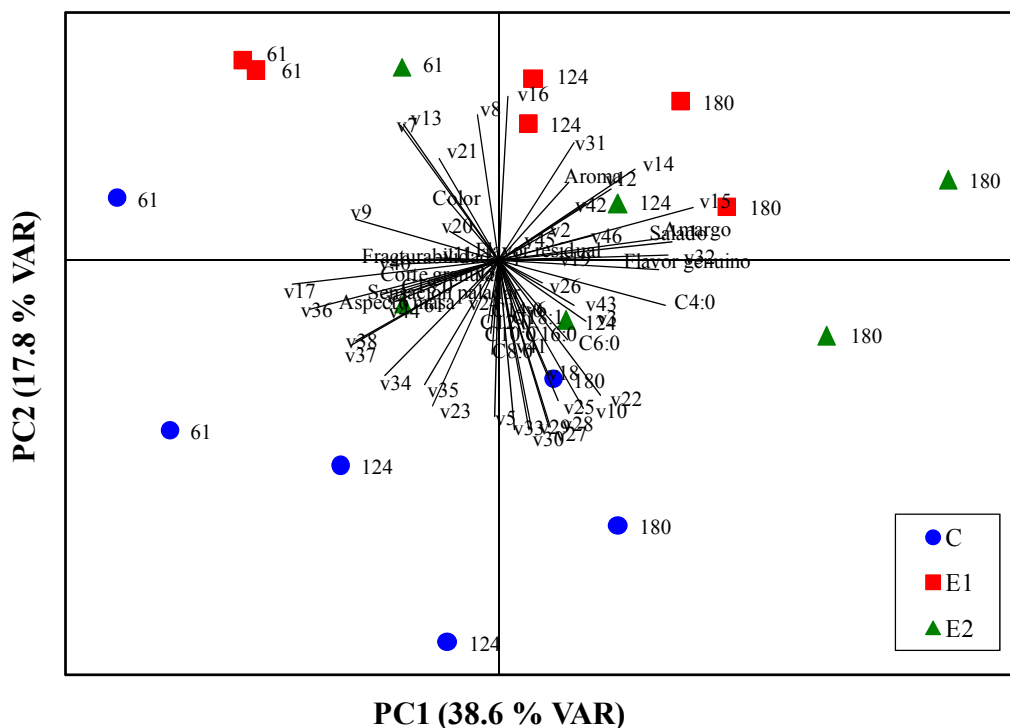


Figura 5.16. Gráfico *biplot* (Figura 5.14.) mostrando solamente los datos de lipólisis, análisis de compuestos volátiles y análisis sensorial de los quesos estudiados. Los números indican los días de maduración de las muestras.

En lo que se refiere a los compuestos volátiles, se observó una distribución de los *loadings* en todas las direcciones, lo cual puede atribuirse a los diferentes comportamientos observados para los distintos picos evaluados. Para aquellos picos donde el factor con mayor peso estadístico fue la combinación temperatura-tiempo, se observaron valores de PC1 *loadings* cercanos a cero. Por otro lado, para aquellos picos donde las áreas fueron mayores en quesos experimentales que en quesos control, se ubicaron en la mitad superior del *biplot*, mientras que en aquellos en los

Capítulo 5 - Resultados y discusión

que las áreas fueron mayores en los quesos C se ubicaron en la mitad inferior del *biplot* (Figura 5.16.). De igual manera, los picos cromatográficos ubicados en el lado izquierdo de la gráfica mostraron una tendencia a disminuir con el tiempo de maduración y representan a aquellos que caracterizan un queso con menor tiempo de almacenamiento, siendo análogo el razonamiento para aquellos picos con valores de PC1 *loadings* positivo (a la derecha del *biplot*) y las muestras que representan a los quesos con mayor tiempo de maduración (Figura 5.16.).

Finalmente, la distribución de los *scores* a lo largo del PC1 permitió observar que las muestras de los quesos E₂ con 61 días de maduración eran equivalentes a los quesos C con 124 días de maduración; y que aquellas muestras de los quesos experimentales (principalmente los E₂) madurados durante 124 días fueron equivalentes a los quesos C con 180 días de maduración. Dado que los quesos C con 6 meses de maduración constituyen el nivel óptimo de maduración a alcanzar para queso Reggianito (tiempo y temperatura de almacenamiento habituales en la industria), es posible afirmar que las estrategias de aceleración de la maduración por aumento de la temperatura durante los períodos iniciales de almacenamiento propuestas permitieron lograr una reducción de aproximadamente 2 meses en el período total almacenamiento de los quesos. Además, la estrategia correspondiente a los quesos E₂ aparece como la que resulta más efectiva en este aspecto. Así, teniendo en cuenta una gran cantidad de información que abarca las diversas áreas involucradas en la bioquímica de la maduración, complementada con las características sensoriales de este queso, se podría afirmar que un aumento en la

Capítulo 5 - Resultados y discusión

temperatura de maduración a 20°C durante el primer mes y luego completando el almacenamiento a 12°C permite obtener a los 4 meses, quesos de características similares al Reggianito madurado durante 6 meses a la temperatura convencional, sin que se detecte además la aparición de características no habituales y/o indeseables.

Capítulo 6

Conclusiones

Capítulo 6

Conclusiones

Se evaluó el efecto del uso de temperaturas elevadas durante el inicio de la maduración de queso Reggianito sobre los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos, sensoriales y sobre los principales eventos bioquímicos (proteólisis, lipólisis y formación de compuestos volátiles) que caracterizan a este tradicional queso duro Argentino. Las diferentes metodologías analíticas usadas permitieron establecer las características asociadas al desarrollo de la textura, flavor y calidad general de un queso Reggianito maduro, además de evaluar de qué manera se ven afectadas debido a la aplicación de una variante tecnológica como el aumento de la temperatura de almacenamiento de los quesos durante períodos de tiempo breves y al comienzo de la maduración.

Los parámetros contenido de humedad y contenido de sal mostraron un comportamiento característico de quesos que han sido salados por inmersión y madurados sin envoltura. Esto es, mientras el contenido de humedad disminuyó, el de contenido de cloruro aumentó durante el almacenamiento de los quesos y para todos los tratamientos evaluados, resultando en ambos casos muy similares para todos los quesos hacia el final del período de maduración. Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas en ningún momento de la maduración entre los valores de humedad de los quesos E₁ y E₂ respecto del observado para los

quesos control a 180 días.

Los valores correspondientes al IM en los quesos experimentales fueron significativamente afectados por la combinación temperatura-tiempo y por el tiempo de maduración, lo cual se reflejó en un incremento en los niveles de proteólisis debido a ambos factores. A 4 meses de maduración, los quesos experimentales mostraron un nivel de nitrógeno soluble (péptidos pequeños y medianos, aminoácidos y productos de degradación) que resultó similar al de un queso control madurado durante 6 meses.

Desde el punto de vista microbiológico, se realizaron estudios para observar la evolución de microorganismos termófilos (componentes principales del fermento natural de suero) y mesófilos (los cuales permiten hacer inferencias sobre la presencia de cepas NSLAB durante la maduración). En el caso de los termófilos, se observaron recuentos cercanos a 10^6 - 10^7 UFC/g queso inmediatamente después de la etapa de salado y luego hubo una disminución drástica de estas poblaciones y los recuentos resultaron prácticamente nulos. Por otra parte, los recuentos a 30°C no mostraron un incremento en las poblaciones de microorganismos mesófilos debido al aumento inicial de temperatura de maduración de los quesos, lo cual se podría asociar con cambios limitados y controlados en el crecimiento de NSLAB.

A través del análisis de urea-PAGE se identificaron y cuantificaron 5 fracciones caseínicas (α_{S1} -, α_{S1} -I-, β - y γ -caseína y F3). Se observó una disminución

Capítulo 6 - Conclusiones

en las fracciones mayoritarias (α_{S1} - y β -caseína) con el tiempo de almacenamiento de los quesos, especialmente durante los primeros 4 meses. La disminución de la α_{S1} -caseína fue acompañada durante los primeros 2 meses de un incremento de las fracciones α_{S1} -I-caseína y F3 y se observó una mayor hidrólisis en los quesos experimentales que en los quesos control (siendo en el caso de los quesos E₂ a los 2 meses similar a la observada en los quesos C a 6 meses). Por otra parte, la disminución de la β -caseína se observó principalmente en los primeros 61 días y resultó en un importante aumento en las γ -caseínas.

Utilizando la técnica de RP-HPLC, se analizó la fracción soluble en agua a pH 4.6 y se seleccionaron 16 picos cromatográficos, los cuales representaron alrededor de un 90% del área bajo la curva de los cromatogramas. Se obtuvieron perfiles cromatográficos similares para todas las muestras analizadas, observándose sólo algunas diferencias en la altura de los picos, lo cual estaría indicando que las variantes tecnológicas propuestas afectaron fundamentalmente la velocidad de la proteólisis, pero no la forma en la que ésta se lleva a cabo.

Mediante el uso de RP-HPLC de la fracción soluble en ácido sulfosalicílico 2.5%, se determinaron las concentraciones de 14 aminoácidos libres en todas las muestras analizadas. Los aminoácidos Glu, Lys, Leu, Val e Ile fueron los que estuvieron presentes en mayor concentración en todas las muestras de quesos, representando en conjunto alrededor del 60% de la concentración total. El tiempo de maduración y la combinación temperatura-tiempo afectaron significativamente las

Capítulo 6 - Conclusiones

concentraciones de todos los aminoácidos estudiados, a excepción de Gln y Lys que no resultaron afectados por la combinación temperatura-tiempo. En lo que respecta al contenido total de AAL, se observó que entre 2 y 4 meses de maduración, los quesos experimentales exhibieron niveles similares a los de quesos control con 2 meses más de maduración. Resulta de particular importancia destacar que, si bien las condiciones de maduración propuestas afectaron significativamente la concentración de la gran mayoría de los aminoácidos cuantificados, las mismas no provocaron diferencias de consideración en los perfiles de distribución característicos observados para todas las muestras analizadas.

Los ácidos grasos libres cuantificados por cromatografía gaseosa que estuvieron presentes en mayor proporción fueron C16:0, C18:1, C18:0 y C14:0, representando en conjunto alrededor del 80% del total de AGL en todas las muestras analizadas. La mayoría de ellos, excepto el C4:0, no mostraron diferencias significativas en sus concentraciones debido a los tratamientos evaluados. Por otro lado, el nivel de AGL total observado al final del período de maduración para los quesos control fue de aproximadamente 1100 mg/kg queso y resultó similar al observado para los quesos experimentales madurados durante 6 meses. Las combinaciones temperatura-tiempo propuestas no modificaron los perfiles típicos de AGL, ya que se observaron perfiles de distribución similares para todos los AGL identificados y en todas las muestras analizadas.

Capítulo 6 - Conclusiones

En el análisis de compuestos volátiles, se seleccionaron un total de 46 picos cromatográficos que representaron aproximadamente el 90% del área total en cada cromatograma obtenido y que estuvieron presentes en todas las muestras de queso a partir de los 61 días de maduración. Al cuantificar los valores de las áreas de dichos picos, la mitad de ellos no resultó significativamente afectada por ninguno de los factores analizados (tiempo de maduración y combinación temperatura-tiempo), mientras que sólo en 7 picos resultaron significativos ambos factores simultáneamente.

Los mayores cambios en los perfiles de compuestos volátiles evaluados se observaron al comienzo del almacenamiento de los quesos, ya que a partir de 61 días, los cambios observados se debieron a incrementos o disminuciones en la concentración de los distintos compuestos individuales presentes, pero no a la aparición y/o desaparición de picos. En este sentido, el área cromatográfica total observada para el día 0 resultó notablemente menor que la observada desde los 61 días de maduración en adelante, siendo además los cromatogramas correspondientes a todas las muestras analizadas muy similares. Así, la aplicación de una temperatura de maduración elevada al comienzo de la maduración no alteró el número de compuestos volátiles, pero sí modificó la cantidad de algunos de ellos.

Teniendo en cuenta los t_R de los picos cromatográficos que se detectaron en todos los cromatogramas y los t_R de una mezcla de alcanos analizada en las mismas condiciones cromatográficas, se calcularon los IK correspondientes. A partir de

Capítulo 6 - Conclusiones

dichos valores de IK complementados con observaciones realizadas por otros autores trabajando en condiciones similares y con muestras de queso Reggianito, fue posible vincular algunos de los picos cromatográficos con compuestos volátiles de interés. Así, se identificó la presencia de etanol (pico 15), ácido acético (pico 40), ácido butírico (pico 43) y ácido caproico (pico 45), los cuales parecen tener activa participación en los perfiles de compuestos volátiles obtenidos para todas las muestras y, por ende, en el desarrollo de algunas características organolépticas típicas de queso Reggianito.

Del análisis de la evolución de los 10 atributos sensoriales evaluados para los quesos control desde 61 días hasta 180 días de maduración, se observó que los atributos flavor genuino y gusto salado fueron los que más cambiaron durante el almacenamiento de los quesos. Teniendo en cuenta que el factor combinación temperatura-tiempo sólo afectó de manera significativa los atributos aroma y gusto amargo, es posible afirmar que el uso de temperaturas de maduración elevadas resultó en una aceleración suave y moderada en el desarrollo de las características sensoriales de queso Reggianito.

En líneas generales, se observó que los puntajes asignados a los atributos sensoriales de los quesos experimentales madurados durante 61 y 124 días de maduración fueron muy similares a aquellos correspondientes a quesos control completamente maduros. Dicha observación fue reforzada teniendo en cuenta la información obtenida mediante el Análisis de Componentes Principales, a través de

la cual fue posible concluir que los quesos experimentales con 2 y 4 meses de maduración tuvieron un tiempo de maduración equivalente al de los quesos control madurados durante 6 meses.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales usando la información proveniente de todas las metodologías de análisis para el seguimiento de los eventos más importantes que ocurren durante la maduración de queso Reggianito. Claramente, el PC1 (38.6% VAR) se asoció con el factor tiempo de maduración, mientras que a lo largo del PC2 (17.8% VAR), la separación de las muestras se debió a la condición de maduración usada. La observación de los diferentes *biplots*, permitió realizar interesantes asociaciones entre los parámetros medidos (*loadings*) y las muestras analizadas (*scores*), a medida que transcurre la maduración. Finalmente, la distribución de las muestras en el gráfico bidimensional permitió concluir que los quesos madurados durante 6 meses a la temperatura convencional (quesos C) presentaron características comparables a las de los quesos experimentales madurados durante 4 meses (fundamentalmente con los quesos E₂). Así, mediante el aumento de la temperatura de almacenamiento durante el primer mes, fue posible disminuir de manera considerable (aproximadamente 2 meses) el período total de maduración de queso Reggianito, obteniéndose un producto que conserva sus características habituales.

Anexo

Tabla A.1. Valores de pH.

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	61	5.48	5.52
		5.61	5.54
	124	5.33	5.39
		5.34	5.38
	180	5.68	5.64
		5.74	5.72
E ₁	61	5.52	5.51
		5.55	5.67
	124	5.38	5.41
		5.42	5.42
	180	5.73	5.77
		5.75	5.77
E ₂	61	5.51	5.67
		5.57	5.69
	124	5.46	5.44
		5.47	5.45
	180	5.79	5.83
		5.83	5.85

Tabla A.2. Valores de contenido de humedad (g/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	61	38.06	38.00
		37.84	37.87
	124	36.92	36.69
		36.98	36.84
	180	36.39	35.81
		36.32	35.87
E₁	61	37.73	37.68
		37.39	37.86
	124	37.18	36.30
		36.97	36.51
	180	35.86	35.88
		35.95	35.67
E₂	61	37.11	37.55
			37.06
		37.08	37.21
	124	36.27	36.41
		36.16	36.49
	180	36.05	35.93
35.85		35.95	

Tabla A.3. Valores de contenido de cloruro (g/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	61	0.58401	0.52035
		0.57535	0.52216
		0.57290	0.52423
	124	0.87509	0.88792
		0.86689	0.89438
		0.87232	0.89448
	180	1.0400	1.0472
		1.0324	1.0414
		1.0332	1.0435
E ₁	61	0.59725	0.57673
		0.60510	0.57265
		0.59787	0.57822
	124	0.88376	0.95232
		0.88820	0.95511
		0.88761	0.95327
	180	1.0959	1.0764
		1.0915	1.0774
		1.0895	1.0784
E ₂	61	0.71803	0.69862
		0.71423	0.69219
		0.72010	0.68585
	124	0.92202	0.92395
		0.90683	0.92191
		0.91606	0.92548
	180	1.0767	1.0585
		1.0530	1.0628
		1.0564	1.0610

Tabla A.4. Valores de contenido de proteína total (g/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	61	34.397	33.592
		33.830	33.100
	124	33.512	33.433
		33.516	33.612
	180	32.395	32.695
		32.821	32.735
E₁	61	33.788	34.777
		33.873	34.039
	124	33.019	33.351
		32.881	33.248
	180	33.190	32.673
		32.950	33.808
E₂	61	34.082	33.633
		33.418	33.021
	124	33.367	34.279
		33.929	33.335
	180	32.559	33.280
		32.333	32.804

Tabla A.5. Valores de contenido de proteína soluble (g/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	61	4.6405	4.2751
		4.1595	4.2355
	124	5.8820	5.8979
		5.3562	6.3202
	180	7.0628	6.4628
		6.9824	6.5421
E₁	61	5.0164	5.0039
		4.9526	5.1800
	124	6.7529	6.5542
		6.6564	6.2253
	180	7.7862	7.4383
		7.6699	7.5953
E₂	61	5.4315	5.9202
		5.7946	5.8563
	124	6.7743	7.0227
		7.4252	7.0080
	180	8.3108	7.8643
		8.5806	7.9516

Tabla A.6. Recuentos microbiológicos a 30°C (Log UFC/g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	61	8.64	8.32
	124	7.57	7.73
	180	6.99	7.36
E₁	61	8.04	8.00
	124	6.72	6.73
	180	5.15	6.45
E₂	61	7.68	7.40
	124	6.54	6.48
	180	6.36	5.78

Tabla A.7. Valores de α_{s1} -caseína (IOD/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	0	205.8	309.0
	61	217.4	208.0
	124	150.8	133.8
	180	95.1	67.1
E₁	0	280.4	144.8
	61	110.9	137.0
	124	83.0	90.1
	180	76.8	70.5
E₂	0	376.9	466.1
	61	129.3	105.4
	124	74.1	59.9
	180	58.9	51.3

Tabla A.8. Valores de α_{s1} -I-caseína (IOD/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	0	3.6	4.5
	61	42.0	40.1
	124	56.8	50.7
	180	42.9	33.0
E₁	0	4.5	5.4
	61	49.8	60.7
	124	51.4	55.0
	180	51.2	36.4
E₂	0	8.0	10.0
	61	98.3	85.4
	124	70.7	70.0
	180	60.9	53.1

Tabla A.9. Valores de β -caseína (IOD/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	0	108.9	156.6
	61	126.8	126.2
	124	91.9	83.7
	180	59.1	45.5
E₁	0	300.7	133.6
	61	96.3	119.9
	124	69.5	69.7
	180	56.4	48.1
E₂	0	252.6	305.3
	61	198.8	170.4
	124	110.3	103.2
	180	79.0	69.3

Tabla A.10. Valores de γ -caseína (IOD/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	0	3.8	5.9
	61	14.7	15.9
	124	25.6	25.4
	180	27.5	26.9
E₁	0	6.0	5.1
	61	19.6	19.1
	124	25.0	28.3
	180	30.8	28.6
E₂	0	4.2	6.2
	61	21.9	22.3
	124	29.2	24.3
	180	28.3	30.6

Tabla A.11. Valores de F3 (IOD/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Repetición 1	Repetición 2
C	0	2.1	2.4
	61	3.9	2.5
	124	6.2	5.0
	180	8.2	5.4
E₁	0	3.7	5.6
	61	4.3	3.4
	124	7.5	8.0
	180	12.6	8.3
E₂	0	3.7	3.6
	61	12.2	9.3
	124	10.0	7.5
	180	11.9	9.2

Tabla A.12. Valores de área cromatográfica ($10^6/100$ g queso) de los picos obtenidos por RP-HPLC de la FS.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	p1	p2	p3	p4	p5	p6	
C	61	1	0.58	0.96	0.97	2.10	7.71	18.13	
		2	0.67	1.14	1.42	2.70	7.74	17.77	
	124	1	1.83	1.22	2.10	3.53	14.64	32.26	
		2	1.52	1.35	1.99	3.53	13.83	31.12	
	180	1	2.34	1.77	2.55	4.75	20.27	41.90	
		2	2.35	1.60	2.52	4.67	19.99	41.08	
	E₁	61	1	1.02	0.83	1.16	2.38	10.38	24.77
			2	1.26	0.83	1.99	2.36	12.12	25.18
124		1	2.12	1.09	2.77	3.95	20.01	38.42	
		2	2.20	1.17	2.45	4.26	18.66	37.65	
180		1	2.79	1.42	3.04	4.99	23.30	47.07	
		2	2.61	1.76	2.95	5.08	22.75	45.76	
E₂		61	1	1.52	0.88	1.96	3.34	13.66	29.55
			2	1.84	0.95	2.12	4.16	15.81	33.24
	124	1	2.01	1.19	2.28	3.95	18.44	35.87	
		2	2.59	1.26	3.17	4.96	21.58	44.53	
	180	1	3.35	2.01	2.65	5.38	24.75	51.25	
		2	3.05	1.73	2.52	5.23	22.84	48.82	

Tabla A.12. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^6/100$ g queso) de los picos obtenidos por RP-HPLC de la FS.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	p7	p8	p9	p10	p11
C	61	1	5.76	2.65	1.78	2.51	7.53
		2	6.27	2.65	1.86	2.61	7.78
	124	1	10.78	2.56	1.18	3.58	9.09
		2	11.16	3.06	1.16	3.76	9.64
	180	1	15.35	2.07	0.97	4.02	9.81
		2	14.61	2.24	0.91	4.30	10.38
E₁	61	1	8.55	3.05	1.65	2.56	7.08
		2	8.71	2.72	1.64	2.97	8.62
	124	1	15.54	3.64	1.34	3.73	9.64
		2	13.79	2.90	1.34	3.98	10.33
	180	1	17.57	3.06	1.12	5.39	12.77
		2	17.68	2.73	1.11	4.99	11.85
E₂	61	1	9.76	2.72	1.55	3.56	8.44
		2	12.09	3.21	1.32	3.23	8.24
	124	1	14.49	2.55	0.94	5.02	11.58
		2	16.81	3.97	0.98	3.97	10.39
	180	1	20.18	4.12	1.06	5.38	12.49
		2	18.90	3.83	1.28	5.55	12.86

Tabla A.12. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^6/100$ g queso) de los picos obtenidos por RP-HPLC de la FS.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	p12	p13	p14	p15	p16
C	61	1	5.44	2.94	1.11	1.21	1.77
		2	5.76	3.25	1.14	1.36	1.93
	124	1	6.94	3.80	1.32	1.73	2.08
		2	7.35	3.94	1.04	1.44	1.90
	180	1	7.01	3.45	1.53	1.85	2.15
		2	7.49	3.50	1.23	1.81	2.19
E₁	61	1	6.72	3.46	1.02	1.34	1.99
		2	7.70	3.37	1.06	1.60	2.16
	124	1	8.54	3.62	1.28	2.11	2.37
		2	9.03	4.03	1.63	1.72	2.19
	180	1	10.63	4.93	1.64	2.13	2.41
		2	10.01	4.63	1.38	1.68	2.23
E₂	61	1	7.59	4.04	0.93	1.46	1.95
		2	8.19	4.85	1.08	1.70	2.24
	124	1	10.81	5.71	0.99	1.48	1.91
		2	8.43	4.76	1.62	1.71	2.39
	180	1	11.90	6.82	1.72	2.03	2.46
		2	12.18	7.05	1.23	1.95	2.26

Tabla A.13. Valores de concentración de aminoácidos libres (mg/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Rep.	Asp	Glu	Asn	Gln	Gly
C	61	1	45.5	364.6	110.8	124.2	36.1
		2	42.1	346.4	106.4	112.8	38.9
	124	1	64.8	471.4	138.2	140.1	58.3
		2	73.2	554.4	162.4	175.0	67.8
	180	1	127.3	777.1	213.9	210.0	93.2
		2	90.2	574.4	159.2	147.0	72.4
E₁	61	1	53.7	396.9	122.5	130.5	43.7
		2	49.6	379.8	120.2	126.1	40.6
	124	1	96.4	623.2	182.0	174.2	69.7
		2	93.5	600.2	174.3	165.7	73.1
	180	1	123.9	762.5	212.8	183.0	106.0
		2	116.7	712.5	199.1	185.3	88.9
E₂	61	1	68.6	536.8	157.9	153.3	68.8
		2	51.8	436.8	131.2	140.8	62.3
	124	1	67.3	551.4	157.4	160.2	83.3
		2	72.7	561.9	161.3	165.1	88.5
	180	1	157.4	1008.6	272.7	249.7	151.7
		2	144.3	918.1	243.2	204.6	134.9

Tabla A.13. (cont.). Valores de concentración de aminoácidos libres (mg/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Rep.	Ala	Tyr	Trp	Met	Val
C	61	1	78.5	49.0	16.9	40.5	137.1
		2	78.0	42.2	16.4	38.1	129.4
	124	1	91.2	48.5	36.9	58.5	177.7
		2	104.5	71.7	39.3	67.9	208.6
	180	1	133.7	93.6	48.7	94.4	292.7
		2	99.7	77.6	44.7	71.9	207.2
E₁	61	1	78.5	51.0	23.5	45.3	153.6
		2	77.0	43.8	20.5	43.8	149.0
	124	1	113.2	72.7	40.7	76.6	245.1
		2	109.0	69.7	41.3	73.8	231.6
	180	1	128.8	93.8	48.5	93.5	290.7
		2	119.0	85.7	48.3	87.3	269.8
E₂	61	1	116.7	72.3	32.7	71.4	211.5
		2	97.0	68.1	30.5	59.3	170.0
	124	1	105.5	89.6	48.9	79.1	211.6
		2	113.3	78.0	48.7	78.7	220.6
	180	1	175.8	163.1	70.4	135.0	407.2
		2	169.9	127.2	70.0	128.4	364.1

Tabla A.13. (cont.). Valores de concentración de aminoácidos libres (mg/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Rep.	Phe	Ile	Leu	Lys	Total
C	61	1	87.5	89.9	177.6	277.5	1635.4
		2	81.6	86.4	170.7	272.4	1561.7
	124	1	127.5	131.5	217.1	372.6	2134.4
		2	149.8	154.6	257.5	436.0	2522.7
	180	1	210.1	237.7	347.7	617.2	3497.4
		2	155.0	173.2	258.5	426.8	2557.8
E₁	61	1	99.5	105.9	192.5	278.2	1775.4
		2	93.7	97.6	184.0	257.0	1682.8
	124	1	165.5	181.4	284.2	434.3	2759.3
		2	157.3	166.2	269.8	415.0	2640.5
	180	1	200.8	221.1	328.2	536.7	3330.5
		2	183.5	210.5	304.4	497.3	3108.2
E₂	61	1	177.3	152.8	325.3	191.3	2336.6
		2	145.4	125.8	263.1	375.9	2157.9
	124	1	186.4	169.8	306.8	491.5	2708.7
		2	182.2	173.4	305.8	496.1	2746.5
	180	1	322.8	325.7	514.5	823.5	4778.3
		2	291.2	290.7	471.2	493.6	4051.5

Tabla A.14. Valores de concentración de ácidos grasos libres (mg/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Rep.	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0
C	61	1	4.82	1.62	2.07	5.17	7.51
		2	2.98	0.97	1.16	2.78	3.86
	124	1	4.33	1.36	1.64	3.35	4.90
		2	7.33	2.40	3.04	5.83	8.45
	180	1	7.04	2.18	2.02	5.02	6.95
		2	5.63	1.84	2.14	4.56	7.63
E₁	61	1	4.54	1.45	1.50	3.65	5.20
		2	4.45	1.39	1.67	3.13	4.65
	124	1	5.85	1.71	1.56	3.73	4.98
		2	5.20	0.99	1.32	3.08	4.87
	180	1	5.52	0.87	1.03	2.65	3.74
		2	5.80	1.47	1.22	2.90	3.95
E₂	61	1	4.82	1.32	1.38	2.94	3.87
		2	5.29	1.57	1.76	4.36	6.43
	124	1	6.47	1.90	1.78	4.42	5.73
		2	6.05	1.78	2.01	4.79	7.65
	180	1	6.98	1.92	1.73	3.92	5.61
		2	6.64	1.93	1.78	3.52	4.75

Tabla A.14. (cont.). Valores de concentración de ácidos grasos libres (mg/100 g queso).

Queso	Tiempo (días)	Rep.	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	Total	
C	61	1	23.68	34.81	10.32	27.83	117.83	
		2	12.16	22.82	5.79	19.79	72.31	
	124	1	14.99	27.64	6.47	19.61	84.29	
		2	25.17	39.01	9.48	30.79	131.50	
	180	1	21.91	35.97	8.07	26.40	115.56	
		2	24.09	32.47	8.56	27.07	113.99	
	E₁	61	1	16.70	28.26	12.39	20.09	93.78
			2	14.39	30.28	6.68	23.62	90.26
124		1	16.45	29.85	5.69	23.99	93.81	
		2	17.09	27.42	4.05	16.54	80.56	
180		1	13.10	27.31	3.02	14.47	71.71	
		2	13.07	25.84	3.44	16.56	74.25	
E₂		61	1	12.59	26.33	4.96	20.78	78.99
			2	18.27	29.96	6.70	25.30	99.64
	124	1	16.68	28.65	6.19	21.69	93.51	
		2	25.02	32.99	8.16	33.61	122.06	
	180	1	17.53	30.77	7.13	28.89	104.48	
		2	15.17	31.46	6.72	26.23	98.2	

Tabla A.15. Valores de área cromatográfica ($10^4/100$ g queso) de los picos obtenidos por GC de los compuestos volátiles.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	v1	v2	v3	v4	v5	v6
C	61	1	1.36	1.69	2.38	3.71	1.31	0.88
		2	1.90	1.54	1.55	1.47	1.61	1.33
	124	1	1.42	1.13	2.75	1.37	1.52	0.31
		2	1.68	1.23	2.47	1.25	1.68	0.61
	180	1	1.45	0.53	3.65	1.26	1.77	0.84
		2	1.85	0.84	3.88	1.28	1.36	0.89
E₁	61	1	1.22	1.20	1.49	0.81	0.81	0.32
		2	1.86	1.11	1.47	1.45	1.08	0.98
	124	1	1.82	0.75	2.81	0.67	1.06	0.40
		2	2.04	52.77	0	0.97	1.07	0.38
	180	1	0.51	111.52	0	1.00	1.12	0.36
		2	1.98	1.33	3.21	0.44	1.29	1.04
E₂	61	1	1.62	1.39	1.99	1.91	1.25	0.80
		2	1.19	1.58	1.54	0.47	0.98	0
	124	1	1.76	4.58	2.74	1.18	1.35	0.72
		2	2.27	1.65	3.79	1.04	1.25	0.70
	180	1	1.82	0.99	3.92	1.04	0.94	1.05
		2	1.43	1.25	3.43	1.29	1.56	1.10

Tabla A.15. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^4/100$ g queso) de los picos obtenidos por GC de los compuestos volátiles.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	v7	v8	v9	v10	v11	v12a+12b
C	61	1	26.41	3.29	2.67	3.49	3.00	0.66
		2	3.71	1.14	1.24	7.12	0.47	0.86
	124	1	4.14	1.90	1.58	6.51	0.79	1.02
		2	3.21	0.90	1.32	6.94	0.51	0.89
	180	1	4.09	1.61	1.48	7.10	1.20	0.76
		2	5.13	2.46	1.36	6.33	1.00	1.10
E₁	61	1	26.62	3.27	1.51	1.94	0.54	0.81
		2	24.52	2.79	2.74	2.22	1.34	0.88
	124	1	14.81	3.30	1.42	3.61	0.65	1.32
		2	14.22	3.02	1.40	3.96	0.61	1.60
	180	1	7.28	1.69	0.84	6.05	0.97	0.91
		2	14.49	3.61	1.40	4.25	0.69	1.49
E₂	61	1	5.02	1.73	1.19	5.51	1.17	1.00
		2	22.75	3.60	1.49	2.71	0.43	1.22
	124	1	4.53	2.11	1.27	6.33	0.74	1.02
		2	9.46	3.27	1.49	5.86	0.65	1.70
	180	1	9.73	2.10	0.93	5.07	0.68	1.31
		2	5.20	1.94	1.21	7.45	1.29	1.07

Tabla A.15. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^4/100$ g queso) de los picos obtenidos por GC de los compuestos volátiles.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	v13	v14a+14b	v15	v16	v17	v18
C	61	1	10.68	14.30	17.97	5.54	7.67	0.60
		2	3.83	10.88	11.06	0.93	6.34	0.84
	124	1	3.87	11.24	24.33	1.51	5.81	0.79
		2	3.71	10.18	21.47	0.70	5.03	1.10
	180	1	4.27	11.78	26.19	1.86	3.95	0.74
		2	4.78	14.24	27.96	3.21	3.66	0.63
E ₁	61	1	11.19	12.88	21.56	7.61	6.28	0.42
		2	10.68	14.70	22.86	7.36	5.53	0.58
	124	1	7.50	13.65	27.39	7.05	3.68	0.10
		2	7.80	12.91	28.44	6.68	3.12	0.20
	180	1	4.83	14.40	31.47	4.15	2.41	0.73
		2	7.09	20.22	30.84	8.34	3.72	0.75
E ₂	61	1	3.99	13.94	25.12	2.46	4.83	0.89
		2	9.73	15.91	27.90	8.07	4.27	0.25
	124	1	5.50	13.47	27.78	3.29	3.92	0.65
		2	5.86	15.05	34.06	5.07	3.03	0.52
	180	1	5.42	19.53	35.69	6.01	2.30	1.03
		2	4.60	18.52	29.62	3.09	3.17	0.81

Tabla A.15. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^4/100$ g queso) de los picos obtenidos por GC de los compuestos volátiles.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	v19	v20	v21	v22	v23	v24
C	61	1	1.33	0.91	0.72	2.23	0.74	1.15
		2	2.45	0.92	0.63	6.58	1.33	1.28
	124	1	2.31	0.27	0.69	6.76	1.20	1.42
		2	1.93	0.43	0.54	8.02	1.37	1.19
	180	1	2.81	0.30	0.57	6.27	0.96	1.28
		2	2.05	1.00	0.64	6.38	0.84	1.37
E₁	61	1	0.98	0.49	0.84	3.45	0.90	1.28
		2	1.64	0.86	0.71	3.00	0.51	1.21
	124	1	1.99	0.76	0.71	4.02	0.43	1.01
		2	6.05	0.84	0.63	4.07	0.44	1.06
	180	1	2.54	0.58	0.48	5.41	0.81	0.47
		2	2.45	0.14	0.72	5.40	0.36	1.58
E₂	61	1	2.02	0.18	0.65	6.36	0.91	1.00
		2	1.23	0.20	0.70	3.63	0.52	1.07
	124	1	2.28	0.22	0.61	7.08	0.83	1.34
		2	2.43	0.64	0.74	6.15	0.56	1.18
	180	1	2.44	0.76	0.75	6.61	0.42	1.14
		2	2.26	0.30	0.61	6.47	1.11	1.27

Tabla A.15. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^4/100$ g queso) de los picos obtenidos por GC de los compuestos volátiles.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	v25	v26	v27	v28	v29	v30
C	61	1	0.18	3.52	0	0	0.21	0
		2	1.27	2.94	3.33	3.10	7.78	2.33
	124	1	1.02	4.08	2.72	2.80	6.94	2.26
		2	1.14	3.98	4.45	4.18	11.25	3.92
	180	1	0.91	4.57	4.16	4.24	10.20	2.89
		2	0.84	4.65	2.72	2.68	6.30	1.81
E ₁	61	1	0	3.87	0	0	0	0
		2	0.23	4.84	0.10	0.05	0.21	0.08
	124	1	0.54	3.42	0.72	0.73	1.12	0.51
		2	0.43	3.39	0.74	0.72	1.13	0.32
	180	1	0.63	3.75	1.96	1.49	3.79	1.22
		2	0.40	4.66	0.93	0.98	1.82	0.73
E ₂	61	1	1.05	5.41	2.02	1.78	4.44	1.51
		2	0.29	3.38	0.06	0	0.29	0
	124	1	0.89	3.91	2.42	2.16	4.36	1.76
		2	0.92	3.46	1.42	1.04	2.65	0.55
	180	1	0.90	4.26	1.52	1.49	2.40	0.86
		2	0.88	4.04	2.68	2.64	6.43	2.02

Tabla A.15. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^4/100$ g queso) de los picos obtenidos por GC de los compuestos volátiles.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	v31	v32	v33	v34	v35	v36
C	61	1	10.50	3.68	0.32	0.70	6.03	36.98
		2	8.71	3.71	1.92	1.33	6.64	38.57
	124	1	10.84	9.72	1.75	1.06	7.19	33.18
		2	9.21	10.48	2.93	1.32	7.13	25.83
	180	1	9.05	12.40	1.78	0.62	6.22	26.37
		2	9.72	12.72	1.72	0.45	6.81	15.70
E₁	61	1	14.16	6.95	0.16	0.46	6.03	26.09
		2	13.18	7.14	0.23	0.53	5.95	27.30
	124	1	13.92	15.04	0.34	0.58	5.67	21.20
		2	12.97	12.61	0.19	0.52	5.30	20.96
	180	1	11.17	9.95	0.94	0.44	6.56	11.75
		2	17.78	12.65	0.40	0.46	5.30	20.94
E₂	61	1	14.76	10.70	1.47	0.80	6.28	27.00
		2	14.27	10.24	0.15	0.74	6.48	22.06
	124	1	15.08	11.83	1.41	0.73	6.22	20.98
		2	15.57	13.43	1.01	0.41	6.08	15.08
	180	1	14.57	12.88	0.85	0.44	5.48	13.62
		2	13.25	10.85	1.31	0.49	6.04	18.03

Tabla A.15. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^4/100$ g queso) de los picos obtenidos por GC de los compuestos volátiles.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	v37	v38	v39	v40	v41
C	61	1	9.52	2.58	0.39	49.16	1.63
		2	10.18	3.46	0.39	67.15	0.81
	124	1	13.58	6.27	0.29	64.88	3.73
		2	7.87	2.51	0.36	52.82	3.68
	180	1	9.45	2.14	0.33	64.10	0.61
		2	6.68	1.48	0.30	64.48	1.28
E₁	61	1	6.66	1.69	0.29	77.35	1.49
		2	7.45	2.68	0.32	57.61	2.02
	124	1	7.50	1.25	0.34	79.58	0.66
		2	5.99	1.63	0.24	59.08	0.31
	180	1	4.70	0	0.56	31.70	1.74
		2	6.51	1.20	0.30	41.52	0.65
E₂	61	1	10.06	2.80	0.27	81.84	0.99
		2	6.19	1.11	0.36	73.60	0
	124	1	6.73	1.56	0.29	51.11	0.56
		2	4.81	0.70	0.26	48.70	1.23
	180	1	3.43	0	0.36	38.17	2.80
		2	5.23	1.12	0.22	59.51	2.28

Tabla A.15. (cont.). Valores de área cromatográfica ($10^4/100$ g queso) de los picos obtenidos por GC de los compuestos volátiles.

Queso	Tiempo (días)	Rep.	v42	v43	v44	v45	v46
C	61	1	0.27	14.98	0.18	1.70	0.13
		2	0.25	21.83	0.16	2.68	0.22
	124	1	0.21	42.45	0.17	2.31	0.14
		2	0.15	36.14	0.17	2.82	0.20
	180	1	0.25	59.63	0.23	0.79	0.15
		2	0.21	52.07	0.13	3.27	0.20
E₁	61	1	0.22	34.72	0.15	2.95	0.11
		2	0.35	27.72	0.19	3.15	0.16
	124	1	0.28	61.15	0.15	1.21	0.24
		2	0.22	45.49	0.15	1.89	0.16
	180	1	0.26	24.79	0.15	2.77	0
		2	0.27	33.86	0.15	2.60	0.41
E₂	61	1	0.35	48.04	0.21	3.30	0.16
		2	0.28	32.27	0.15	3.13	0.17
	124	1	0.31	41.73	0.18	2.01	0
		2	0.29	26.26	0.20	1.74	0.23
	180	1	0.64	30.53	0.11	3.39	1.15
		2	0.22	50.86	0.10	3.66	0

Tabla A.16. Valores de los atributos sensoriales. Escala (1-9).

Queso	Tiempo (días)	Rep.	Aroma	Color	Aspecto de la masa	Corte Granular	Fracturabilidad
C	61	1	4.4	5.0	8.1	7.6	8.7
		2	4.3	5.2	8.1	8.0	8.6
	124	1	4.5	5.4	8.1	7.5	8.5
		2	5.8	5.7	8.0	7.7	8.8
	180	1	5.9	5.3	7.9	7.6	8.5
		2	5.2	5.5	8.1	8.0	8.7
E₁	61	1	4.3	4.6	8.1	8.1	8.9
		2	3.7	4.2	8.0	8.0	8.8
	124	1	3.7	4.3	8.0	8.2	8.8
		2	5.7	5.3	8.0	8.1	8.8
	180	1	5.9	5.3	7.9	8.3	8.8
		2	4.9	5.2	8.0	8.2	8.8
E₂	61	1	4.2	5.1	8.1	7.7	8.6
		2	4.0	5.5	8.1	7.3	8.6
	124	1	4.5	4.9	7.7	7.3	8.6
		2	5.9	4.7	8.0	7.6	8.6
	180	1	5.8	4.9	7.9	7.1	8.5
		2	5.7	5.0	8.0	7.5	8.4

Tabla A.16. (cont.). Valores de los atributos sensoriales. Escala (1-9).

Queso	Tiempo (días)	Rep.	Sensación al paladar	Flavor genuino	Flavor residual	Salado	Amargo
C	61	1	7.8	4.7	2.5	4.4	2.5
		2	7.5	4.2	2.9	4.5	2.4
	124	1	7.7	4.8	2.8	5.0	2.8
		2	7.5	5.3	3.1	4.1	2.8
	180	1	7.5	5.5	3.2	4.2	3.0
		2	7.7	4.8	3.1	4.9	2.9
E ₁	61	1	7.9	5.2	3.3	4.4	2.1
		2	7.4	6.0	3.3	4.4	3.0
	124	1	7.6	4.7	3.6	4.6	3.1
		2	7.3	6.6	3.2	4.8	2.9
	180	1	7.5	5.9	2.8	5.2	3.0
		2	7.5	5.8	2.6	5.2	2.9
E ₂	61	1	8.1	5.9	2.8	5.2	3.2
		2	7.6	5.6	2.2	5.3	2.8
	124	1	6.6	5.9	3.6	5.3	3.1
		2	7.3	6.4	2.7	5.4	3.1
	180	1	7.3	6.2	3.1	5.4	3.1
		2	7.1	5.7	2.4	5.6	3.3

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

- Andrén A. 2011. Cheese: rennets and coagulants. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 574-578.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis (15ta edición). Volumen 2. Publicado por Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, EE.UU.
- Ardö Y., Chatterton D.E.W. y Varming C. 2011. Chromatographic methods. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 169-176.
- Aston J.W., Fedrick I.A., Durward I.G. y Dulley J.R. 1983. The effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese I: higher initial storage temperatures. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 18: 143-151.
- Aston J.W., Giles J.E., Durward I.G. y Dulley J.R. 1985. Effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. Journal of Dairy Research, 52: 565-572.
- Azarnia S., Robert N. y Lee B. 2006. Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. Critical Reviews in Biotechnology, 26: 121-143.
- Bauman D.E., Tyburczy C., O'Donnell A.M. y Lock A.L. 2011. Milk lipids: conjugated linoleic acid. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 3. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 660-664.
- Belitz H.D., Grosch W. y Schieberle P. 2009. Food Chemistry (4ta edición). Editorial Springer-Verlag, Berlín, Alemania, pp. 340-402.

Referencias bibliográficas

- Bertola N.C., Bevilacqua A.E. y Zaritzky N.E. 1995. Rheological behaviour of Reggianito Argentino cheese packaged in plastic film during ripening. *LWT – Food Science and Technology*, 28 (6): 610-615.
- Bianchi F., Careri M., Mangia A. y Musci M. 2007. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: database creation and evaluation of precision and robustness. *Journal of Separation Science*, 30 (4): 563-572.
- Broadbent J.R., Budinich M.F. y Steele J.L. 2011. Non-starter lactic acid bacteria. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 639-644.
- Broome M.C, Powell I.B. y Limsowtin G.K.Y. 2011. Starter cultures: specific properties. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 559-566.
- Büchi Labortechnik AG. 1998. Nitrogen determination according to Kjeldahl, order No. 97765 (Büchi, Flawil, Suiza).
- 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. *Journal of Food Protection*, 69 (12): 2983-2991.
- CAA. 2006. Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII: alimentos lácteos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). En Internet:
http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf.

Referencias bibliográficas

- Candiotti M.C., Hynes E., 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. *International Dairy Journal*, 12: 923-931.
- Castañeda R., Borbonet S., Ibarra A., Ipar J.L., Vásquez A.M., Brito Contreras C., Purtschert N. y Alfonso R. 2010. Quesos de América del Sur. Editorial Albatros SACI, Buenos Aires, Argentina, pp. 30-43.
- Chamorro M.C. y Losada M.M. 2002. El análisis sensorial de los quesos. AMV Ediciones, Madrid, España, pp. 1-229.
- Chevalier F. 2011. Analytical methods: Electrophoresis. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 185-192.
- Cogan T.M. 2011. Microbiology of cheese. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 625-631.
- Coker C.J., Crawford R.A., Johnston K.A., Singh H. y Creamer L.K. 2005. Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data—a review. *International Dairy Journal*, 15: 631-643.
- Collins Y.F., McSweeney P.L.H. y Wilkinson M.G. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13: 841-866.

Referencias bibliográficas

- Collins Y.F., McSweeney P.L.H. y Wilkinson M.G. 2004. Lipolysis and catabolism of fatty acids in cheese. En: Cheese: chemistry, physics and microbiology (3er edición). Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 373-389.
- 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.
- Curtin Á.C. y McSweeney P.L.H. 2004. Catabolism of amino acids in cheese during ripening. En: Cheese: chemistry, physics and microbiology (3er edición). Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 435-454.
- Deeth H.C., Fitz-gerald C.H. y Snow A.J. 1983. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 18: 13-20.
- Delahunty C.M. y Drake M.A. 2004. Sensory character of cheese and its evaluation. En: Cheese: chemistry, physics and microbiology (3er edición). Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 455-487.
- Delgado F.J., González-Crespo J., Cava R. y Ramírez R. 2011. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. Food Chemistry, 129: 1156-1163.

Referencias bibliográficas

- Di Cagno R. y Gobbetti M. 2011. Hard Italian cheeses. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 728-736.
- Drake S.L., Carunchia Whetstine M.E., Drake M.A., Courtney P., Fligner K., Jenkins J. y Pruitt C. 2007. Sources of umami taste in Cheddar and Swiss cheeses. *Journal of Food Science*, 72 (6): S360-S366.
- Drake M.A. y Delahunty C.M. 2011. Sensory evaluation. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 279-283.
- El Soda M. 1993. Accelerated maturation of cheese. *International Dairy Journal*, 3: 531-544.
- El Soda M. y Awad S. 2011. Acelerated cheese ripening. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 795-798.
- Engel E., Nicklaus S., Septier C., Salles C. y Le Quéré J.L. 2001. Evolution of the taste of a bitter Camembert cheese during ripening: characterization of a matrix effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2930-2939.
- FAO. 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO statistical yearbook 2012. Part 3: trends in the livestock sector. En internet: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/fao-statistical-yearbook-2011/es/>.

Referencias bibliográficas

- Farrell H.M. 2011. Milk Proteins: casein nomenclature, structure, and association. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 3. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra., pp. 765-771.
- Fedrick I.A., Aston J.W., Durward I.F. y Dullely J.R. 1983. The effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavour development in Cheddar cheese II. High temperature storage midway through ripening. New Zealand Journal of Dairy Science and Technology, 18: 253-260.
- Ferrazza R.E., Fresno J.M., Ribeiro J.I., Tornadijo M.E. y Mansur Furtado M. 2004. Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. Food Research Internacional, 37: 149-155.
- Folkertsma B., Fox P.F. y McSweeney P.L.H. 1996. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. International Dairy Journal, 6: 1117-1134.
- Fox P.F. 2011a. Cheese: an overview. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 534-543.
- Fox P.F. 2011b. Milk: introduction. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 3. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 458-466.
- Fox P.F. 2011c. Milk: bovine milk. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 3. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 478-483.
- Fox P.F. 2011d. Lactic acid bacteria: an overview. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 401-402.
- Fox P.F. y McSweeney P.L.H. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. Food Review International, 12 (4): 457-509.

Referencias bibliográficas

- Fox P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. y McSweeney P.L.H. 2000. Biochemistry of cheese ripening. En: *Fundamentals of Cheese Science*. Editorial Aspen Publishers, Gaithersburg, EE.UU. pp. 236-281.
- Gallino R.R. 1994. Queso Reggianito Argentino: tecnología de fabricación. En: *Ciencia y tecnología de los productos lácteos*. Diagramma S.A. Santa Fe: Medios Audiovisuales y Gráficos—CERIDE, pp. 244–287.
- Gaya P., Medina M., Rodriguez-Marin M.A. y Nuñez M. 1990. Accelerated ripening of ewes' milk Manchego cheese: the effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, 73: 26-32.
- Giraffa G., Mucchetti G., Addeo F. y Neviani E. 1997. Evolution of lactic acid microflora during Grana cheese-making and ripening. *Microbiologie – Aliments – Nutrition*, 15: 115-122.
- Gobbetti M., De Angelis M., Di Cagno R. y Rizzello C.G. 2007. The relative contributions of starter cultures and non-starter bacteria to the flavour of cheese. En: *Improving the flavour of cheese*. Editorial CRC Press, Boca Raton, EE.UU., pp. 121–156.
- Guinee T.P. y Fox P.F. 2004. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. En: *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (3er edición). Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 207-259.
- Guinee T.P., Sutherland B.J. 2011. Cheese: salting of cheese. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 595-606.

Referencias bibliográficas

- Hannon J.A., Wilkinson M.G., Delahunty C.M., Wallace J.M., Morrissey P.A. y Beresford T.P. 2005. Application of descriptive sensory analysis and key chemical indices to assess the impact of elevated ripening temperatures on the acceleration of Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 15: 263-273.
- Hough G., Martinez E., Barbieri T., Contarini A. y Vega M.J. 1994. Sensory profiling during ripening of Reggiano grating cheese using both traditional ripening and in plastic wrapping. *Food Quality and Preference*, 5 (4): 271-280.
- Hynes E.R., Bergamini C.V., Suárez V.B. y Zalazar C.A. 2003. Proteolysis on Reggiano Argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 86: 3831-3840.
- Hynes E.R., Aparo L. y Candioti M.C. 2004. Influence of residual milk-clotting enzyme on α_{s1} casein hydrolysis during ripening of Reggiano Argentino cheese. *Journal of Dairy Science*, 87: 565-573.
- Hynes E.R., Zalazar C.A. y McSweeney P.L.H. 2005. Influence of defined and natural 'wild' thermophilic cultures on proteolysis in Reggiano Argentino hard cooked cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 60 (3): 55-59.
- IDF. 1969. Determination of the fat content of cheese and of processed cheese products. IDF Standard 5A. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.

Referencias bibliográficas

- IRAM. 2012. Norma IRAM 20003 (07/1995)/ISO 8589:1988. Análisis Sensorial. Guía para la instalación de locales de ensayo. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, Buenos Aires, Argentina.
- Ismail B. y Nielsen S.S. 2011. Plasmin system in milk. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 2. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 308-313.
- Kemp S.E., Hollowood T. y Hort J. 2009. Sensory evaluation. A practical handbook. Editorial Wiley-Blackwell, Chichester, Inglaterra, pp. 66-137.
- Kuchroo C.N. y Fox P.F. 1982a. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37 (6): 331-335.
- Kuchroo C.N. y Fox P.F. 1982b. Fractionation of the water-soluble-nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. *Milchwissenschaft*, 37 (11): 651-653.
- Law B.A. 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *International Dairy Journal*, 11: 383-398.
- Le Quéré J.L. 2011. Cheese flavor. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 675-684.
- Lesage L., Voilley A., Lorient D. y Bézard J. 1993. Sodium chloride and magnesium chloride affected by ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Science*, 58: 1303-1306.
- Lombardi A.M., Bevilacqua A.E. y Califano A.N. 1994. Variation in organic acids content during ripening of Reggiano cheese in air-tight sealed bags. *Food Chemistry*, 51 (2): 221-226.

Referencias bibliográficas

- Lucey J.A. 2011. Cheese: rennet-induced coagulation of milk. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 579-584.
- MAGyP. 2012a. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. En Internet:
http://64.76.123.202/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estad%C3%ADsticas/_archivos/Produccion_Mundial.pdf.
- MAGyP. 2012b. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. En Internet:
http://64.76.123.202/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estad%C3%ADsticas/_01_Nacional/serie/Prod_Mensual_2.htm.
- MAGyP. 2012c. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. En Internet:
http://64.76.123.202/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estad%C3%ADsticas/index.php.
- MAGyP. 2012d. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. En Internet:
http://64.76.123.202/site/_subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07_Estadísticas/03_Destinos/Destinos.htm.
- MAGyP. 2012e. 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_2011.pdf.

Referencias bibliográficas

- MAGyP. 2012f. 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_2012.pdf.
- Mahaut M., Jeantet R. y Brulé G. 2003. Introducción a la tecnología quesera. Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 23-31
- Marsili R. 2011. Flavors and off-flavors in dairy foods. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 2. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 533-551.
- McKenzie H.A. 1971. Milk Proteins. Chemistry and molecular biology. Volumen 2. Editorial Academic Press, New York, EE.UU.
- McSweeney P.L.H. 1997. The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: taste. International Journal of Dairy Technology, 50 (4): 123-128.
- McSweeney P.L.H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. International Journal of Dairy Technology, 57: 127-144.
- McSweeney P.L.H. 2011. Biochemistry of cheese ripening. En: Encyclopedia of Dairy Sciences. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 667-674.
- McSweeney P.L.H. y Fox P.F. 1997. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. Lait, 77: 41-76.
- McSweeney P.L.H. y Fox P.F. 2004. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. En: Cheese: chemistry, physics and microbiology (3er edición).

Referencias bibliográficas

- Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 361-371.
- McSweeney P.L.H. y Sousa M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait*, 80: 293-324.
- Ng-Kwai-Hang K.F. 2011. Milk proteins: heterogeneity, fractionation, and isolation. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 3. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 751-764.
- 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.
- OECD-FAO. 2012. Organization for Economic Co-operation and Development and Food and Agriculture Organization of the United Nations. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2012-2021*. En Internet:
http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2012-en.
- Pachlová V., Buňka F., Flasarová R., Válková P. y Buňková L. 2012. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chemistry*, 132: 1846-1854.
- Parente E., Patel H., Caldeo V., Piraino P. y McSweeney P.L.H. 2012. RP-HPLC peptide profiling of cheese extracts: a study of sources of variation, repeatability and reproducibility. *Food Chemistry*, 131: 1552-1560.
- Perotti M.C., Bernal S.M., Meinardi C.A. y Zalazar C.A. 2005. Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. *International Dairy Journal*, 15: 1150-1155.

Referencias bibliográficas

- Perotti M.C., Bernal S., Wolf V. y Zalazar C.A. 2008. Perfil de ácidos grasos libres y características sensoriales de quesos Reggianito elaborados con diferentes fermentos. *Grasas y Aceites*, 59 (2): 152-159.
- Powell I.B., Broome M.C. y Limsowtin G.K.Y. 2011. Starter cultures: general aspects. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 552-558.
- Ramo P. 2008. Determinación por RP-HPLC de aminoácidos libres presentes en productos lácteos o matrices alimenticias afines. Tesina final de grado. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Randazzo C.L., Pitino I., De Luca S., Scifò G.O. y Caggia C. 2008. Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 269-278.
- Rattray F.P. y Eppert I. 2011. Secondary cultures. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 1. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 567-573.
- Reinheimer J.A., Quiberoni A., Tailliez P., Binetti A.G. y Suárez V.B. 1996. The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina for hard cheese production. *International Dairy Journal*, 6: 869-879.
- Sihufe G.A. 2003. Efecto de la mezcla de sales (NaCl-KCl) y de la temperatura durante la etapa final de la maduración de quesos Fynbo. Tesis Doctoral.

Referencias bibliográficas

- Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Sihufe G.A., Zorrilla S.E. y Rubiolo A.C. 2003. Casein degradation of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures. *Journal of Food Science*, 68 (1): 117-123.
- 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 Research International*, 40: 1220-1226.
- Sihufe G.A., Zorrilla S.E. y Rubiolo A.C. 2010a. The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggianito Argentino cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 247-253.
- 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. *Journal of Sensory Studies*, 25: 94-107.
- 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. 2010c. Acceleration of cheese ripening at elevated temperature. An estimation of the optimal ripening time of a traditional Argentinean hard cheese. *Food Chemistry*, 119: 101-107.
- 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, EE.UU., pp. 377-386.

Referencias bibliográficas

- Simal S., Sánchez E.S., Bon J., Femenia A. y Rosselló C. 2001. Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistances to mass transfer. *Journal of Food Engineering*, 48: 269–275.
- Sousa M.J., Ardö Y. y McSweeney P.L.H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11: 327-345.
- Taylor M.W. y MacGibbon A.K.H. 2011. Milk lipids: fatty acids. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Volumen 3. Editorial Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra, pp. 655-659.
- Verdini R.A. 2002. Estudio de la variación de los parámetros químicos y físicos durante la maduración de quesos blandos conservados por congelación. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Verdini R.A., Zorrilla S.E. y Rubiolo A.C. 2002. Free amino acid profiles during ripening of Port Salut Argentino cheese after frozen storage. *Journal of Food Science*, 67 (9): 3264-3270.
- Walstra P., Wouters J.T.M. y Geurts T.J. 2006. *Dairy science and technology* (2da edición). Editorial Taylor & Francis Group, Boca Raton, EE.UU., pp. 641-676.
- Wolf I.V., Perotti M.C., Bernal S.M. y Zalazar C.A. 2010. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: characterization of Reggianito Argentino cheese. *Food Research International*, 43: 1204-1211.

Referencias bibliográficas

Yvon M. y Rijnen L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal, 11: 185-201.

Ziino M., Conduro C., Romeo V., Giuffrida D. y Verzera A. 2005. Characterization of “Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. International Dairy Journal, 15: 585-593.

Zorrilla S.E. 1993. Difusión de NaCl y KCl en quesos. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Abreviaturas

AAL: Aminoácidos libres

AGL: Ácidos grasos libres

ANOVA: Análisis de la varianza

CLA: Conjugados del ácido linoleico

CV: Coeficiente de variación

DOP: Denominación de origen protegida

FID: Detector de ionización de llama

FS: Fracción soluble en agua a pH 4.6

GC: Cromatografía gaseosa

HR: Humedad relativa

IK: Índice de Kováts

IM: Índice de maduración

IOD: Densidad óptica integrada

LAB: Bacterias ácido lácticas

LD: Límite de detección

LPL: Lipoproteinlipasa

LQ: Límite de cuantificación

LSD: Análisis de la mínima diferencia significativa

NS: Nitrógeno presente en la fracción soluble en agua a pH 4.6

NSLAB: Bacterias ácido lácticas no pertenecientes al fermento primario

NT: Nitrógeno total

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PCA: Análisis de componentes principales

PTA: Ácido fosfotúngstico

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

SD: Desviación estándar

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SLAB: Bacterias ácido lácticas pertenecientes al fermento primario

SPME: Microextracción en fase sólida

SSA: Ácido 5-sulfosalicílico

TCA: Ácido tricloroacético

TEMED: Tetrametiletilendiamina

UFC: Unidades formadoras de colonias