

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**TECNOLOGÍAS DE MEMBRANA Y  
FERMENTOS ADJUNTOS PARA MEJORAR  
LA CALIDAD DE QUESOS ARGENTINOS**

Lic. Paula Giménez

Directora de Tesis: Dra. Carina V. Bergamini

Co-directora de Tesis: Dra. Erica R. Hynes

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET)

**- 2023 -**



## Agradecimientos

---

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por brindarme la oportunidad de realizar la presente tesis a través de su programa de becas internas doctorales.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por el financiamiento de los proyectos que permitieron desarrollar este trabajo.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por la posibilidad de realizar mi estudios de doctorado.

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

A mi directora, Dra. Carina Bergamini, por sus enseñanzas, su continua orientación que contribuyó a mi formación profesional, por su paciencia y apoyo, por darme lugar a proponer ideas y escuchar mis opiniones. A mi codirectora, Dra. Erica Hynes, por el asesoramiento brindado durante mi trabajo y la lectura minuciosa del manuscrito.

A la Dra. María Cristina Perotti, por su constante predisposición, por compartir sus saberes, por sus consejos y ayuda a lo largo de mi doctorado.

Al Dr. Guillermo Peralta por su gran colaboración en las distintas etapas de esta tesis, fundamentalmente por brindarme su experiencia, por su acompañamiento y escucha a lo largo de estos años.

Al Ing. Guillermo George, por su colaboración en las elaboraciones de queso a escala laboratorio y piloto, por su compromiso y los buenos momentos compartidos.

A la Dra. Verónica Wolf por su ayuda en la determinación de compuestos volátiles, pero principalmente por incentivar a explorar ámbitos más allá del doctorado.

A Leila, Soledad y Desire, personales de apoyo, que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme cuando lo necesitaba.

A María Laura Spotti y Juan Pablo Quintero, estudiantes de doctorado, que estuvieron dispuestos a ayudarme con los análisis de textura de los quesos elaborados en este trabajo.

A la empresa Milkaut S. A., por la donación de la leche indispensable para el desarrollo de esta tesis y Cassini y Cesaratto S.A. por su colaboración en la maduración de los quesos tipo Suizo durante el período de cámara caliente.

A ALECOL, especialmente a Carolina y Martín, quienes amablemente han realizado el análisis de la leche y el suero mediante Milkoscan.

Al Dr. Germán Tirao, investigador del Instituto de Física Enrique Gaviola de Córdoba, por la capacitación sobre Tomografía Computada de Rayos X que fue tan importante para el desarrollo de esta tesis.

A José Luis Sañudo, director del Diagnóstico por Imágenes y a la Lic. María Paula Leturia quienes desinteresadamente colaboraron en la obtención de las tomografías.

A mis profesores de las materias del doctorado que han compartido su expertiz y contribuyeron a mi formación profesional.

Al equipo de trabajo del INLAIN por el compañerismo y el tiempo compartido, especialmente a mis compañeros de salita y laboratorio, por trabajar a la par, por sus ideas y opiniones, por escucharme tantas veces.

A todas aquellas personas que me crucé a lo largo de estos años y compartí cálidos momentos, especialmente a Maia por su amistad incondicional.

A toda mi familia, quienes me acompañaron y apoyaron siempre.

## Aportes Científico-Tecnológicos

---

## Publicaciones en revistas internacionales

---

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Con referato:

- Giménez, P., Peralta, G. H., Guglielmotti, D., Audero, G., Paez, R., Hynes, E. R., & Bergamini, C. V. (2021). Preventing undesired eye formation in soft cheese. *International Dairy Journal*, 116, 104958. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104958>.
- Giménez, P., Peralta, G. H., Batistela, M. E., George, G., Ale, E. C., Quintero, J. P., Hynes, E. R. & Bergamini, C. V. (2023). Impact of the use of skim milk powder and adjunct cultures on the composition, yield, proteolysis, texture and melting properties of Cremoso cheese. *International Dairy Journal*, 105595. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105595>.
- Giménez, P., Peralta, G. H., Batistela, M. E., Cuffia, F., Ale, E. C., Wolf, I. V., Perotti, M.C., Hynes, E.R. & Bergamini, C. V. (2023). Impact of the use of skim milk powder and adjunct cultures on the levels of organic acid and carbohydrates, volatile compounds and sensory properties of Cremoso cheese. *International Dairy Journal*, 105594. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105594>.
- Giménez, P., Bergamini, C. V., Peralta, G. H., George, G. A., Perotti, M. C., & Hynes, E. R. (2023) Testing a cost-affordable microfiltration method to prevent eye formation in cheeses. *Journal of Food Process Engineering*, 14280. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14280>.

Sin referato:

- Giménez, P., Perotti, M.C., Leturia, M.P., George, G. A., Peralta, G. H., Hynes, E. R., & Bergamini, C. V. (2019). Tomografía computada de rayos x para la evaluación de aberturas y de ojos en quesos, *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 105, 48-54, ISSN: 0328-4158.
- Giménez, P. (2021). Usan Tomografía Computada para "espíar" el interior de los quesos, *El Paraninfo*, 163, 7, ISSN: 1850-3179

## Capítulos de libro

---

En la redacción de los siguientes capítulos de libro se incluyeron parte de los resultados de la presente tesis:

- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., Wolf, I. V., Candiotti, M. C., Audero, G. M., Paez, R. B., Giménez, P., Perotti, M.C., & Hynes, E. R. (2021). Cultivos adjuntos de quesería a partir de cepas de origen NSLAB. En: J. Reinheimer (Ed.), *Avances y tendencias en la industria láctea La contribución argentina desde el Instituto de Lactología Industrial* (pp-135-148). Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.
- Bergamini, C., Giménez, P., Meinardi, C., Wolf, V., George, G., Zacarías M.F., Briggiler Marcó, M., Peralta, G., Perotti, M.C., & Hynes, E. (2022). Los quesos argentinos de mayor difusión. Pasta semidura. En: J. Reinheimer, C. Meinardi, E. Hynes, M. C. Perotti, & V. B. Suárez (Eds.), *Los quesos argentinos. Producción, características y nuevas propuestas* (pp. 68-96). Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.

- Meinardi, C., Vénica, C., Giménez, P., Mercanti, D., Vélez, A., George, G., Perotti M.C., Bergamini, C. (2022). Leche destinada a quesería. En: J. Reinheimer, C. Meinardi, E. Hynes, M. C. Perotti, & V. B. Suárez (Eds.), *Los quesos argentinos. Producción, características y nuevas propuestas* (pp. 27-67). Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.



## Índice

---

# Índice

<b>Abreviaturas y símbolos</b> .....	<b>12</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>17</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>21</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>25</b>
1. Producción de quesos: contexto mundial y regional .....	26
2. Queso Cremoso.....	27
2.1. Definición y características .....	27
2.2. Materia prima e insumos .....	27
2.3. Elaboración .....	29
2.4. Eventos durante la maduración .....	31
2.5. Defectos comunes en quesos.....	36
2.6. Fermentos adjuntos para mejorar la calidad de quesos .....	38
3. Uso de tecnologías de membrana en quesería .....	40
3.1. Microfiltración .....	43
3.2. Ultrafiltración.....	44
4. Leche de elaboración: composición, propiedades de coagulación y rendimiento quesero ..	46
4.1. Composición de la leche. Micelas de caseína .....	46
4.2. Coagulación de la leche.....	47
4.3. Factores que afectan los parámetros de coagulación de la leche .....	48
4.4. Rendimiento quesero.....	52
<b>Objetivos</b> .....	<b>55</b>
Objetivo general.....	56
Objetivos específicos .....	56
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>57</b>
1. Introducción .....	58
1.1. Evaluación de la formación de ojos por un método no destructivo .....	58
1.2. Factores que influyen en la formación de ojos y su control: núcleos capilares y microfiltración de la leche. ....	59
2. Objetivos .....	61
3. Materiales y Métodos .....	61
3.1. Puesta a punto del protocolo de elaboración y de la metodología de análisis de ojos de queso tipo suizo.....	61
3.2. Elaboración de quesos tipo suizo.....	62
3.3. Evaluación de la microfiltración de la leche de quesería para prevenir la formación de ojos en quesos .....	63

3.4.	Elaboración de quesos con leche microfiltrada con y sin agregado de material microparticulado .....	64
3.5.	Determinaciones analíticas .....	65
3.6.	Análisis estadístico .....	69
4.	Resultados y discusión.....	69
4.1.	Puesta a punto del protocolo de elaboración y de la metodología de análisis de ojos de queso tipo suizo.....	69
4.2.	Evaluación de la microfiltración de la leche de quesería para prevenir la formación de ojos en quesos .....	73
5.	Conclusiones .....	78
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>80</b>	
1.	Introducción .....	81
2.	Objetivos .....	83
3.	Materiales y métodos.....	83
3.1.	Evaluación de la habilidad de un fermento adjunto para inhibir la formación indeseable de ojos en quesos.....	83
3.2.	Influencia de lactobacilos mesófilos autóctonos en el perfil de maduración de quesos semiduros .....	86
3.3.	Determinaciones analíticas .....	89
4.	Resultados y discusión.....	92
4.1.	Evaluación de la habilidad de un fermento adjunto para inhibir la formación indeseable de ojos en quesos.....	92
4.2.	Influencia de lactobacilos mesófilos autóctonos en el perfil de maduración de quesos semiduros .....	105
5.	Conclusiones .....	127
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>129</b>	
1.	Introducción .....	130
2.	Objetivos .....	131
3.	Materiales y Métodos .....	131
3.1.	Influencia del uso de leche ultrafiltrada. ....	132
3.2.	Influencia del agregado de leche en polvo descremada (LPD). ....	135
3.3.	Influencia del agregado de Proteínas de Suero Microparticuladas (PSM). ....	136
3.4.	Determinaciones analíticas .....	138
3.5.	Análisis estadístico .....	143
4.	Resultados y discusión.....	143
4.1.	Puesta en marcha y optimización del equipo de membrana .....	143
4.2.	Influencia del enfriamiento de la leche pasteurizada en las propiedades de coagulación. ....	144

4.3.	Influencia del uso de leche ultrafiltrada en las propiedades de coagulación y en el rendimiento quesero. ....	145
4.4.	Influencia del agregado de leche en polvo descremada en las propiedades de coagulación de la leche y en el rendimiento quesero. ....	155
4.5.	Influencia del agregado de Proteínas de Suero Microparticuladas (PSM) en las propiedades de coagulación de la leche y en el rendimiento quesero. ....	163
5.	Conclusiones .....	172
<b>Capítulo 4.....</b>		<b>173</b>
1.	Introducción .....	174
2.	Objetivo .....	175
3.	Materiales y Métodos .....	175
3.1.	Influencia del uso de leche ultrafiltrada en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso. ....	175
3.2.	Influencia del agregado de LPD en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso. ....	177
3.3.	Influencia del agregado de PSM en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso. ....	179
3.4.	Determinaciones analíticas .....	180
4.	Resultados y discusión.....	183
4.1.	Influencia del uso de leche ultrafiltrada en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso. ....	183
4.2.	Influencia del agregado de LPD en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso. ....	197
4.3.	Influencia del agregado de PSM en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso. ....	206
5.	Conclusiones .....	218
<b>Capítulo 5.....</b>		<b>219</b>
1.	Introducción .....	220
2.	Objetivos .....	222
3.	Materiales y métodos.....	222
3.1.	Cultivos primarios y adjuntos .....	222
3.2.	Elaboraciones de quesos .....	222
3.3.	Determinaciones analíticas .....	224
3.4.	Análisis sensorial basado en consumidores .....	225
3.5.	Análisis estadístico .....	226
4.	Resultados y discusión.....	227
4.1.	Rendimiento, composición global, pH y recuentos microbiológicos .....	227
4.2.	Proteólisis .....	232
4.3.	Capacidad de fusión y textura de los quesos. ....	240

4.4. Ácidos orgánicos y carbohidratos.....	243
4.5. Compuestos volátiles .....	248
4.6. Análisis sensorial basado en consumidores .....	253
5. Conclusiones .....	261
<b>Conclusiones.....</b>	<b>262</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>265</b>

## Abreviaturas y símbolos

---

~: aproximadamente

Ø: diámetro

µm: micrómetro

**3D:** Tres dimensiones

**AA:** Aminoácidos

**AB:** Aminas Biógenas

**ACoP:** Análisis de Coordenadas Principales

**ACP:** Análisis por Componentes Principales

**AGL:** Ácidos Grasos Libres

**ANOVA:** Análisis de la Varianza; acrónimo del inglés: *Analysis of Variance*

**APC-leche:** Agar para recuento en placa con 10% de leche descremada; acrónimo del inglés: *agar plate count*

**ABRV:** Agar Bilis Rojo Violeta

**BAL:** Bacterias Ácido Lácticas

**CAA:** Código Alimentario Argentino

**CATA:** Marque todo lo que corresponda; acrónimo del inglés: *Check all that apply*

**CMP:** Caseinomacropéptido

**CP:** Componentes principales

**Da:** Dalton

**d:** día/s

**DVB/Car/PDMS:** Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano

**E-V:** Elliker-Vancomicina

**F:** Firmeza de la cuajada

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; acrónimo del inglés: *Food and Agriculture Organization*

**FCV:** Factor de Concentración Volumétrica

**FID:** Detector de Ionización de Llama; acrónimo del inglés: *Flame Ionization Detector*

**GC:** Cromatógrafo Gaseoso/Cromatografía Gaseosa

**GDH:** Actividad Glutamato Dehidrogenasa

**h:** hora/s

**HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución; acrónimo del inglés: *High Performance Liquid Chromatography*

**IDF:** Federación Internacional de Lechería; acrónimo del inglés: *International Dairy Federation*

**IMAO:** Inhibidores de la Monoaminoxidasa

**IMCU:** Unidades Coagulantes de Leche; acrónimo del inglés: *International Milk Clotting Unit*

**INLAIN:** Instituto de Lactología Industrial

**IR:** Infrarrojo

**IREI:** Índice de Recuperación Elástica Instantánea

**IRER:** Índice de Recuperación Elástica Retardada

**ISO:** Organización Internacional de Normalización; acrónimo del inglés: *International Organization for Standardization*

**LPD:** Leche en Polvo Descremada

**M:** Molar

**MAGyP:** Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca

**MF:** Microfiltración

**MG:** Materia Grasa

**min:** minutos

**MRSa:** MRS acidificado a pH 5,4

**MRS-V:** MRS-Vancomicina

**MS:** Espectrómetro de Masas/Espectrometría de Masas

**nd:** no detectado

**NF:** Nanofiltración

**NP:** Nivel Proteico

**NPN:** Nitrógeno No Proteico; acrónimo del inglés: *Non Protein Nitrogen*

**NS:** No Significativo

**NSLAB:** Bacterias Lácticas no pertenecientes al fermento; acrónimo del inglés: *Non Starter Lactic Acid Bacteria*



**NS-pH 4,6:** Nitrógeno Soluble a pH 4,6

**NS-PTA:** Nitrógeno Soluble en ácido fosfotúngstico

**NS-TCA:** Nitrógeno Soluble en ácido tricloroacético

**NT:** Nitrógeno Total

**OI:** Ósmosis Inversa

**ppm:** partes por millón

**PSM:** Proteínas de Suero Microparticulada

**RP-HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa; acrónimo del inglés: *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*

**SEM:** Microscopía Electrónica de barrido; acrónimo del inglés: *Scanning Electron Microscopes*

***S. thermophilus:*** *Streptococcus thermophilus*

**TAG:** Triacilgliceroles

**SPME:** Microextracción en fase sólida; acrónimo del inglés: *Solid Phase Microextraction*

**Tc:** Tiempo de coagulación

**Tcorte:** Tiempo de corte

**TC:** Tomografía Computada

**TFA:** Trifluoroacético

**TPA:** Análisis de Perfil de Textura; acrónimo del inglés: *Texture Profile Analysis*

**UF:** Ultrafiltración

**UFC:** Unidad Formadora de Colonias

**UV-Vis:** Ultravioleta-Visible

**V:** Volt

**W:** Watt

Nomenclatura de las cepas utilizadas

**D11:** *Leuconostoc mesenteroides* D11

**Lf2:** *Limosilactobacillus fermentum* Lf2

**Lpl29:** *Lactiplantibacillus plantarum* 29

- Lpl33:** *Lactiplantibacillus plantarum* 33
- Lpl87:** *Lactiplantibacillus plantarum* 87
- Lpl89:** *Lactiplantibacillus plantarum* 89
- Lpl91:** *Lactiplantibacillus plantarum* 90
- Lp90:** *Lacticaseibacillus paracasei* 90
- Lc72:** *Lacticaseibacillus casei* 72
- Lc81:** *Lacticaseibacillus casei* 81
- Lr73:** *Lacticaseibacillus rhamnosus* 73
- Lr77:** *Lacticaseibacillus rhamnosus* 77
- Lr78:** *Lacticaseibacillus rhamnosus* 78
- MB2:** *Leuconostoc pseudomesenteroides* MB2

## Resumen

---

Argentina figura entre los principales países productores de quesos y también se caracteriza por un elevado consumo interno. La mayoría de las industrias queseras de nuestro país son pequeñas y medianas; su crecimiento dependerá en gran medida de su capacidad para mejorar la calidad de los productos, y de la aplicación de estrategias que le permitan incrementar el rendimiento de la producción. Uno de los defectos más frecuentes en quesos blandos es la formación indeseable de aberturas y ojos. Este defecto se atribuye a causas microbiológicas, por acción de microorganismos adventicios que forman CO<sub>2</sub> mediante diferentes vías metabólicas; sin embargo, también está relacionado con la presencia de micropartículas de estructura capilar, que actúan como núcleos de ojos, y por lo tanto son necesarias para la formación de los mismos. Hay tecnologías de membrana que, además de ser usadas para sanear la leche, también se han aplicado para eliminar las micropartículas que podrían actuar como núcleos capilares y generar defectos gasógenos. Sin embargo, estas tecnologías no son aplicables por su gran costo a las pequeñas y medianas industrias de nuestro país. Es por ello que deben adaptarse otras tecnologías o estrategias con el objetivo de evitar la formación indeseable de ojos en quesos. Una de estas estrategias es el uso de cultivos adjuntos que permitan contrarrestar la actividad metabólica indeseable de microorganismos adventicios gasógenos y de esta manera evitar la aparición de defectos. Muchas bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (NSLAB) aisladas de quesos de buena calidad presentan características valiables para su uso como fermentos adjuntos con el objetivo de desarrollar un perfil de sabor característico y mejorar la calidad de los quesos. Por otro lado, también existen diversas estrategias para estandarizar el nivel de proteínas y/o aumentar el rendimiento quesero como la utilización de tecnologías de membrana (microfiltración y ultrafiltración) o agregado de polvos lácteos (leche en polvo descremada, concentrado de proteínas de leche, proteínas de suero microparticulada, caseinato de calcio) a la leche de elaboración. Sin embargo estas tecnologías innovadoras pueden tener un impacto negativo al introducir cambios tanto en la cantidad de sustratos fermentables disponibles para la microbiota del queso, como en la maduración, principalmente en la proteólisis, lo que podría causar defectos.

En una primera etapa de la tesis, se evaluó la eficiencia de un método económico, la microfiltración a través de un filtro bolsa con un tamaño de poro de 1 µm, como estrategia para eliminar las micropartículas de la leche destinada a quesería y así prevenir la formación de ojos indeseables. A su vez se implementó la tomografía computada como metodología no destructiva para el análisis de ojos y aberturas en quesos. Se estableció un protocolo de elaboración de quesos tipo suizo y se determinaron los parámetros para realizar la tomografía computada en quesos y poder cuantificar el volumen de los ojos. Se realizaron elaboraciones de quesos con leche microfiltrada mediante filtro bolsa de 1 µm con y sin adición de micropartículas de alfalfa, las cuales se agregaron para que actúen como núcleos capilares y promuevan la formación de ojos en los quesos. Se encontró que, a pesar de la microfiltración de la leche, los quesos con y sin adición

de micropartículas capilares desarrollaron un número considerable de ojos, aunque el volumen de los mismos fue mayor en los primeros. Por lo tanto, la microfiltración con el filtro bolsa no fue eficiente para evitar la formación de ojos, probablemente porque no eliminó todos los núcleos nativos, y por lo tanto no es adecuada para solucionar el problema planteado.

En este trabajo de tesis también se caracterizaron cepas autóctonas de NSLAB en cuanto a su habilidad para mejorar la calidad de los quesos o para inhibir la aparición de defectos gasógenos; las cepas ensayadas fueron aisladas en trabajos previos y se encuentran almacenadas en el cepario del INLAIN. En primer lugar se estudió la capacidad del cultivo adjunto *Lacticaseibacillus paracasei* 90 para prevenir la formación de ojos no deseados en quesos Cremosos, el cual fue elaborado con leche adicionada de una cepa gasógena alterante (*Leuconostoc mesenteroides* D11) para simular una contaminación elevada; los quesos fueron madurados en condiciones normales o con interrupciones en la cadena de frío. Se verificó que fue necesaria la presencia conjunta de altos niveles de una cepa productora de CO<sub>2</sub> e interrupciones de la cadena de frío para que ocurra el defecto de formación de ojos no deseados. Se demostró que el cultivo adjunto adicionado disminuyó la actividad metabólica de D11 y evitó la producción del defecto de ojos en los quesos Cremoso. De todas maneras, mantener la cadena de frío es crucial y puede ser suficiente para garantizar quesos de buena calidad, incluso si la contaminación con NSLAB es significativa. Además, se evaluó la influencia de 11 cepas autóctonas de lactobacilos mesófilos (origen NSLAB) en la maduración de quesos semiduros miniatura. Las cepas estudiadas fueron: *Lactiplantibacillus plantarum* 29, 33, 87, 89 y 91, *Lacticaseibacillus rhamnosus* 73, 77 y 78, *Lacticaseibacillus casei* 72 y 81 y *Lacticaseibacillus paracasei* 90, las cuales demostraron algunas propiedades tecnológicas adecuadas para ser utilizadas como cultivos adjuntos en quesería. En particular, se distinguieron tres grupos de cepas; un grupo se caracterizó por el consumo de ácido cítrico y la producción de varios compuestos volátiles de interés, otro grupo por su acidificación y actividad peptidolítica, mientras que dos cepas no tuvieron influencia en la maduración del queso. El uso combinado de cepas con diferentes propiedades como fermentos adjuntos probablemente permita mejorar y diversificar más el flavour de los quesos.

En una tercera etapa se evaluó el uso de leches concentradas mediante tecnologías de membrana de ultrafiltración y por el agregado de polvos lácteos (leche en polvo descremada y proteínas de suero microparticuladas) para la elaboración de queso Cremoso. Se verificó que el tiempo de coagulación, tiempo de corte y firmeza de la cuajada de estas leches fueron afectados por el nivel proteico de las leches, la adición de calcio y el nivel de coagulante. Además, el nivel de materia grasa también tuvo un impacto en los parámetros de coagulación. En experiencias *in vitro* y en las elaboraciones de quesos a escala laboratorio se determinó que el rendimiento se incrementó significativamente por el uso de leches concentradas, lo que permitiría aumentar la capacidad de la planta quesera. Los resultados obtenidos en cuanto a los parámetros de

coagulación permitieron establecer modificaciones y adaptar los protocolos de elaboración de quesos con leche concentrada para obtener quesos similares a los tradicionales. Se evaluó asimismo el impacto del uso de leche concentrada por ultrafiltración y mediante el agregado de polvos lácteos en la elaboración, perfiles de maduración, textura y fusión de queso Cremoso miniatura. Se encontraron diferencias mínimas en la proteólisis y la textura y fusión que se modificaron dependiendo de las condiciones de elaboración y del método de concentración de la leche.

Por último, una vez estandarizado en la etapa anterior el protocolo de elaboración de quesos Cremoso con adición de leche en polvo descremada a escala miniatura, se seleccionaron dos cepas NSLAB previamente estudiadas: *Lactocaseibacillus paracasei* 90 y *Lactobacillus rhamnosus* 73. Se evaluó su influencia sobre el rendimiento, la textura y fusión del queso, como también sobre el perfil de maduración, compuestos volátiles y características sensoriales de quesos Cremoso a escala piloto. La incorporación de leche en polvo descremada aumentó el rendimiento del queso, produjo un ligero cambio en la textura y en los perfiles peptídicos del queso e incrementó los niveles de proteínas de suero. La adición de cultivos adjuntos aumentó algunos compuestos con propiedades conservantes y aromáticas. Todos los quesos tuvieron una aceptabilidad alta por parte de los consumidores. Ambas estrategias permitieron obtener quesos de buena calidad que presentaron algunos cambios químicos en comparación con el queso tradicional.

Los resultados del presente trabajo de tesis demuestran el potencial de las estrategias de enriquecimiento proteico de la leche y del uso de fermentos adjuntos para mejorar la calidad de quesos argentinos.

## Abstract

---

Argentina is among the main cheese producing countries and is also characterized by high domestic consumption. Most of the cheese factories in our country are small and middle sizes; its growth will depend to a large extent on its ability to improve the quality of its products, and on the application of strategies that allow it to increase the yield of the production. One of the most frequent defects in soft cheeses is the formation of unwanted openings (eyes). This defect is attributed to microbiological causes, due to the action of adventitious microorganisms that produce CO<sub>2</sub> through different metabolic pathways; however, it is also related to the presence of microparticles with capillary structure, which act as eye nuclei, and are therefore necessary for eye formation. There are membrane technologies that, in addition to being used to sanitize milk, have also been applied to delete microparticles that can act as “capillary nuclei” and therefore generate undesirable eye formation. However, these technologies are not applicable due to their high cost to small and middle sizes factories in our country. It is because of that other technologies or strategies must be adapted in order to avoid the undesirable eye formation in cheeses. One of these strategies is the use of adjunct cultures that counteract the undesirable metabolic activity of adventitious microorganisms and thus avoid the appearance of defects. Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from good quality cheeses have valuable characteristics for use as adjunct cultures to develop a characteristic flavor profile and improve cheese quality. On the other hand, there are also various strategies to standardize the protein level and/or increase cheese yield, such as the use of membrane technologies (microfiltration and ultrafiltration) or the addition of dairy powders (skimmed milk powder, milk protein concentrate, microparticulate whey proteins, calcium caseinate) to the cheese milk. However, these innovative technologies can have a negative impact by introducing changes both in the amount of fermentable substrates available for the cheese microbiota, and in ripening, mainly in proteolysis, which could cause defects.

In the first stage of the present thesis, the efficiency of an economical method was evaluated, microfiltration through a bag filter with a pore size of 1 µm, as a strategy to delete microparticles from cheese milk and thus prevent the undesirable eye formation. At the same time, computed tomography was implemented as a non-destructive methodology for the analysis of eyes and openings in cheeses. A Swiss-type cheese making protocol was established and the parameters to perform computed tomography in cheeses and to be able to quantify the volume of the eyes were determined. Cheeses were made with microfiltered milk (using a 1 µm bag filter) with and without the addition of alfalfa microparticles, which were added to act as capillary nuclei and promote the eyes formation in the cheeses. It was found that, despite the milk microfiltration, the cheeses with and without the addition of microparticles developed a considerable number of eyes, although their volume was greater in cheese with microparticles. Therefore, the microfiltration with the bag filter was not efficient to avoid the eyes formation, probably because it did not eliminate all the nuclei naturally occurring in milk, and therefore it is not adequate to solve the problem posed.



This thesis also dealt with the characterization of native NSLAB strains in terms of their ability to improve the quality of cheeses or to inhibit the undesirable eyes formation. Tested strains were isolated in previous works and are stored in the INLAIN strain collection. In the first place, the ability of the adjunct culture *Lacticaseibacillus paracasei* 90 to prevent the formation of unwanted eyes in Cremoso cheeses was studied; the cheese milk was added with a gasogenic strain (*Leuconostoc mesenteroides* D11) to simulate high microbial adventitious contamination. The cheeses were ripened under normal conditions or with interruptions in the cold chain. It was verified that the joint presence of high levels of a CO<sub>2</sub>-producing strain and interruptions in the cold chain were necessary for the occurrence of the unwanted eye formation defect. It was shown that the added adjunct culture decreased the metabolic activity of D11 and prevented the undesirable eye formation in Cremoso cheeses. However, maintaining the cold chain is crucial and it may be enough to guarantee good quality cheeses, even if NSLAB contamination is significant. In addition, the influence of 11 autochthonous strains of mesophilic lactobacilli (NSLAB origin) on the ripening of semi-hard miniature cheeses was evaluated. The strains studied were: *Lactiplantibacillus plantarum* 29, 33, 87, 89 and 91, *Lacticaseibacillus rhamnosus* 73, 77 and 78, *Lacticaseibacillus casei* 72 and 81 and *Lacticaseibacillus paracasei* 90, which demonstrated some adequate technological properties to be used as adjunct cultures in cheese making. In particular, the strains were differentiated in three groups; one group was characterized by the consumption of citric acid and the production of several interesting volatile compounds, another group by its acidification and peptidolytic activity, while two strains had no influence on cheese ripening. The combined use of strains with different properties as adjunct cultures probably allows further improvement and diversification of the flavour of the cheeses.

In a third stage, the use of concentrated milk by means of ultrafiltration membrane technologies and by the addition of dairy powders (skimmed milk powder and microparticulated whey proteins) was evaluated for the production of Cremoso cheese. It was verified that the coagulation time, cutting time and curd firmness of these milks were affected by the protein content of the milk, the addition of calcium and the level of rennet. In addition, the level of the fat milk also had an impact on the coagulation parameters. In *in vitro* experiments and in laboratory-scale cheese making, it was determined that the yield was significantly increased by the use of concentrated milk, which would allow increasing the capacity of the cheese plant. The results obtained in terms of coagulation parameters made it possible to establish modifications and adapt the production protocols for cheeses with concentrated milk to obtain cheeses similar to traditional ones. The impact of the use of concentrated milk by ultrafiltration and by adding milk powders in the cheesemaking, ripening profiles, texture and melting properties of miniature Cremoso cheese was also evaluated. Minimal differences were found in proteolysis and in the

texture and melting depending on the method and level of milk concentration, and on the rennet dose when ultrafiltrate milk was used.

Finally, once the protocol for Cremoso cheese making with the addition of skimmed milk powder was standardized in the previous stage on a miniature scale, two previously studied NSLAB strains were selected: *Lactocaseibacillus paracasei* 90 and *Lactobacillus rhamnosus* 73 for their incorporation as adjunct culture in these cheeses at pilot scale. Their influence on the yield, texture and melting properties of the cheese, as well as on the ripening profile, volatile compounds and sensory characteristics of Cremoso cheeses were evaluated. The addition of skimmed milk powder increased the cheese yield, produced a slight change in the cheese texture and peptide profiles, and increased the whey protein levels. The adjunct cultures increased some compounds with preservative and aromatic properties. Both strategies made it possible to obtain good quality cheeses that presented slight differences in comparison with the traditional cheese and a high consumer acceptability.

The results of this thesis demonstrate the potential of the milk protein enrichment strategies and the use of adjunct cultures to improve the quality of Argentine cheeses.

## Introducción

---

## 1. Producción de quesos: contexto mundial y regional

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, conocida como FAO, en el año 2018, del total de la producción lechera en el mundo, el 25 % (que en valores nominales representaban unos 210 millones de toneladas) se destinó a la elaboración de quesos ([www.fao.org/faostat](http://www.fao.org/faostat); OECD/FAO, 2020). En el año 2020, la expansión del comercio internacional de quesos experimentó un significativo aumento alcanzando las 28 millones de toneladas, fruto de la continua y sólida demanda de importación de varios países, especialmente la Federación Rusa, Irak, China y la República de Corea (FAO, 2021). Argentina es uno de los países líderes en la producción de queso, ocupando el 9º lugar en el ranking mundial y el 2º lugar en América Latina después de Brasil (FAO, 2022).

Por otra parte, según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de nuestro país (MAGyP), Argentina tiene un fuerte mercado interno y potencial para la exportación (MAGyP, 2019). De las 685 plantas industriales solo el 3% son grandes industrias (> 250000 L/día, procesan el 60,7 % del total de leche). Las medianas (5000-250000 L/día, procesan el 37 % del total de leche) representan el 45 %, mientras que las pequeñas (< 5000 L/día, procesan el 2,3 % del total de leche) el 46 %. Dentro del grupo de las pequeñas industrias el 38% se refiere a micro pymes que procesan menos de 1000 litros de leche por día. Las industrias que no procesan leche cruda son las mantequeras y las elaboradoras de suero (MAGyP, 2019). Hay que destacar que las industrias lácteas están concentradas en 6 provincias del centro geográfico de nuestro país: Buenos Aires (44 %), Santa Fe (28 %), Córdoba (15 %), Entre Ríos (9 %), La Pampa (3 %) y Santiago del Estero (1 %). Del total de leche producida, el 56 % es destinado a la elaboración de quesos, siendo los de mediana y alta humedad los que más se producen (MAGyP, 2019). El consumo de queso en el mercado doméstico siempre fue importante en nuestro país y aumentó de 8,3 a 11,9 kg/habitante desde el 2003 a 2016, valores que son comparables con países de gran tradición quesera como Francia, Italia, España, Australia, Canadá, y Estados Unidos ([www.ocla.org.ar](http://www.ocla.org.ar)).

Si bien los quesos argentinos tomaron como modelo a muchos quesos europeos por la influencia inmigratoria, presentan diferencias importantes con aquellos, debido a las particularidades de la materia prima (leche cruda) y a los recursos tecnológicos utilizados, lo que llevó a que los mismos tomaran características propias y se volvieran apreciablemente diferentes a sus antecedentes europeos.

Los datos mencionados revelan una demanda creciente de quesos en nuestro país en contraste con un desigual desarrollo de las empresas. Por este motivo consideramos que resulta necesario brindar a las pequeñas y medianas industrias de la región estrategias y tecnologías innovadoras que posibiliten la mejora en la calidad de los quesos y el desarrollo de nuevos productos con valor

agregado, lo que impactaría en una mayor competitividad en el mercado nacional y regional permitiendo el desarrollo económico del país.

## 2. Queso Cremoso

### 2.1. Definición y características

El Código Alimentario Argentino define al Queso Cremoso como un producto de alta y muy alta humedad, elaborado con leche entera o leche estandarizada, con o sin el agregado de crema, acidificada por cultivos de bacterias lácticas y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas. El valor mínimo de contenido de grasa en el extracto seco es de 50 % p/p.

Es un producto rico en calcio (8-12 g/kg) ya que la coagulación es básicamente enzimática, y puede presentar un contenido inicial de galactosa relativamente alto (8-10 g/kg) si se usa un fermento compuesto únicamente de *Streptococcus thermophilus*, cuyas cepas en general no son capaces de metabolizar este carbohidrato (Zalazar et al., 1999).

Se presenta en forma cilíndrica achatada o paralelepípeda con lados planos o ligeramente convexos (diámetro/lados y altura aproximados de 24 cm y 14 cm, respectivamente), y el peso habitual ronda los 2,5-5 kg. El tiempo de maduración es de al menos 20 días para bloques de 2,5 kg y 30 días para bloques de 2,5 a 5 kg. En este tiempo, la textura y flavour del queso Cremoso se modifica, adquiriendo sus características típicas. La elaboración de queso Cremoso es una elaboración simple que se caracteriza por corte en granos de cuajada grandes, sin cocción, lavado ni prensado, el salado se realiza en salmuera y se caracteriza por tener una masa cerrada. Por este motivo, tanto la presencia de ojos y/o de aberturas mecánicas no son deseables y puede ser considerado un defecto, así como también el ablandamiento excesivo de la masa en el caso de una maduración demasiado larga o una proteólisis muy intensa. Con respecto a algunos atributos sensoriales se lo puede describir como un queso de color blanco o amarillo claro y uniforme, de sabor dulce característico y ligeramente ácido, aroma suave y agradable. Se caracteriza por tener una textura ligeramente elástica, cremosa y pegajosa. Este queso no posee corteza ya que se suele envasar en bolsas de plástico termocontraíbles luego de ser elaborado y oreado.

Además de consumirlo como un producto de mesa, es muy utilizado en la elaboración de pizzas como sustituto de menor costo que la Mozzarella por lo que la capacidad de fusión es una característica buscada (Zalazar et al., 1999).

### 2.2. Materia prima e insumos

Para la elaboración de quesos se utiliza la leche como materia prima e ingredientes imprescindibles como fermentos y coagulante, pero además pueden añadirse otros insumos con el objetivo de mejorar la coagulación y la calidad sensorial de los quesos, proporcionar color, entre otros.

**Leche:** El queso Cremoso se elabora con leche entera o leche enriquecida manteniendo una relación materia grasa/proteína  $\geq 1$ .

**Fermentos:** Originalmente el queso Cremoso se elaboraba con fermentos “naturales” de leche o “leche fermento”, los cuales son obtenidos a partir de leche de buena calidad microbiológica que, luego de un tratamiento térmico (62-65 °C durante aproximadamente 10 a 15 min), se incubaba durante la noche a 45 °C con el fin de que se desarrollen las bacterias lácticas presentes y se alcance una determinada acidez y pH. Estos cultivos naturales contienen una microbiota compleja, dominada principalmente por *Streptococcus thermophilus*, por lo que presenta una gran resistencia a fagos, además de otorgar tipicidad y características organolépticas a los productos (Reinheimer et al., 1995). Si bien estos cultivos se siguen utilizando en muchos quesos artesanales de todo el mundo, no son comunes en quesería industrial ya que la variabilidad que presentan en su composición microbiológica afecta la estandarización de los productos y la constancia de la calidad. Por ello se han reemplazado casi por completo por cultivos comerciales, que están constituidos por cepas seleccionadas. En particular, para queso Cremoso se utilizan fermentos termófilos de tipo semidirecto o de agregado directo a tina, compuestos por varias cepas de *S. thermophilus* que poseen propiedades tecnológicas conocidas y constantes en el tiempo, como la velocidad y el nivel de acidificación, entre otras. Estos cultivos también pueden contener una baja proporción de bacterias lácticas mesófilas, con el objetivo de desarrollar compuestos de aroma (por ejemplo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), o se pueden usar en combinación con otros termófilos, como es el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, con el objetivo de metabolizar completamente la galactosa proveniente de la hidrólisis de la lactosa ya que, como se mencionó previamente, la mayor parte de las cepas de *S. thermophilus* no son capaces de utilizar la galactosa. Los fermentos son inoculados en la leche de elaboración en un nivel alto ( $10^6$  UFC/mL de leche) con el objetivo de iniciar la fermentación láctica, liderar la acidificación, dominar la microbiota del queso y direccionar el proceso de maduración.

**Cloruro de calcio:** Se agrega a la leche luego de la pasteurización con el fin de reponer el calcio iónico que pudo precipitar en el tratamiento térmico, mejorar los parámetros de coagulación y las características reológicas de estos tipos de quesos.

**Colorante:** En la mayoría de las industrias, se agrega el colorante annatto (CAA, 160b) para intensificar y homogenizar el color de la pasta.

**Coagulante:** En queso Cremoso, la elevada humedad y la ausencia de una etapa de cocción, conducen a una retención elevada del coagulante en la cuajada. De esta manera, la selección del tipo y el nivel de coagulante es importante ya que una extensa proteólisis durante la maduración puede reducir la vida útil del producto. Varias enzimas coagulantes se pueden utilizar para la

elaboración del queso Cremoso, como el coagulante de bovino adulto, coagulante microbiano (proteasas producidas naturalmente por mohos) y quimosina producida por fermentación de organismos modificados genéticamente, típicamente *Kluyveromyces lactis* u otras levaduras. Hace unos años se desarrolló la quimosina de camello (producida también por microorganismos genéticamente modificados) que tiene una menor actividad proteolítica y puede ser utilizada para aumentar la humedad en el queso (y por lo tanto el rendimiento) sin producir una proteólisis excesiva durante la maduración.

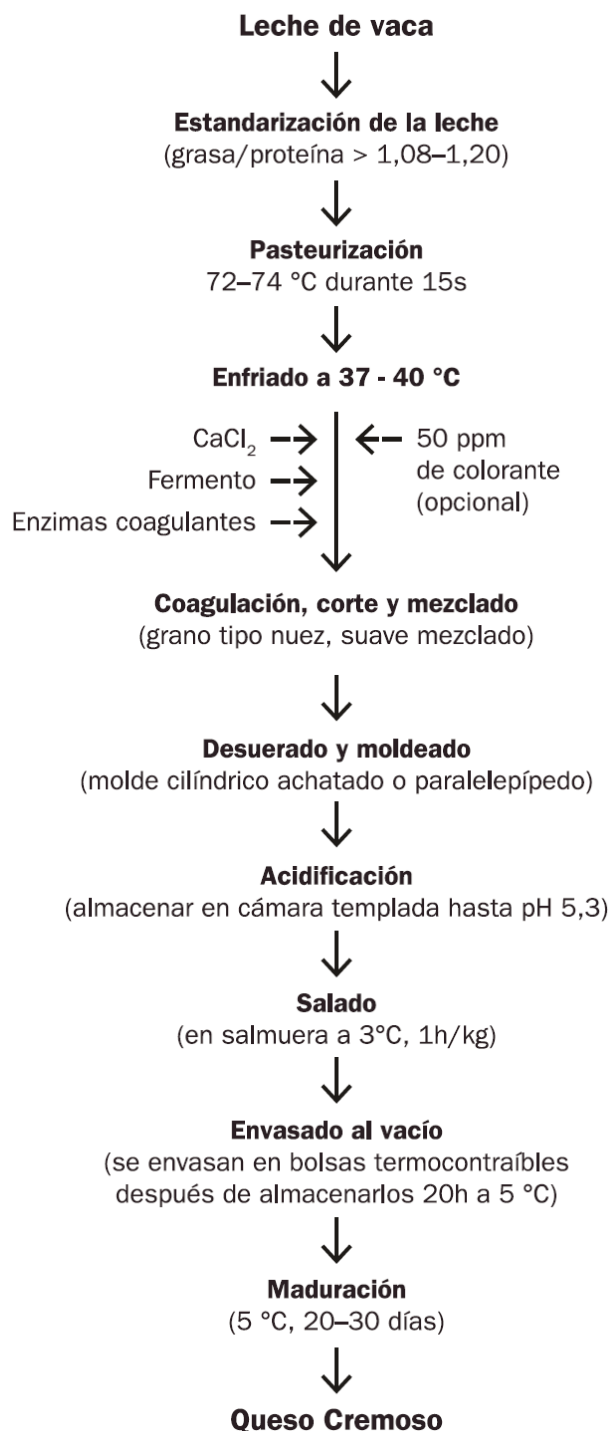
**Cloruro de sodio:** Se prepara en forma de salmuera (NaCl 20 % p/v, pH 5,4, 5 °C) en la cual se sumergen los quesos luego de haber acidificado hasta su pH específico (~5,3). El objetivo es aportar sabor, completar el desuerado, inhibir, retardar o seleccionar el desarrollo de microorganismos.

### 2.3. Elaboración

En forma general, la elaboración de los quesos es esencialmente un proceso de deshidratación, en el cual se produce una concentración de la fracción proteica y grasa de la leche. La etapa fundamental es la desestabilización de las caseínas por coagulación ácida, ácida y calor, o enzimática, siendo esta última la metodología más común que involucra además de la elaboración un proceso de maduración (McSweeney, 2004).

En particular, el queso Cremoso se elabora a partir de leche entera pasteurizada (Figura 1) la cual se estandariza a una relación grasa/proteína  $\geq 1,00$ . La pasteurización se realiza en sistemas continuos como el pasteurizador a placas (72-74 °C durante 15 s); excepcionalmente en pequeñas queserías se puede pasteurizar directamente en la tina quesera (63 °C durante 30 min). Transcurrido este tiempo, la leche se enfría hasta una temperatura de 37-40 °C, y se agrega el cloruro de calcio a razón de 0,02 g/100 mL de leche. Si se usan fermentos liofilizados, antes de su utilización se hidratan en leche pasteurizada a la temperatura de coagulación, y luego de aproximadamente 20-30 min son inoculados en la tina quesera. A continuación, se adiciona la cantidad necesaria de coagulante para la obtención de una cuajada predominantemente enzimática. Una vez que la cuajada adquirió la firmeza adecuada, el gel se corta en cubos de un tamaño aproximado de 1 cm<sup>3</sup>. La mezcla de cuajada y suero se agita suavemente para favorecer la expulsión de suero, sin aumentar la temperatura y sin romper los granos de cuajada, que luego deben soportar la descarga y el moldeo, evitando de esta manera la producción de partículas finas que afecten la textura del queso y disminuyan el rendimiento. El tiempo que la cuajada permanezca en tina influirá en la humedad del queso ya que la red de caseínas se va fortaleciendo y se expulsa más suero, lo que impacta además en forma directa en el rendimiento quesero. Este tiempo en tina debe estar relacionado con la velocidad de acidificación de la cuajada ya que estos quesos siguen desuerando en forma significativa en el molde. La pérdida de las aristas del cubo

de cuajada (redondeo) indica su deshidratación y permite identificar el momento adecuado para el moldeo. La cuajada se coloca en moldes de acero inoxidable perforado o plástico microperforado, los que se apilan de a dos lo que constituye la única presión que se ejerce sobre la cuajada, ya que este tipo de queso no lleva prensa.



**Figura 1.** Flujograma de elaboración de los quesos Cremoso. Figura extraída de Peralta et al., 2022.

Las hormas contenidas en los moldes se almacenan en una cámara o lugar tibio a una temperatura adecuada (~40 °C) para que los fermentos lácticos añadidos produzcan ácido láctico



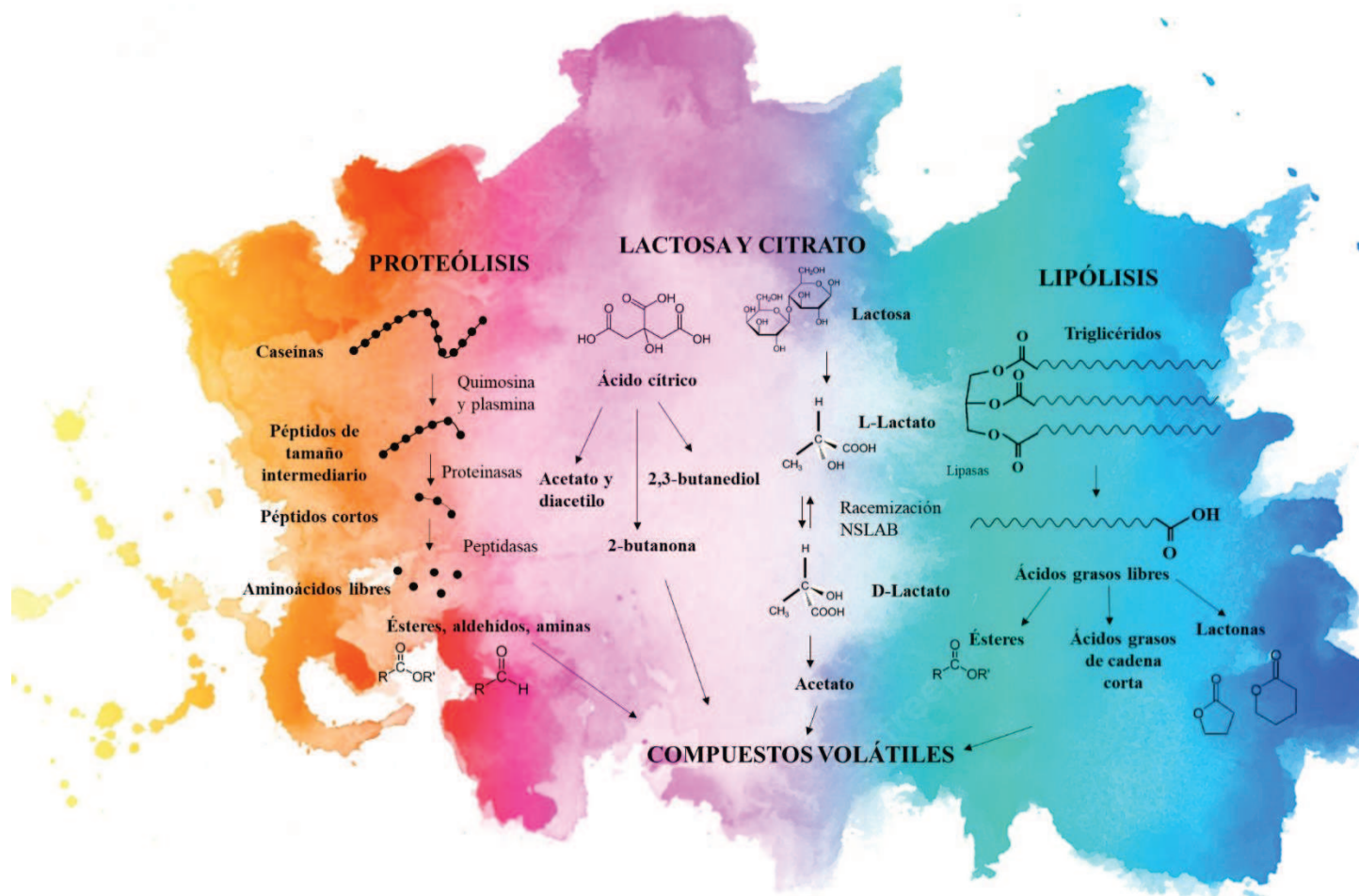
y el pH descienda hasta 5,3–5,4. En el transcurso de esta acidificación, los quesos se dan vuelta en cada molde periódicamente (lo que se denomina “volteos”) y además se invierte la ubicación de los moldes que estaban apilados. Una vez alcanzada la acidez buscada, los quesos se sumergen en salmuera fría (NaCl 20 % p/v, pH 5,4, 5 °C), con el objetivo de detener la acidificación, a razón de 1 h/kg de queso (Zalazar et al., 1999). Finalizado el salado, los quesos se colocan en la cámara de maduración (5–8 °C, 85–90 % de humedad relativa) y se procede al envasado en bolsas de plástico termocontraíbles luego de los tres o cuatro días de elaboración. Los quesos permanecen a esta temperatura y humedad entre 20 y 30 días, tiempo en el cual ocurre la maduración, desarrollándose la textura, sabores y aromas típicos de esta variedad.

#### **2.4. Eventos durante la maduración**

Una vez elaborado el queso, la cuajada comienza su proceso de maduración, durante la cual ocurren transformaciones y cambios físicos, químicos y bioquímicos entre los cuales se encuentran la difusión de sales, deshidratación de la cuajada, equilibrios químicos del calcio, metabolismo de la lactosa residual y del lactato y citrato, degradación de proteínas y lípidos (McSweeney & Sousa, 2000). Luego de esto, comienzan otros eventos bioquímicos secundarios implicados en el desarrollo del aroma y sabor que incluye el metabolismo de los ácidos grasos y de los aminoácidos (McSweeney, 2004). La complejidad de este bioproceso y su intensidad dependerá de las condiciones ambientales presentes en el queso (humedad, pH y contenido de sal), del protocolo de elaboración (enzimas adicionadas, fermentos), así como también de la duración y condiciones de maduración (temperatura y humedad relativa) (Banks, 1998). Las enzimas que participan en el proceso de maduración pueden ser nativas de la leche, aún activas luego de la pasteurización, adicionadas en la elaboración, como la quimosina, o pertenecer al complejo enzimático de los fermentos inoculados. Por último, y no menos importantes, están las enzimas provenientes de los microorganismos adventicios o NSLAB (bacterias lácticas no pertenecientes al fermento) que también contribuirán positiva o negativamente al aroma y sabor final del producto (Collins et al., 2003; McSweeney, 2004; Sgarbi et al., 2013).

A continuación se describe el metabolismo de los principales compuestos presentes en la leche que derivan en productos de sabor y aroma durante la maduración. En la Figura 2 se presenta un esquema que condensa estas modificaciones.

***Metabolismo de la lactosa residual y citrato.*** Luego de formada la cuajada, las bacterias lácticas (BAL) del cultivo iniciador metabolizan la lactosa para producir lactato. La lactosa es el principal carbohidrato de la leche; la proporción que queda en la cuajada es baja y se encuentra disuelta en la humedad. A pesar de ser un componente minoritario, la lactosa juega un rol importante en la maduración.



**Figura 2.** Reacciones bioquímicas glicolíticas, proteolíticas y lipolíticas involucradas en el desarrollo del sabor y aroma del queso.

La ISO/IDF define al cultivo iniciador para la elaboración de queso de la siguiente manera: “cultivo preparado que contiene una o varias cepas de microorganismos en recuentos elevados (en general, más de  $10^8$  UFC/g o mL de bacterias viables) que se agrega para lograr una reacción enzimática deseable, como por ejemplo la fermentación de lactosa que da como resultado la producción de ácido, degradación del ácido láctico a ácido propiónico u otras actividades metabólicas directamente relacionadas con las propiedades específicas del producto” (ISO/IDF 2010).

Las BAL, al producir ácido láctico, reducen el pH del queso y el potencial redox, parámetros que son importantes para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables, mejorando de esta manera la calidad y seguridad microbiana del queso (Parente et al., 2017). La velocidad y el grado de acidificación influyen en la textura inicial de la cuajada al relacionarse con la desmineralización de las micelas de caseína (McSweeney & Fox, 2004), como también en el sabor y aroma al afectar la actividad de enzimas importantes para la maduración y la retención del coagulante en la cuajada durante la elaboración (Børsting et al., 2014; Holmes et al., 1977).

La lactosa que permanece sin fermentar por el cultivo iniciador es probablemente metabolizada por las NSLAB, formando cantidades considerables de D-lactato para luego oxidarse a acetato (McSweeney & Fox, 2004). Además, el piruvato es un intermediario en el metabolismo de la lactosa, y es precursor de varios compuestos importantes de flavour como acetato, acetoína, diacetilo, etanol y acetaldehído (Sgarbi et al., 2013). Sin embargo, algunos de estos compuestos, como el acetato, la acetoína y diacetilo, también pueden provenir del metabolismo del citrato (Khattab et al., 2019).

Otra fuente hidrocarbonada de la leche es el ácido cítrico; al igual que la lactosa se pierde en gran parte en el suero durante la elaboración del queso. La pequeña proporción de citrato que queda retenida en la cuajada, sin embargo, es importante ya que este compuesto es precursor de compuestos de aroma de interés en quesos. El citrato no es metabolizado por *S. thermophilus* ni por lactobacilos termófilos, pero sí lo es por ciertos lactobacilos mesófilos de origen NSLAB (McSweeney & Sousa, 2000), siendo esta capacidad dependiente de la especie y la cepa, del estado fisiológico de las células y del nivel de carbohidratos en el medio (Medina de Figueroa et al., 2000). La selección de cepas de origen NSLAB que metabolicen el citrato y contribuyan al desarrollo de aroma y sabor en los quesos es de interés para el desarrollo de fermentos adjuntos de quesería.

**Proteólisis y metabolismo de aminoácidos.** La proteólisis es el proceso mediante el cual las caseínas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína) se fraccionan en péptidos de diversos tamaños y aminoácidos libres. En este proceso participan diversas proteasas y peptidasas: como las adicionadas (coagulante) o propias de la leche (plasmina) y las aportadas por los fermentos añadidos o las

NSLAB (Gan et al., 2016; McSweeney, 2004). Las NSLAB contribuyen principalmente a la proteólisis a través de su actividad peptidolítica, mientras que no tienen en general un impacto significativo en la proteólisis primaria (Peralta et al., 2021). Además de contribuir al sabor y al aroma, la proteólisis está fuertemente ligada a los cambios en la textura de la matriz del queso debido a la ruptura de la red proteica que produce.

Durante la elaboración, el coagulante solamente hidroliza un enlace de la  $\kappa$ -caseína provocando la coagulación de la leche, lo que constituye su rol tecnológico. Si bien gran parte del coagulante se pierde en el suero, una porción queda atrapada en la cuajada que, durante la maduración, puede actuar sobre todo el sistema proteico del queso, constituido por las caseínas. La actividad de la enzima coagulante residual dependerá del pH del desuerado, temperatura de cocción, humedad de la cuajada, y tipo de enzima (McSweeney, 2004; Upadhyay et al., 2004a,b). El evento inicial, denominado proteólisis primaria, es la hidrólisis de la  $\alpha_1$ -caseína ( $\alpha_1$ -CN), dando como resultado un péptido pequeño denominado  $\alpha_1$ -CN (f1-23) y otro péptido de mayor tamaño  $\alpha_1$ -CN (f24-199) o  $\alpha_{S1-1}$  (McSweeney, 2004). Este último péptido hidrofílico es el responsable de la reabsorción del suero exudado en los quesos Cremoso, que aparece normalmente entre los días 6 y 9 después de la elaboración (Hynes et al., 2001a,b). En quesos en los que se inhibió o disminuyó la actividad coagulante residual hubo una menor hidrólisis de la  $\alpha_1$ -CN y una textura más dura (Hynes et al., 2001a,b; Zalazar et al., 2006). La caseína  $\alpha_2$  es más resistente a la hidrólisis por poseer sitios de escisión restringidos a las regiones hidrofóbicas de la molécula (McSweeney et al., 1994). Con respecto a la  $\beta$ -caseína, la quimosina puede hidrolizarla cerca de la región hidrofóbica C-terminal, generando péptidos cortos, los cuales se relacionan con sabor amargo en los quesos; afortunadamente, esta reacción está inhibida en quesos ya que la presencia de sal en la humedad restringe el acceso de la enzima a los sitios de ataque. Sólo se produce cuando el equilibrio de la bioquímica de la maduración está alterado – exceso de coagulante, coagulante muy proteolítico o bajo contenido de sal (McSweeney, 2004).

Una vez desencadenada la proteólisis primaria, ocurre también la peptidólisis, proceso mediante el cual las peptidasas continúan con la escisión de los péptidos medianos y pequeños y la consiguiente producción de aminoácidos libres (AA) (McSweeney et al., 2004). El posterior catabolismo de estos AA impacta directamente en el desarrollo del flavour de la mayoría de las variedades de queso por la producción de compuestos volátiles de aroma, tales como ácidos carboxílicos, aldehídos, alcoholes y compuestos azufrados, entre otros (Kieronczyk et al., 2001; Yvon & Rijnen, 2001). Dentro de las enzimas responsables del catabolismo de AA podemos nombrar a las aminotransferasas que convierten los aminoácidos libres en sus correspondientes  $\alpha$ -cetoácidos, y la glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima que cataliza la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato (a partir de glutamato), el cual participa en la reacción de formación de  $\alpha$ -cetoácidos (Williams et al., 2006). Por este motivo, ambas actividades enzimáticas, así como las actividades

peptidasas, son utilizadas como criterios de selección de cepas para añadir al queso como fermentos adjuntos mejoradores de flavour (Peralta et al., 2021).

***Lipólisis y metabolismo de los ácidos grasos.*** La lipólisis es la hidrólisis enzimática de los triacilgliceroles (TAG) por la acción de enzimas bacterianas y endógenas de la leche, durante la cual se liberan ácidos grasos libres (AGL, desde C4:0 hasta C18:2). Los triglicéridos de la leche son ricos en ácidos grasos de cadena corta, que desempeñan un rol importante en el desarrollo del sabor de los quesos por tener umbrales de sabor bajos (McSweeney, 2004). Además de su contribución directa, también pueden ser precursores de compuestos volátiles de interés como cetonas, alcoholes, ésteres, metilcetonas y lactonas, que contribuyen al flavour (Collins et al., 2003; Khattab et al., 2019; Smit et al., 2002). En particular, los ésteres (por ejemplo: butanoato, hexanoato, y acetato de etilo) se forman por la reacción de los AGL con alcoholes. El alcohol más frecuente suele ser el etanol que proviene del catabolismo de aminoácidos o la fermentación de lactosa (McSweeney, 2011). También son importantes las metilcetonas formadas por la  $\beta$ -oxidación y posterior descarboxilación de AGL, especialmente 2-heptanona y 2-nonanona (Khabbat et al., 2019).

La lipólisis intensiva es deseable en ciertos tipos de quesos como el Azul, Emmental, Parmesano, entre otros (Clark, 2009), mientras que es indeseable en otros como el Cheddar, Gouda, Suizo (McSweeney & Sousa, 2000), así como en el queso Cremoso.

Por todo lo expuesto anteriormente, se debe reconocer a la maduración como un proceso fundamental en el queso ya que otorga las características organolépticas típicas de cada variedad (Forde & Fitzgerald, 2000). En efecto, el sabor y aroma del queso es el resultado del balance de una gran variedad de compuestos provenientes de las distintas vías metabólicas descritas anteriormente. El desarrollo de este proceso puede ser modificado tanto positiva como negativamente por diversos factores. El hecho que las reacciones químicas implicadas en la maduración son en su mayoría enzimáticas, principalmente de enzimas microbianas (provenientes de los fermentos adicionados y contaminantes) (Thierry & Hannon, 2011), resalta la importancia de la microbiota del queso en el desarrollo de una maduración adecuada. La actividad metabólica de microorganismos indeseables puede dar lugar a la aparición de distintos defectos de textura, sabor y aroma, algunos de los cuales se describen en el siguiente apartado. Dentro de las soluciones posibles para disminuir la carga microbiana adventicia en quesos y, de esta manera, inhibir la aparición de defectos asociados a su actividad metabólica, podemos mencionar el estricto control de las condiciones higiénicas durante la elaboración, el correcto mantenimiento de la temperatura de almacenamiento de los quesos (Cuffia et al., 2019; Peralta et al., 2020), la microfiltración de la leche para reducir la carga microbiana (Elwell & Barbano, 2006, Hoffman et al., 2006), y la utilización de fermentos adjuntos con el fin de que compitan o que produzcan compuestos antimicrobianos (Ávila et al., 2020). Los fermentos adjuntos, además, constituyen

una forma efectiva de influir positivamente en la maduración, seleccionando aquellas cepas que tengan la habilidad de promover eventos deseables, particularmente la producción de compuestos volátiles de interés que tengan impacto en el flavour. El uso de fermentos adjuntos para mejorar la calidad de quesos se expone más adelante.

## 2.5. Defectos comunes en quesos

Dentro de las modificaciones indeseables que ocurren durante la maduración, asociadas a la actividad enzimática de la microbiota, se incluyen: la producción indeseada de gas con la consecuente formación de ojos no deseados, grietas, y rajaduras, y el desarrollo de coloraciones, aromas y/o texturas anormales. Estas alteraciones pueden detectarse al principio de la maduración o luego de varias semanas o meses y dependerán del grupo microbiano y de las características del queso (humedad, pH y contenido de sal), del proceso productivo (cultivo iniciador agregado, enzimas residuales), del almacenamiento y de la manipulación (microorganismos contaminantes), entre otros factores (Guglielmotti et al., 2021; Ledenbach & Marshall, 2009). Los quesos con maduración corta, que generalmente tienen valores de pH y humedad más altos o menor contenido de sal en proporción a la humedad, tienen mayor probabilidad a tener un deterioro más rápido que los quesos de maduración prolongada, los cuales tienen un pH comparativamente más bajo al igual que menor actividad de agua y potencial redox, y están expuestos a defectos tardíos (Ledenbach & Marshall, 2009).

**Producción excesiva de ácido:** Este es uno de los defectos más comunes que se presentan en quesos blandos como el Cremoso, y se asocia a un desarrollo excesivo de la acidez en la cuajada ( $\text{pH} < 5,0$ ) antes de su ingreso a salmuera o también a una post-acidificación durante la maduración. Un pH bajo afecta directamente la textura, produciendo el “arricotado” del queso ya que las caseínas se encuentran cerca de su punto isoeléctrico y pierden la habilidad para ligar agua, además de perder su capacidad de fusión (Hynes et al., 1999). Asimismo, esto puede tener un impacto indirecto en el flavour al afectar la actividad de enzimas importantes para la maduración (Milesi et al., 2009; Lee et al., 1990). Este defecto se asocia a fermentos muy rápidos cuya actividad no se detiene por inmersión en salmuera fría, aunque también existen cepas de NSLAB altamente acidificantes que pueden causar una post-acidificación durante la maduración afectando asimismo el contenido de humedad del queso (Crow et al., 2001; Peralta et al., 2022;). Los fermentos adjuntos que posean una actividad acidificante excesivamente elevada pueden utilizarse como cultivos iniciadores mixtos, como se ha reportado para una cepa de *L. plantarum* evaluada en varias variedades de queso (De Pasquale et al., 2019; Herreros et al., 2007).

**Formación de ojos o aberturas:** La formación de ojos es un evento deseable en algunas variedades de quesos y está asociada a la producción de gas ( $\text{CO}_2$ ) por microorganismos específicos. En otros casos este fenómeno es indeseable y considerado un defecto, ya sea por el

tipo de microorganismo involucrado en la producción de gas o debido a que se manifiestan en variedades en las que no se espera la presencia de ojos. En este sentido, en estudios realizados en nuestro instituto se detectaron numerosos problemas relacionados con la hinchazón de quesos y la formación indeseable de ojos en quesos que deben tener la masa cerrada, como lo es el queso Cremoso (Quiberoni et al., 2008; Reinheimer et al., 1995). En la Tabla 1 se presentan los diferentes grupos microbianos responsables de defectos gasógenos en quesos, los sustratos involucrados y los gases producidos en cada caso. La producción de gas no deseado proviene principalmente del metabolismo de la lactosa, el lactato o el citrato por la actividad metabólica de diversos microorganismos (Guglielmotti et al., 2021). Los agentes microbianos detectados como responsables de los defectos gasógenos en quesos de pasta blanda fueron en su gran mayoría cepas del género *Leuconostoc*, y en mucha menor proporción lactobacilos heterofermentantes, bacterias coliformes, propionibacterias, y bacilos esporulados aerobios (Peralta et al., 2022).

**Tabla 1.** Principales grupos microbianos responsables de defectos gasógenos en quesos.

Grupo microbiano / especie	Sustrato	Tipo de defecto según el momento de manifestación	Productos gaseosos
Coliformes	Lactosa	Hinchazón precoz	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
Levaduras	Lactosa	Hinchazón precoz	CO <sub>2</sub>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Citrato/Lactato	Hinchazón precoz y tardía	CO <sub>2</sub>
<i>Lactobacillus brevis</i>			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lactosa/Citrato	Hinchazón precoz y tardía	CO <sub>2</sub>
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Lactato	Hinchazón tardía	CO <sub>2</sub>
<i>Bacillus subtilis</i>	Lactosa	Hinchazón tardía	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Lactato	Hinchazón tardía	CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub>
<i>Clostridium butyricum</i>			
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Citrato	Hinchazón precoz y tardía	CO <sub>2</sub>

Tabla extraída de Fontaneto Apoca, 2017.

**Producción de off-flavours:** La formación de compuestos con impacto negativo en el flavour puede provenir de diversas reacciones catalizadas por las diferentes enzimas presentes en el queso. El tipo y nivel de coagulante adicionado debe ajustarse en forma precisa, ya que una elevada actividad proteolítica residual puede provocar sabores amargos y off-flavours (Gauna, 2005; SAGPyA, 2009). Un período de maduración más prolongado se asocia también al desarrollo de sabor amargo debido al aumento de péptidos hidrofóbicos, derivados en su mayoría de la región C-terminal de la  $\beta$ -caseína (Karametsi et al., 2014). Además, el catabolismo de aminoácidos aromáticos y la actividad peptidolítica de algunos lactobacilos, como también la oxidación de ácidos grasos pueden dar lugar a la formación de compuestos con sabores y aromas

desagradables (Antonsson et al., 2003; Cadwallader & Singh, 2009; McSweeney et al., 2004). Otros agentes implicados en este defecto son las enzimas (proteolíticas y lipolíticas) termorresistentes de microorganismos psicotrofos (Boor & Fromm, 2006).

**Formación de aminas biógenas:** La proteólisis, además de producir compuestos de sabor y aroma, puede dar lugar a la formación de aminas biógenas (AB). Estos compuestos nitrogenados de bajo peso molecular se producen principalmente por la decarboxilación de aminoácidos, en una reacción catalizada por enzimas decarboxilasas (Ladero et al., 2010; Majjala et al., 1993). Este defecto se presenta generalmente en quesos de larga maduración, ya que los mismos contienen un alto contenido de aminoácidos, que son los precursores de las AB. En un estudio realizado en nuestro Instituto (Giménez, 2018) en el cual se ha relevado el contenido de AB en quesos artesanales (Sardo) elaborados a partir de leche cruda e industriales (Reggianito, Parmesano y Cheddar), se encontraron en mayor concentración las siguientes AB: tiramina, histamina, putrescina y cadaverina. Los valores elevados de AB encontrados en los quesos artesanales se relacionan con una calidad higiénica deficiente de la materia prima y bajo control del proceso de elaboración del queso, especialmente en lo que hace a fermentos seguros. Estos compuestos pueden representar un riesgo serio para la salud de las personas cuando están presentes en los alimentos en cantidades significativas, o por la disminución o inhibición de la actividad de las enzimas detoxificantes en individuos susceptibles, ya sea por causas genéticas, como consecuencia de tratamientos farmacológicos (medicamentos inhibidores de las enzimas mono-aminoxidasas: IMAO) o consumo de bebidas alcohólicas, ya que el etanol es inhibidor de estas enzimas (Bodmer et al., 1999; Ladero et al., 2010; Shalaby, 1996). Herrero et al. (2012) encontraron cepas de *L. casei* aisladas de quesos que contribuyeron a reducir la acumulación de histamina y tiramina en quesos, una cualidad que las hace atractivas para su uso como cultivos adjuntos.

## 2.6. Fermentos adjuntos para mejorar la calidad de quesos

Las NSLAB constituyen una parte importante de la microbiota del queso; este grupo microbiano está constituido principalmente por lactobacilos mesófilos heterofermentantes facultativos, aunque también se han aislado pediococos y enterococos (Beresford, 2003, 2007; Beresford et al., 2001). La leche cruda es la principal fuente de las NSLAB, aunque el ambiente de las industrias también tiene un aporte importante (Beresford, 2007). Muchos lactobacilos mesófilos (*Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, entre otros) tienen la capacidad de formar biopelículas para mejorar su supervivencia después de los tratamientos de limpieza y desinfección, provocando su persistencia en el entorno lechero (Somers et al., 2001). Si bien la contaminación puede resultar posterior al tratamiento térmico, algunas cepas de NSLAB también resisten estos tratamientos (Beresford et al., 2001; De Angelis et al., 2004).



En general, al inicio de la maduración el recuento de NSLAB es bajo ( $< 10^2$  UFC/g) pero su población se incrementa con el transcurso del tiempo hasta llegar a  $10^6$  UFC/g o más luego de unas pocas semanas. A este nivel, pueden convertirse en la biota dominante en algunas variedades de queso si la población del fermento disminuye (Gobbetti et al., 2015). Esto depende principalmente de la disponibilidad de fuentes de energía y de la temperatura de maduración (Peralta et al., 2021).

Varios estudios han demostrado que quesos elaborados en condiciones asépticas y con bajos recuentos iniciales de NSLAB debido al uso de leche microfiltrada o a la aplicación de diversas estrategias para mantener bajo el nivel de este grupo microbiano carecen de sabor y son diferentes a los quesos completamente maduros, lo que resalta el papel de estas bacterias en la tipicidad del queso y en la intensidad y complejidad del perfil de aroma (Crow et al., 2001; Gobbetti et al., 2015; Nantet, 1994). A este aspecto positivo, se contraponen lo mencionado en el ítem anterior, en relación a la participación de las NSLAB en los defectos en quesos. De esta manera, la influencia de las NSLAB no puede generalizarse como positiva o negativa, sino que dependerá de las especies y cepas presentes, su perfil enzimático y la expresión del mismo, su nivel en el alimento y de las condiciones ambientales y de maduración.

Con el fin de retener los beneficios de las NSLAB en cuanto a brindar tipicidad y profundidad a la maduración de quesos, a la vez que disminuir el riesgo de defectos y la inconstancia en la calidad de estos productos, se ha propuesto el uso de fermentos adjuntos en quesería, seleccionados a partir de cepas de origen NSLAB (El Soda et al., 2000, Fox et al., 2000).

Los cultivos adjuntos, que también pueden denominarse de afinado o de maduración, no deben aportar a la acidificación durante la elaboración del queso, pero sí crecer rápidamente en la cuajada para alcanzar niveles altos al comienzo de la maduración ( $\sim 10^7 - 10^8$  UFC/g) y mantenerlos a lo largo de la misma. Deben contar con un perfil enzimático que contribuya a la producción de compuestos de interés que aporten al flavour y acelere la maduración, y no deben causar defectos (El Soda et al., 2000, Madkor et al., 2000). Son interesantes aquellas cepas galactosa y citrato positivas que contribuyan a disminuir las fuentes de energía disponibles para NSLAB adventicias, como también que promueven la formación de compuestos antimicrobianos como estrategia de biocontrol, con la finalidad de obtener productos de calidad satisfactoria y constante. Resultan atractivas también aquellas cepas de NSLAB que poseen propiedades probióticas, ya que suma al carácter funcional del alimento (Bude-Ugarte et al., 2006; Burns et al., 2012; Settanni & Moschetti, 2010).

Varias especies de lactobacilos mesófilos se aislaron como NSLAB a partir de diferentes tipos de quesos, siendo las más comunes las siguientes: *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Levilactobacillus*

*brevis* y *Lactobacillus curvatus*. Asimismo, diversos estudios se llevaron adelante con la incorporación de estos lactobacilos mesófilos con el fin de mejorar la proteólisis, generar atributos sensoriales y disminuir la biota adventicia en diversos tipos de quesos como Cheddar (Lynch et al., 1996; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2000), Manchego (Gomez-Ruiz et al., 2008; Poveda et al., 2014), Gouda (Van Hoorde et al., 2010), semiduros (Antonsson et al., 2003; Bergamini et al., 2005; Milesi et al., 2009), entre otros. También se ha evaluado la incorporación de cepas de origen NSLAB con el objetivo de mejorar la textura y el sabor de quesos reducidos en materia grasa como Cheddar (Broadbent et al., 2003), Edam (Tungjaroenchai et al., 2004) y Caciotta (Di Cagno et al., 2014).

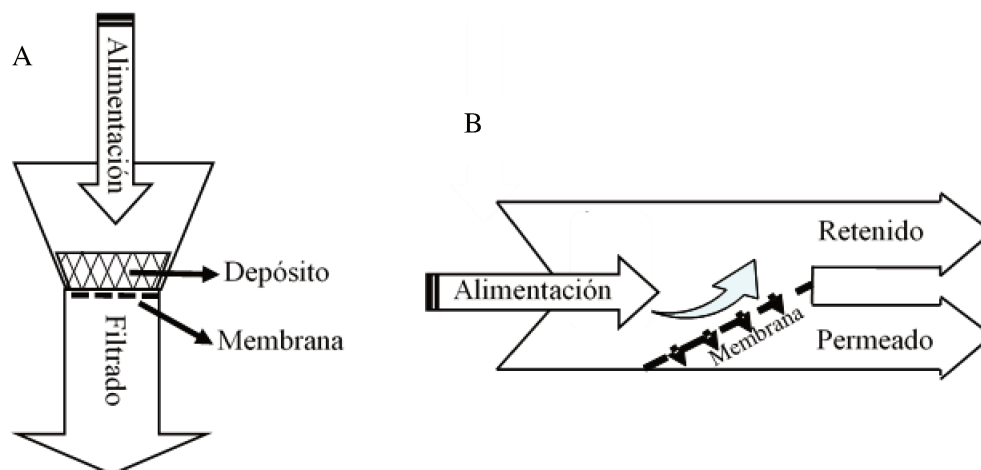
En el INLAIN se han aislado e identificado 22 cepas de lactobacilos mesófilos de origen NSLAB de quesos argentinos de buena calidad de las especies *Lactocaseibacillus casei*, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus perolens* (Bude- Ugarte et al., 2006). Algunas de estas cepas produjeron cambios favorables cuando fueron incorporadas como fermentos adjuntos en queso Cremoso (Milesi et al., 2008; 2009; Peralta et al., 2020). El estudio y la caracterización de cepas autóctonas para su uso como adjuntos en quesos de gran consumo en nuestro país como es el Cremoso es de gran interés para las industrias.

### **3. Uso de tecnologías de membrana en quesería**

En los últimos 50 años, las tecnologías de membranas revolucionaron la industria láctea y permitieron mejoras en la eficiencia de la planta, aumentos en el rendimiento del queso, desarrollo de procesos continuos, como también posibilidades de nuevos productos (Mistry & Maubois, 2017).

La función primordial de una membrana es actuar como barrera selectiva, dando como resultado una concentración selectiva (retentado) al permitir el paso de determinados componentes (permeado) de una dada corriente de alimentación. La filtración por membrana es un proceso de filtración tangencial en la que la corriente de alimentación, que circula a una presión y velocidad que garantice el régimen turbulento, ingresa paralela a la membrana, donde el material retenido es rápidamente removido con el objetivo que se mantengan libres los poros de la membrana (Meinardi et al., 2022). La selectividad de los componentes forzados a pasar a través de la membrana porosa semipermeable está relacionada con las dimensiones de la molécula o la partícula de interés y el tamaño de poro de la membrana y el material de la misma (Cheryan, 1998). En contraste a este proceso de filtración tangencial, en la filtración convencional la suspensión a filtrar ingresa en forma perpendicular al material poroso para que las partículas retenidas se acumulen formando un depósito que favorece la calidad de la filtración. En la Figura

3 se muestra un esquema del funcionamiento de un módulo de filtración convencional y tangencial (Bylund, 2015).

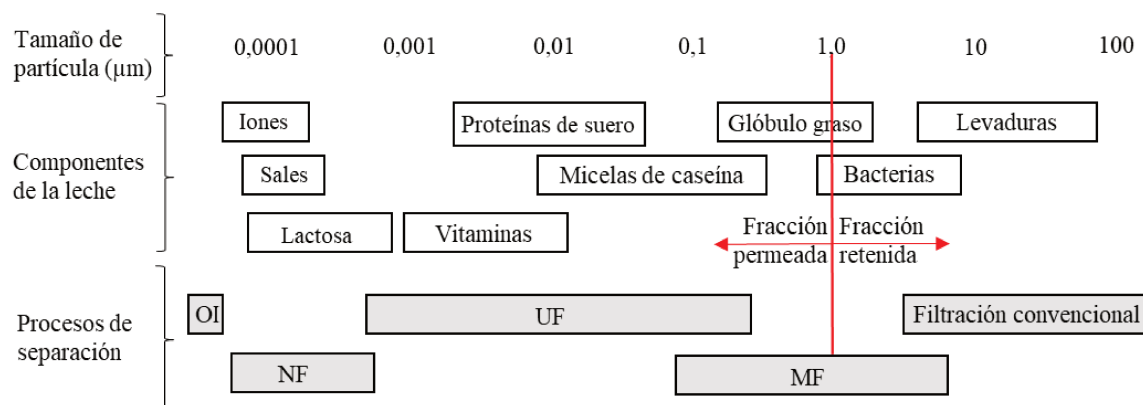


**Figura 3.** Esquema del funcionamiento de los módulos de filtración convencional (A) y tangencial (B). Figura modificada de Meinardi et al., 2022.

Los diferentes procesos de filtración por membrana incluyen ósmosis inversa (OI), nanofiltración (NF), ultrafiltración (UF) y microfiltración (MF). Cada uno de estos procesos tiene características propias que lo hacen apto para algunas aplicaciones, pero no para los demás. En la Figura 4 se incluyen estos cuatro procesos y los principales componentes de la leche puestos en juego (Bylund, 2015). Se muestra una escala que indica las dimensiones aproximadas de los componentes de la leche y el tamaño de poro de las membranas. Como ejemplo, se representó mediante una línea roja una alternativa del diámetro de corte de la membrana de microfiltración utilizada para sanear la leche, y la fracción retenida y permeada.

Las tecnologías de membrana tienen una amplia gama de aplicaciones en la industria láctea, en las que se incluyen la extensión de la vida útil de la leche mediante el saneamiento por eliminación de bacterias y esporas, eliminación de la grasa en concentrados de suero, desmineralización de suero, estandarización de los componentes principales de la leche, fraccionamiento, concentración y purificación de distintos componentes de la leche, especialmente proteínas lácteas, entre otras (Brans et al., 2004; Hu & Dickson, 2015; Kumar et al., 2013; Mistry & Maubois, 2017; Pouliot, 2008; Özer & Tamime, 2013). Las ventajas adicionales de la estandarización de la leche destinada a quesería mediante UF son un mejor control del proceso debido a la materia prima estandarizada, la posibilidad de disminuir la cantidad de aditivos en el procesamiento y una calidad más uniforme del producto terminado (Guinee et al., 1994). La estandarización del nivel de proteína de la leche de quesería también reduce las variaciones estacionales en la composición de la leche (Papadatos et al., 2003). Las

diferentes aplicaciones están relacionadas con el tamaño de poro de las membranas y su configuración.



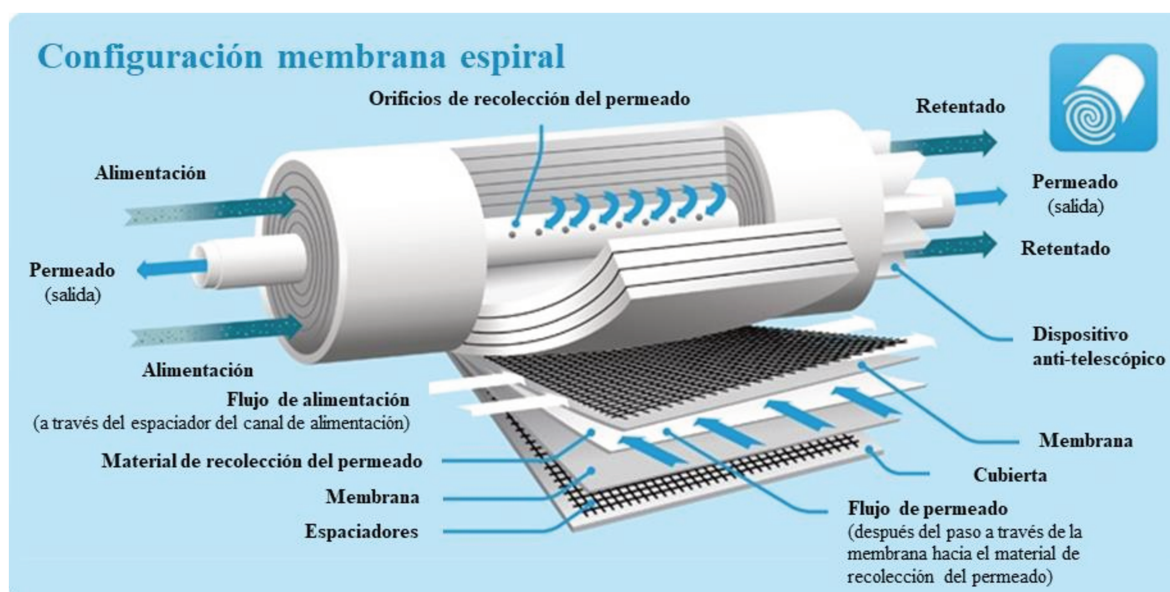
**Figura 4.** Procesos que utilizan tecnología de membrana (OI: ósmosis inversa, NF: nanofiltración, UF: ultrafiltración y MF: microfiltración), y su relación con los principales componentes de la leche. Figura modificada de Meinardi et al., 2022.

### Configuración de la membrana

Existen diferentes configuraciones básicas de membranas entre las cuales se encuentran: tubular, fibra hueca, placa y marco, y bobinado en espiral (Cheryan, 1998; Maubois & Brulé, 1982).

Específicamente la de formato espiral es la que el INLAIN incorporó en su planta piloto. Este tipo de membrana es la más utilizada en las industrias lácteas y alimentarias en general y también es la más económica. Esta configuración (Figura 5) consiste en membranas de lámina plana con espaciadores envueltos alrededor de un tubo colector de permeado perforado (Cheryan, 1998). Los espaciadores tienen el objetivo de promover la turbulencia, minimizando así el ensuciamiento, aunque a veces se experimentan dificultades de limpieza y desinfección, especialmente cuando se recirculan retenidos altamente viscosos. Además, tiene la particularidad que el soporte y el diseño general permite el funcionamiento a altas presiones transmembrana sin dañar la misma. Cuando la corriente de alimentación ingresa y pasa por la superficie de la membrana, el permeado se dirige en espiral hacia el centro del tubo para su salida (<https://www.life-memory.eu/koch-membrane-systems#>).

En los últimos años se diseñaron mejoras en los componentes de la membrana, como el desarrollo de membranas minerales y cerámicas.



**Figura 5.** Configuración interna membrana espiral. Figura modificada de <https://www.life-memory.eu/koch-membrane-systems#>

El procesamiento de la leche con tecnologías de membranas de diferente tamaño de poro hace posible estandarizar las leches con contenidos precisos de caseína, grasa, proteína sérica y lactosa (Johnson & Lucey, 2006). En la industria quesera, las membranas también permiten aumentar el rendimiento y la calidad del queso, como también disminuir el volumen de suero al usar leche concentrada en la elaboración. Según el diámetro de corte de la membrana (tamaño de los poros) utilizada, se pueden presentar dos alternativas (Kumar et al., 2013) como se mencionan a continuación:

### 3.1. Microfiltración

La microfiltración es un proceso que separa selectivamente partículas con un peso molecular superior a 200 kDa (Mistry & Maubois, 2017). Según el tamaño de poro de la membrana (entre 0,1 y 5,0  $\mu\text{m}$ ) los componentes de la leche eliminados incluyen células somáticas, glóbulos de grasa, bacterias (Saboyainsta & Maubois, 2000), componentes agregados del suero (Maubois et al., 2001),  $\beta$ -caseína (Terré et al., 1987) y  $\beta$ -lactoglobulina (Morgan et al., 1997).

Las membranas que se utilizan generalmente para microfiltrar la leche son de material cerámico o polimérico, siendo estas últimas las menos costosas pero de menor vida útil y resistencia a productos químicos y temperatura (Cheryan, 1998). En particular, las membranas cerámicas tienen una distribución de tamaño de poro más estrecha que las poliméricas, lo que otorga una mayor capacidad para retener partículas con diámetros mayores que un tamaño de poro determinado (Brans et al., 2004).

Las membranas de MF con tamaño de poro de 0,1 a 0,3  $\mu\text{m}$  (generalmente de material cerámico) se utilizan para la producción de concentrados de caseína micelar debido a su capacidad

de separar las caseínas de las proteínas de suero; la caseína micelar constituye una materia prima interesante para la producción de quesos (Hurt et al., 2010; Nelson & Barbano, 2005; Neocleous, 2002; Zulewska et al., 2009). Cabe destacar que la aplicación de esta filtración a leche permite obtener como permeado un suero libre del caseinomacropéptido con muchas más aplicaciones que un suero de quesería convencional (Bacher & Kønigsfeldt, 2000).

Otra de las aplicaciones más importantes de la microfiltración es la del saneamiento de la leche. Para esto se utilizan membranas de un tamaño de poro de 1,4  $\mu\text{m}$  ya que separa la mayoría de los microorganismos de los principales componentes de la leche (Meinardi et al., 2022). De todas maneras, hay una pequeña disminución de los sólidos totales y las proteínas en el permeado, lo que se atribuye a que algunas micelas de caseína no llegan a atravesar la membrana. Sin embargo, la MF de la leche con estas membranas no afecta los parámetros de coagulación ni tecnológicos en elaboraciones de quesos. Si bien esta tecnología se utiliza para sanear la leche, no garantiza la ausencia de patógenos, por lo que la leche microfiltrada se debe pasteurizar para su consumo; se ha reportado que la MF y pasteurización puede extender la vida útil de una leche hasta 90 días en condiciones de refrigeración (4–5 °C) (Caplan & Barbano, 2013). Además, la microfiltración elimina los esporos, por lo que el uso de leche microfiltrada para elaboraciones de quesos duros soluciona los defectos de hinchazón tardía, asociados a la actividad metabólica de esporulados. Asimismo, también elimina gran parte de las NSLAB, lo que puede ser ventajoso en la mayoría de los casos para un mejor control de la maduración, pero que también puede traer problemas en quesos en los que el aporte de este grupo microbiano es importante (McSweeney et al., 1993). Existen otras aplicaciones con membranas cerámicas de tamaño de poro de 1,4  $\mu\text{m}$  como lo reportaron Guggisberg et al. (2015), con el objetivo de eliminar micropartículas de la leche destinada a quesería, las cuales son imprescindibles para la formación de ojos en quesos. De esta manera, esta tecnología sería potencialmente aplicable para tratar leche de quesería y asegurar la ausencia de ojos en quesos de masa cerrada.

### **3.2. Ultrafiltración**

Las membranas de ultrafiltración tienen un tamaño de poro menor a las de microfiltración y permiten separar selectivamente moléculas con peso molecular entre 1000 a 200000 Da. El permeado obtenido luego de ultrafiltrar la leche contiene agua, lactosa, minerales solubles, nitrógeno no proteico y vitaminas solubles en agua, mientras que en el retenido aumentan las proteínas, grasas y sales coloidales en proporción a la cantidad de permeado eliminado (Glover, 1985; Maubois et al., 1969; Maubois & Mocquot, 1971).

Se ha informado que esta tecnología proporciona algunas ventajas adicionales en la estandarización de la leche de elaboración de quesos, tales como: el aumento de los sólidos totales de la leche lo que conlleva a un aumento en el rendimiento quesero y una disminución de los

costos de producción en términos de energía y equipamiento, la reducción de coagulante y cultivo iniciador por la buena capacidad de coagulación enzimática de la leche UF, y el aumento del valor nutricional debido a la incorporación de las proteínas de suero en el queso, entre otras (Lipnizki, 2010).

La UF se clasifica en tres categorías según el factor de concentración volumétrico (FCV) utilizado: bajo (FCV:1,2-2,0), medio (FCV:2-5) o alto (FCV>6-7); este factor indica cuántas veces se ha concentrado el retenido en relación a la corriente de alimentación (Mistry & Maubois, 2017). La más utilizada es la UF de bajo factor de concentración (< 2), que permite mantener uniforme la composición de la leche a lo largo del año, eliminando la variación estacional (Soodam & Guinee, 2018). Al utilizar esta metodología se obtiene una materia prima concentrada lo que conlleva generalmente a una mejora de la coagulación, con un incremento de la dureza del coágulo, menores pérdidas de caseína en el suero y un aumento de la incorporación de proteínas de suero en el queso. Todos estos cambios contribuyen a maximizar el rendimiento de la planta quesera (Banks, 2007; Pouliot, 2008). Govindasamy–Lucey et al. (2004; 2011) realizaron estudios sobre el efecto del uso de retenidos de UF de baja concentración de leche en frío sobre la coagulación y propiedades del queso Parmesano y Suizo y demostraron un menor tiempo de corte durante la elaboración, un mayor rendimiento quesero y similares atributos de calidad cuando se trabajó con leche adicionada de retentados de UF en comparación con el uso de leche sin concentrar. A niveles más altos de concentración, el coágulo es extremadamente firme y difícil de manejar y, como consecuencia, las pérdidas de grasa en el suero pueden ser altas (Banks, 2007). El FCV máximo alcanzable por ultrafiltración es de aproximadamente 7 para la leche entera, alcanzando directamente el contenido de sólidos totales del queso por lo que no es necesaria la expulsión de suero, con excepción de las variedades más duras, ya que sus protocolos requieren un drenaje posterior (Fox et al., 2017). Algunos autores han elaborado quesos a partir de estos retentados con altos factores de concentración, denominados también prequeso líquido (Lo & Bastian, 1998; Qvist et al., 1987). Estos últimos autores incorporaron además del tratamiento con membranas, la desnaturalización de las proteínas de suero mediante tratamiento térmico (72 °C - 17 s o 85 °C - 17 s) en la elaboración de queso Havarti resultando quesos con mayor contenido de humedad y de proteína de suero recuperadas con respecto al control. La leche UF con un FCV: 6 permitió aumentar el rendimiento de queso tipo Camembert industrial bajo en grasa; sin embargo, se observó una maduración más lenta y defectos superficiales, que se atribuyeron a una capa mineral de fosfato de calcio que actuaba como barrera de la difusión del lactato que causaron una alteración en el metabolismo y el crecimiento del hongo *Penicillium camemberti* en la superficie (Hannon et al., 2009). Los problemas de maduración fueron atribuidos a la mayor concentración de proteínas de suero y al aumento de la capacidad buffer que provocó un aumento del pH y redujo la solubilidad del calcio y el fósforo que se depositaron

en la superficie. Para contrarrestar estos inconvenientes y obtener quesos con una calidad sensorial similar a los tradicionales, se propuso acidificar la leche. Hannon et al. (2006) observaron que la reducción del pH (de 6,6 a 5,2) durante la coagulación en queso UF indujo a la lisis más temprana de los cultivos iniciadores, provocando la liberación de enzimas intracelulares en la matriz del queso y, como consecuencia, aumentaron la tasa de proteólisis del queso. Es importante destacar que la elaboración de queso con retenidos de alta concentración implica el uso de equipos especializados para lograr una mayor sinéresis de la cuajada que permita alcanzar el contenido final de sólidos totales del queso (Guinee et al., 1995; Spangler et al., 1991).

Para obtener productos equivalentes a aquellos obtenidos con leche sin concentrar, la tecnología quesera debe adaptarse según la concentración de la leche ultrafiltrada utilizada. Para ello es necesario conocer la composición de la leche enriquecida, su comportamiento en la coagulación, e investigar la influencia del incremento de la concentración en los eventos que ocurren durante la maduración.

#### **4. Leche de elaboración: composición, propiedades de coagulación y rendimiento quesero**

##### **4.1. Composición de la leche. Micelas de caseína**

La leche destinada a la fabricación de queso debe presentar una buena aptitud para la coagulación y formación del gel, por lo es importante que posea una adecuada composición. La composición de la leche depende de muchos factores, dentro de los cuales podemos mencionar la genética y la salud del animal, el manejo del rodeo, la estación del año y la etapa de lactancia, entre otros (Farkye, 2004). Entre el quinto y sexto día luego del parto, la secreción de la glándula mamaria ya presenta las características propias de la leche madura, cuya composición promedio es 3,5 % de proteínas (caseína: 2,35 %, albúminas: 0,45 %, globulinas: 0,70 %), 3,60 % de grasa, 0,75 % de sales y 4,50 % de lactosa (Meinardi et al., 2022). Las caseínas están organizadas en estructuras micelares, cuyas propiedades determinan su comportamiento frente a la coagulación. Dichas micelas son partículas coloidales compuestas por un complejo entramado heterogéneo de proteínas individuales ( $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ ) unidas a través de interacciones hidrofóbicas y fosfato de calcio formando agregados altamente hidratados. El tamaño promedio de las micelas de caseína es de 150 a 200 nm de diámetro (Dagleish et al., 2012; Fox & Brodtkorb, 2008), aunque éste está influenciado por la estación del año, el período de lactancia y la variación individual entre las vacas (De Kruif & Holt, 2003). Las diferentes caseínas que forman la micela no están distribuidas uniformemente por toda la partícula, siendo la  $\kappa$ -caseína la que está ubicada principalmente en la superficie de la micela, probablemente junto con  $\alpha$ -caseínas. Esta distribución obedece a las diferencias de sensibilidad de las caseínas individuales al calcio, siendo la  $\alpha$ - y  $\beta$ -caseína sensibles, mientras que la  $\kappa$ -caseína es no sensible. La estructura micelar permite



alojar grandes cantidades de calcio sin que ocurra la precipitación (Müller-Buschbaum et al., 2007). Es por ello que el calcio resulta esencial para la estabilidad de las micelas y el aumento del contenido de calcio amplifica las interacciones dentro y entre las partículas primarias de caseína, lo que endurece las micelas, como lo describen Lucey & Horne (2018).

No todas las leches presentan buenas aptitudes casearias ya que algunas coagulan lentamente dando lugar a geles blandos que tienden a fragmentarse en granos muy finos, generando cuajadas que retienen una humedad elevada, siendo su maduración muy difícil de controlar. Por este motivo resulta interesante poder conocer las propiedades de coagulación de las leches y la influencia de distintos factores, entre ellos la concentración de la leche.

#### **4.2. Coagulación de la leche**

Las proteínas de la leche, en particular las caseínas, cumplen un rol fundamental en la coagulación de la leche destinada a quesería. El papel clave de la  $\kappa$ -caseína se debe a su estructura y disposición, ya que tiene dos regiones distintas: una región hidrofóbica que se ubica hacia el interior de la micela, y una región que se orienta hacia el medio acuoso descripta como “pelo hidrofílico”. Estos fragmentos hidrofílicos forman una capa cargada e hidratada que estabiliza la micela y previene su agregación, debido a su contribución al potencial z (-20 mV) y a la estabilización estérica (Dagleish et al., 2012).

La acción enzimática de la quimosina permite la desestabilización de la micela por escindir específicamente el enlace peptídico Phe105-Met106 de la  $\kappa$ -caseína ubicado en el extremo C-terminal. Por esta acción, la  $\kappa$ -caseína pierde la región hidrofílica, que una vez hidrolizada se denomina caseinomacropéptido (CMP) (Skeie, 2007). Cuando esto ocurre, el CMP se difunde al suero y su influencia estabilizadora se pierde, generando que las fuerzas repulsivas entre las micelas sean menores, lo que posibilita su mayor proximidad. En simultáneo, y una vez que la concentración de micelas escindidas superó la concentración crítica de coagulación, es decir la mínima concentración de partículas para inducir la coagulación (Hsu & Liu, 1998), las micelas comienzan a agregarse. Esta agregación se produce a través de interacciones hidrofóbicas en presencia de calcio iónico que actúa entrecruzando las micelas ya escindidas a través de residuos de fosfato de serina, o simplemente por neutralización de carga (Kethireddipalli & Hill, 2015; Sandra et al., 2013). El fosfato de calcio coloidal es esencial para la coagulación, pero puede ser reemplazado por un aumento de iones calcio, por el agregado de  $\text{CaCl}_2$  (Fox, 2017). La red formada presenta estructura de gel y mantiene atrapados glóbulos de grasa, bacterias, y la fase acuosa, en la que se encuentran disueltas lactosa y minerales. El tiempo de coagulación es el resultado de estos dos procesos superpuestos: proteólisis y agregación. Esta red formada es irregular y los poros permiten el flujo de líquido en la matriz, por lo que comienza la fase de sinéresis. La misma se basa en la reorganización de la red, el gel se contrae por pérdida de líquido

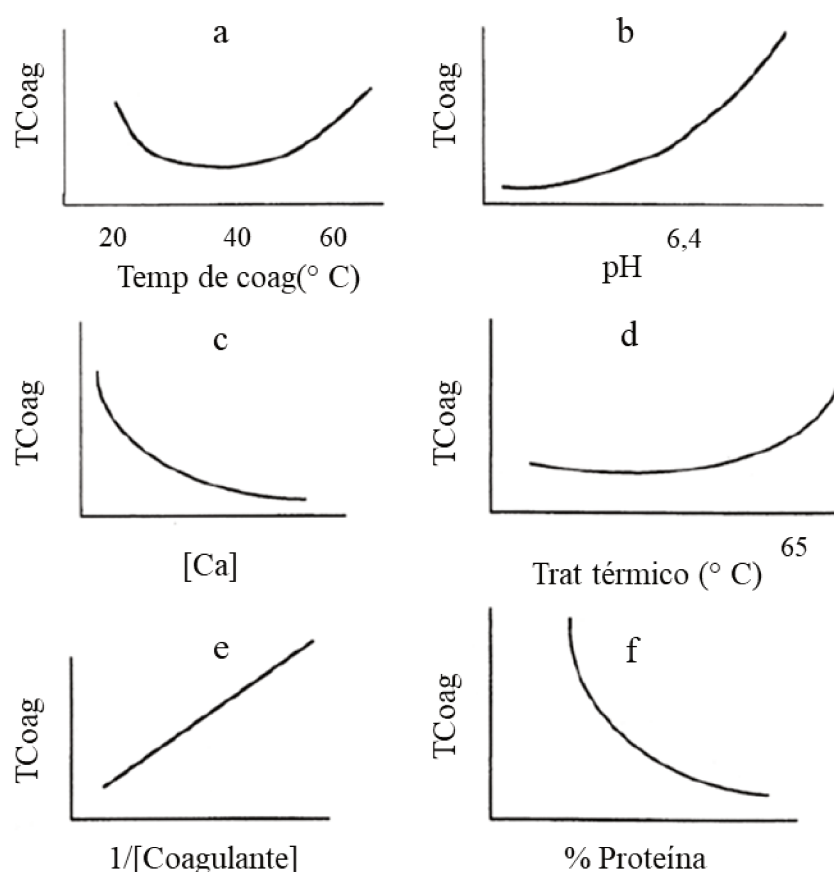
acompañado de fuertes aumentos en la viscosidad y en la firmeza (Fox, 2016; Skeie, 2007). En el momento del corte del gel, la reorganización y la contracción de las partículas de cuajada se aceleran, ya que la estructura se corta en pedazos y se debe hacer una nueva estructura dentro de cada partícula de cuajada. Esto da como resultado la separación de una parte de la fase acuosa, denominado suero de quesería y el endurecimiento de las partículas de la cuajada (Dejmek & Walstra, 2004; Fox et al., 2004; Horne & Banks, 2004; Walstra et al., 2005). El tiempo de corte y la firmeza de la cuajada dependen de la velocidad de reorganización y contracción de las partículas como de la velocidad de sinéresis. Durante la elaboración del queso, como se ha mencionado anteriormente, las bacterias lácticas adicionadas fermentan la lactosa a ácido láctico, provocando una reducción del pH, lo que incrementa la actividad del coagulante y la sinéresis del coágulo formado. Además, la disminución del pH provoca la pérdida de fosfato de calcio coloidal desde las micelas de caseína al suero de la leche, ya que se altera el equilibrio salino. Esto conduce a que los enlaces entre moléculas de caseína sean más débiles generando una estructura más abierta dentro de las micelas de caseína, y permite que la enzima coagulante pueda comenzar su acción sobre las otras caseínas, especialmente la caseína  $\alpha_{S1}$  (Skeie, 2007), como se mencionó en el apartado de proteólisis.

Las propiedades reológicas y el rendimiento quesero están también fuertemente influenciadas por el proceso de coagulación. Una cuajada más firme retiene mejor los componentes de la leche, aumentando el rendimiento quesero y, por lo tanto, la rentabilidad de la producción (Hovjecki et al., 2022), hasta cierto punto que una vez superado puede traer inconvenientes (por ejemplo, pérdida de materia grasa en el suero).

### **4.3. Factores que afectan los parámetros de coagulación de la leche**

Los factores que afectan la coagulación de leche de vaca han sido ampliamente estudiados (Lomholt & Qvist, 1999; Lucey, 2002; Nájera et al., 2003; Panthi et al., 2019). En la Figura 6 se puede observar la influencia de algunos de estos factores y el nivel de influencia en la fase de escisión y en la fase de agregación. Una leche presenta una buena aptitud para la coagulación cuando coagula rápidamente en presencia de la enzima coagulante y forma un coágulo firme y desuera con facilidad generando una cuajada de textura y composición adecuadas que, tras la maduración, da lugar a un queso de buena calidad (Fox et al., 2017).

Factor	Fase de escisión	Fase de agregación	Gráfico
Temperatura de coagulación	+	++	A
pH	+++	-	B
Concentración de calcio	-	+++	C
Pretratamiento térmico de la leche	++	++++	D
Concentración de la enzima coagulante	++++	-	E
Concentración proteica	+	++++	F



**Figura 6.** Efectos de algunos factores sobre el tiempo de coagulación de la leche. Figura modificada de Fox et al., 2016.

**Concentración de la enzima coagulante:** La primera fase de la coagulación es una reacción enzimática de primer orden cuya velocidad depende de la concentración de la enzima (Upreti et al., 2011). Un aumento en la cantidad de enzima añadida a la leche acelera tanto la coagulación como el endurecimiento de la cuajada (Bencini, 2002; Hovjecki et al., 2022; Nájera et al., 2003). Por otro lado, es importante tener en cuenta que la cantidad de enzima coagulante que se retiene en la cuajada es proporcional a la cantidad que se añade a la leche, impactando directamente en la proteólisis durante la maduración (Fox et al., 2017).

**Temperatura de coagulación:** La coagulación de la leche muestra una alta dependencia de la temperatura y el efecto de la temperatura depende del tipo de enzima (Fox et al., 2017). Se sabe que la temperatura afecta tanto a la fase enzimática como a la de agregación, siendo esta última la mayormente afectada. Al aumentar la temperatura, la agregación se produce a un nivel más bajo de hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína (Uniacke-Lowe & Fox, 2017), disminuye el tiempo de coagulación hasta un mínimo entre 40 y 45 °C y luego vuelve a aumentar por desnaturalización de la enzima (Fox et al., 2017). Panthi et al. (2019) encontraron que al disminuir la temperatura, el tiempo de coagulación aumentó y la cuajada formada fue más débil, y que a una temperatura más alta aumentó la fuerza de la cuajada. Estos investigadores también determinaron que la formación de una cuajada más firme a una menor temperatura se puede alcanzar con un aumento en la concentración proteica.

**Tratamiento térmico aplicado a la leche:** Las caseínas son estables al tratamiento térmico de la leche, mientras que las proteínas de suero se desnaturalizan. Esta desnaturalización provoca un aumento en la cantidad de grupos sulfhidrilos libres con potencial de formar interacciones proteína-proteína y generar uniones en la superficie de la micela de caseína (Anema & Li, 2003, Taterka & Castillo, 2015). Estas interacciones pueden generar efectos positivos como negativos ya que al estar desnaturalizadas pueden incorporarse a la cuajada incrementando el rendimiento quesero, mientras que también debido a su interacción con la  $\kappa$ -caseína, afecta tanto la fase primaria de la coagulación como la de agregación (Taterka et al., 2022). En general, el tiempo de coagulación se alarga y la cuajada es más débil, generando quesos de textura y de sabor diferentes a los tradicionales (Singh & Waungana, 2001). Una temperatura  $>72$  °C afecta en forma negativa la coagulación y si este tratamiento es más severo ( $>90$  °C durante 10 min), la leche no coagula por adición de la enzima. Además, esta interacción está afectada por el pH de la leche. Kethireddipalli et al. (2010) encontraron que el nivel máximo de unión de la proteína de suero de leche desnaturalizada térmicamente a la superficie de la micela de caseína ocurre a pH  $\sim 6,3$ . La tasa de agregación de las micelas de caseína puede revertirse por acidificación (pH 6,0-6,6), por adición de  $\text{CaCl}_2$  (Fox et al., 2017) o por concentración de la leche por UF. Waungana et al. (1998) estudiaron el efecto de un tratamiento térmico alto (140 °C - 4 s) antes y después de la concentración mediante UF y encontraron un aumento en el tiempo de coagulación y una disminución en la fuerza del gel para las leches que fueron tratadas térmicamente antes del proceso por membranas. Es posible que las interacciones entre la de  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\kappa$ -caseína sean distintas, como también los equilibrios de los minerales dependiendo cuándo se realiza el tratamiento térmico.

**Nivel proteico:** El aumento en el nivel proteico de la leche puede darse por agregado de polvos lácteos (leche en polvo, proteínas de suero microparticuladas, caseinato de calcio, entre otros) o por la eliminación de agua (por evaporación o por el tratamiento mediante membranas). Algunas

de estas estrategias permiten incrementar el nivel proteico total, mientras que otras pueden aumentar particularmente las caseínas o las proteínas de suero. En el caso de la MF, se reduce la cantidad de proteínas de suero en la leche, aunque las de mayor masa molecular pueden quedar retenidas (Jost et al., 1999) e inhibir la actividad de la quimosina en la tina (Neocleous et al., 2002). Para el fenómeno de coagulación, interesa la relación coagulante/caseína ya que, como se ha mencionado anteriormente, esta etapa conlleva tanto la hidrólisis de la k-caseína como la agregación de las micelas modificadas. El tiempo de coagulación de la leche disminuye con el contenido de proteína (2,0 a 3,0 % p/p) y aumenta con un mayor nivel (> 3,0 % p/p), cuando se adiciona el coagulante por volumen; mientras que cuando se agrega por unidad de proteína, disminuye al aumentar la concentración de caseína (Fox et al., 2017). Sandra et al. (2011) reportaron que la concentración de la leche mediante UF no afectó la etapa primaria de coagulación cuando se utilizó una dosis de coagulante por volumen obteniendo tiempos de coagulación similares para las leches concentradas 3 y 5 veces, mientras que la firmeza de la cuajada sí fue mayor para estas últimas, lo que fue atribuido a la mayor proximidad entre las micelas. A elevada concentración, el tiempo de coagulación viene determinado por la velocidad de acción de la enzima y la firmeza de la cuajada es mayor por el aumento de sólidos totales en la cuajada. Daviau et al. (2000) informaron que en la leche concentrada (mayor cantidad de sólidos totales) la paracaseína retiene una menor cantidad de humedad, los granos de cuajada son menos amorfos y por ello es más firme. En estos casos los canales de drenaje del suero están más abiertos permitiendo su drenaje y favoreciendo la firmeza de la cuajada; por el contrario, un coágulo más blando, tendrá los canales estrechos y el flujo de drenaje será menor.

**pH de la leche:** El pH óptimo de acción del coagulante en la leche es ~6,0 a 4 a 30 °C (Fox et al., 2017). Existen múltiples factores que influyen en el pH final de la leche, y por ende en las propiedades de coagulación, entre los cuales se pueden mencionar: cantidad y tipo de cultivo iniciador utilizado, adición de CaCl<sub>2</sub>, ajuste del pH mediante el agregado de ácidos o acidógenos, pH de la propia leche según el estado de salud del animal o la etapa de lactancia (Fox et al., 2017). Algunos de los efectos más importantes de la reducción del pH de la leche son la disolución del fosfato de calcio micelar, la reducción de la carga neta de la caseína y la disociación de algunas caseínas de las micelas (Horne et al., 2020; Schiffer et al., 2021). Como consecuencia de estos efectos, cambian las propiedades de coagulación. En este sentido, se ha informado que la disminución del pH (6,4 a 6,0) condujo a una reducción del tiempo de coagulación, un aumento de la firmeza de la cuajada y de la sinéresis (Daviau et al., 2000). Por el contrario, el pH de la leche mastítica es superior al fisiológico, y se acerca al pH de la sangre (~7,4) debido a la mayor permeabilidad del tejido provocada por esta patología. Junto con otros factores asociados –menor contenido de caseínas, alto recuento de células somáticas y actividad proteolítica incrementada–

este cambio conlleva un tiempo de coagulación más prolongado que el de la leche de animales sanos (Fox et al., 2017).

**Concentración de calcio:** La concentración total del calcio en la leche a pH normal es ~1200 mg/L, de los cuales 400 mg/L se encuentra soluble y el resto en forma insoluble (Masotti et al., 2020). La distribución y el equilibrio del calcio se ven afectados por parámetros como el pH o la temperatura, alterando las características de procesamiento de la leche (Guggisberg et al., 2022). Por ejemplo, cuando la leche es almacenada a 4 °C, el fosfato de calcio coloidal se libera de las micelas junto con la  $\beta$ -caseína, debido a la reducción de las interacciones hidrofóbicas. Estos cambios son reversibles una vez que la leche se vuelve a calentar (Downey & Murphy, 1970; Pierre & Brule, 1981). Por otro lado, el tratamiento térmico extensivo (>90 °C durante varios minutos) da como resultado una transferencia del calcio soluble a la fase coloidal y una disminución concomitante del pH de la leche (Pouliot et al., 1989). Particularmente, para la formación de la red de micelas de caseína modificadas por la acción de la enzima coagulante, la presencia de iones calcio en cantidad suficiente es indispensable para su formación, ya que las uniones se dan mediante el fosfato de calcio coloidal que está unido a los residuos de serina fosforilados de la caseína (Gaucheron, 2005). Las leches pobres en calcio coagulan difícilmente y dan lugar a geles blandos, sin firmeza. Es una práctica común en tecnología quesera la adición de  $\text{CaCl}_2$  a la leche, sobre todo cuando esta ha sido pasteurizada. Este agregado de calcio a la leche de elaboración (0,02 % p/v) provoca un aumento en la concentración de calcio soluble y de fosfato de calcio coloidal y trae aparejado una disminución del pH de la leche en ~0,05–0,1 unidades, dependiendo del nivel de proteína. A su vez, mejora las propiedades de coagulación (reduce el tiempo de coagulación y aumenta la firmeza de la cuajada), aunque al agregar calcio en mayor proporción, la firmeza de la cuajada se estabiliza y disminuye cuando la concentración de calcio  $\geq 0,1$  % p/v. A su vez, la disminución del tiempo de corte cuando el calcio está en mayor nivel puede deberse a la interacción de estos iones en exceso con los grupos carboxilo cargados negativamente de la paracaseína, aumentando la carga positiva de la caseína, haciéndola menos propensa a la agregación (Fox et al., 2017).

Los diferentes parámetros mencionados influyen en las propiedades de coagulación de la leche que afectan directamente el rendimiento y la calidad de los quesos (Pretto et al., 2011) tanto a nivel de laboratorio como industrial (Troch et al., 2017). Por lo tanto, son relevantes para las industrias queseras, especialmente en países como el nuestro donde se destinan grandes cantidades de leche a la producción de quesos.

#### **4.4. Rendimiento quesero**

El rendimiento quesero es importante ya que es un índice que representa la eficiencia del proceso (cantidad de queso obtenido a partir de una determinada cantidad de leche). También es

interesante para evaluar la utilidad de nuevos desarrollos tecnológicos a pequeña escala. Generalmente el rendimiento quesero se expresa como "kg de queso por 100 kg de leche". Sin embargo, uno de los factores más importante que afecta el rendimiento del queso es la composición de la leche, particularmente las concentraciones de grasa y caseína; este aumenta linealmente con las concentraciones de grasa y caseína en la leche bovina, siendo el grado de aumento con la caseína mayor que con la grasa. Por este motivo, la expresión de rendimiento quesero no permite comparar elaboraciones de quesos a partir de leches de distinta composición (Fox et al., 2017). En este caso, se suele calcular un rendimiento ajustado teniendo en cuenta los niveles de materia grasa y proteína de la leche experimental y la leche control facilitando una comparación significativa de los rendimientos de una variedad de queso dada de diferentes industrias y de diferentes etapas de la temporada de elaboración del queso (donde la composición de la leche cambia estacionalmente), como también para comparar quesos obtenidos con leches concentradas y sin concentrar (Guinee et al., 2006).

Diferentes estrategias se pueden utilizar para incrementar el rendimiento quesero, entre las que se encuentran el aumento de sólidos de la leche de elaboración, disminución de pérdidas en el suero mediante mejoras en la coagulación y manejo de la cuajada, incremento de la retención de proteínas de suero en la cuajada, mayor retención de agua, uso de coagulantes más específicos y menos proteolíticos, entre otros (Farkye, 2004). El agregado de polvos lácteos o la concentración de la leche mediante filtración por membranas (UF) son algunas de las estrategias que pueden incrementar el rendimiento quesero. Es importante tener en cuenta que la diferente composición de estas leches concentradas conduce a cambios en la coagulación, por lo que el proceso se debe ajustar para obtener quesos de buena calidad y asegurar un incremento del rendimiento.

**Ultrafiltración.** El uso de la ultrafiltración (UF) en la elaboración de queso se ha perfeccionado desde que Maubois et al. (1971) introdujeron la técnica. Al concentrar la leche indefectiblemente aumenta la capacidad de producción de las plantas queseras y el rendimiento del queso. Como ya fue explicado anteriormente, durante la ultrafiltración, solo el nitrógeno no proteico atraviesa la membrana (alrededor del 5% de las sustancias nitrogenadas de la leche), mientras que todas las proteínas de la leche, ya sean caseínas o proteínas solubles, permanecen en el retenido y gran cantidad finalmente en el queso, ya que la sinéresis en la elaboración de quesos a partir de leche concentrada disminuye por lo que quedan atrapadas en la cuajada (Mistry & Maubois, 1993).

**Polvos Lácteos.** El agregado de polvos lácteos puede ser una buena estrategia para incrementar el rendimiento por su aporte de proteínas y grasa. Sin embargo, estos polvos pueden aportar otros compuestos, como la lactosa, que puede traer problemas en la maduración, ya que la misma puede ser utilizada como fuente de energía por microorganismos alterantes. Por otro lado, las propiedades de coagulación pueden ser afectadas negativamente dependiendo el tratamiento térmico utilizado en la obtención de los polvos adicionados. Uno de los polvos lácteos más

utilizados es leche en polvo descremada (LPD), la cual se clasifica de acuerdo al tratamiento térmico aplicado antes de la evaporación y el secado como de temperatura baja, media o alta (Martin et al., 2007). Los tratamientos térmicos típicos son de 70 a 72 °C durante 15 s para LPD de bajo tratamiento y de 120 °C durante 60 a 120 s, o 90 °C durante 300 s para LPD de alto tratamiento térmico (Kelly et al., 2003). Esta última se utiliza como ingrediente en productos de panadería, leche condensada, entre otros (Aitken et al., 1999; Stewart et al., 2017); mientras que la de bajo tratamiento se puede usar en la elaboración de queso para estandarizar los sólidos lácteos (Patel et al., 2007). Lin et al. (2018) investigaron los cambios en las características fisicoquímicas y de procesamiento de la leche de bajo y alto tratamiento térmico y encontraron que esta última tenía niveles más altos de desnaturalización de las proteínas de suero, y un marcado deterioro de la aptitud a la coagulación. Brito et al. (2000) estudiaron el rendimiento quesero de queso Maribo con leche adicionada de LPD de medio tratamiento térmico y observaron que al aumentar los sólidos totales no grasos de la leche, el rendimiento del queso aumentó proporcionalmente. Por otro lado, para la producción de quesos reducidos en materia grasa, se utilizan proteínas de suero microparticuladas como sustituto de grasa. Este polvo se obtiene por desnaturalización mediante tratamiento térmico y mecánico en condiciones ácidas moderadas, para obtener partículas con un tamaño entre 0,5 µm y 3,0 µm, rango similar al de los glóbulos grasos (Ipsen, 2017; Liu et al., 2016). La composición depende del producto utilizado, por ejemplo el producto Dairy-Lo contiene ~35 % p/p de proteína (Aryana & Haque, 2001; Zalazar et al., 2002), mientras que Simplese D100 tiene ~53 % p/p de proteína (Romeih et al., 2002; Schenkel et al., 2013). Estas micropartículas son solubles en agua y contribuyen a inmovilizar y estructurar la fase de humedad en el queso al atrapar mecánicamente el agua, impartiendo una sensación de lubricidad y cremosidad (Ipsen, 2017; Romeih et al., 2002). Además de aportar al aumento proteico de la leche y por consiguiente al rendimiento quesero, el mayor nivel de proteínas de suero también tiene un efecto positivo sobre el valor nutricional del queso (Hinrichs, 2001).



## Objetivos

---

### **Objetivo general**

Incorporar tecnologías de membrana y fermentos adjuntos para mejorar la calidad de quesos argentinos.

### **Objetivos específicos**

- Evaluar la microfiltración mediante un filtro bolsa con tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$  como estrategia para eliminar la presencia de núcleos capilares en la leche y así inhibir la formación de ojos en quesos.
- Evaluar la influencia de cepas autóctonas de lactobacilos mesófilos (origen NSLAB) en la maduración de quesos y su contribución para evitar la aparición del defecto de formación indeseable de ojos
- Evaluar el impacto de la concentración de la leche de quesería mediante ultrafiltración o adición de polvos lácteos (leche en polvo descremada y proteínas de suero microparticuladas), en las propiedades de coagulación y rendimiento quesero.
- Determinar el impacto del uso de leche concentrada por UF y agregado de polvos lácteos en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso a escala laboratorio.
- Determinar el impacto del uso de leche enriquecida con Leche en Polvo Descremada (LPD) y la utilización de fermentos adjuntos en la elaboración, perfiles de maduración y propiedades sensoriales de queso Cremoso.

---

Evaluación de un método de microfiltración accesible para  
prevenir la formación de ojos en los quesos

## 1. Introducción

En nuestro país, la formación indeseable de ojos es uno de los defectos más frecuentes en quesos blandos y semiduros que deben presentar una masa compacta y cerrada (Quiberoni et al. 2008). Este defecto aparece alrededor de la segunda o tercera semana de maduración y puede afectar negativamente a los quesos incluso después de su salida al mercado. Los ojos no deseados en este tipo de quesos se atribuyen generalmente a la presencia de microorganismos adventicios (NSLAB), generalmente cepas de leuconostoc y lactobacilos heterofermentantes, que pueden producir gas (CO<sub>2</sub>) a partir de la fermentación de lactosa, galactosa y/o de citrato (Giménez et al. 2021; Porcellato et al. 2015; Quiberoni et al. 2008). La presencia de sustratos fermentables y microorganismos con capacidad de producir CO<sub>2</sub>, junto con condiciones ambientales favorables para la expresión de las actividades enzimáticas involucradas, son condiciones necesarias para la producción de gas (Porcellato et al., 2015). Los quesos con este defecto, incluso si no comprometen la seguridad, son rechazados por los consumidores, por lo que son comercializados a un precio menor o se reprocesan en queso fundido, provocando graves pérdidas económicas.

Por otro lado, la formación de ojos es un rasgo particular de muchas variedades de queso como los quesos tipo suizos, caracterizados por ojos típicos causados por la fermentación propiónica, o quesos holandeses, en los que son frecuentes pequeños ojos debido a la producción de gas por bacterias lácticas heterofermentantes. En estos casos, el número, el tamaño y la distribución de los ojos son parámetros de calidad fundamentales, para cuyo análisis se dispone de diversas técnicas (Düsterhoft et al., 2011; Guggisberg et al., 2015; Huc et al., 2014; O'Sullivan et al., 2016; Porcellato et al., 2015).

### 1.1. Evaluación de la formación de ojos por un método no destructivo

En los quesos tipo suizo, las bacterias propiónicas incorporadas en el fermento de quesería metabolizan el lactato y producen CO<sub>2</sub> que da lugar a la formación de ojos característicos, además de ácido propiónico y otros compuestos que influyen en el flavor (Bachmann et al., 2011). La elaboración y maduración de este tipo de queso es una de las más complejas ya que una gran cantidad de parámetros deben ser estrictamente controlados para obtener una textura adecuada que permita, entre otros factores, una buena formación de ojos, sin el desarrollo de defectos (Furtado, 2008; Polychroniadou et al., 2001). De esta manera, es indispensable el control de su producción y evolución durante la maduración. Sin embargo, una vez que la cuajada se moldea es imposible examinar directamente lo que sucede dentro de la horma del queso. El control de este proceso se realiza tradicionalmente escuchando el sonido producido cuando se golpea suavemente la superficie del queso con un martillo especial o inspeccionando visualmente la masa del mismo luego del corte o muestreo de la horma; estas metodologías son imprecisas y no cuantitativas, dependen de la experiencia del evaluador y, además, las últimas implican la destrucción del queso (Guggisberg et al., 2015).

En los últimos años, varias metodologías no destructivas, tales como la tomografía computada de rayos X (TC), se han empleado con dicho propósito (Huc et al., 2014; Guggisberg et al., 2013). Los rayos X son radiaciones electromagnéticas cuya longitud de onda es del orden del Angstrøms ( $10^{-10}$  m) (Suetens, 2017a). Esta radiación genera un mapa tridimensional del coeficiente de absorción de la muestra, es decir, de la atenuación de los fotones debido a la interacción de los mismos con la materia, por lo que depende de la energía de los fotones y de los elementos que componen la muestra (número atómico) (Suetens, 2017b). Esta interacción (radiación-muestra) es registrada por los detectores a través de la radiación transmitida luego de atravesar la muestra, obteniéndose una serie de imágenes radiográficas consecutivas, que son planos que representan la distribución del coeficiente de absorción de la muestra en cada posición (visualizada por la intensidad del tono de gris) (Suetens, 2017b). Los datos adquiridos en la medición se recopilan en múltiples direcciones, lo que permite hacer una reconstrucción tomográfica para obtener un modelo 3D virtual (Goy et al., 2014). El proceso de construcción de este modelo (postprocesamiento) se inicia con la "segmentación". La segmentación es la acción de seleccionar y resaltar las estructuras individuales, en este caso los ojos y la masa del queso, en la serie de cortes tomográficos. Este proceso de reconstrucción es la etapa más laboriosa del análisis, ya que depende de la cantidad de cortes y del contraste entre las diferentes zonas. En el caso particular de los quesos, se tiene un buen contraste por las diferencias de densidad entre la masa y el aire, es por ello que se pueden cuantificar y evaluar los mismos sin necesidad de destruir la horma (Guggisberg et al., 2013). La manipulación de estos datos con software adecuados permite visualizar la distribución y morfología de los ojos y calcular determinados parámetros de los mismos como el tamaño, cantidad y volumen total (Schuetz et al., 2016); sin embargo, la exactitud de esta herramienta depende en gran medida del correcto procesamiento de las imágenes. En comparación con las radiografías convencionales, la TC permite una extracción precisa de la información de profundidad y distancia a lo largo de la línea de proyección y tiene como ventaja que el análisis puede automatizarse y la cantidad de información accesible excede el potencial de la radiografía (Schuetz et al., 2013). Si bien la aplicación de la TC está muy difundida como herramienta de diagnóstico en medicina, su uso en matrices alimenticias es más reciente y novedoso. Cabe resaltar que la energía suministrada por el tomógrafo de rayos X es mil veces más baja que la necesaria para inducir la mutación o muerte bacteriana, por lo que la aplicación de esta metodología en alimentos fermentados no tendría influencia en la microbiota presente (Huc et al., 2014).

## **1.2. Factores que influyen en la formación de ojos y su control: núcleos capilares y microfiltración de la leche**

La identificación de los factores que influyen en el proceso de formación de ojos ha sido abordada en varios trabajos (Huc et al., 2014; Rehn et al., 2011); se pueden mencionar: presencia

de microorganismos productores de gas y sustratos fermentables, condiciones ambientales favorables para la actividad metabólica gasógena, adecuada elasticidad de la masa de queso, y presencia de núcleos capilares para la difusión del gas producido (Guggisberg et al., 2015). En relación a esto, Guggisberg et al. (2015) han demostrado que la producción de CO<sub>2</sub> es una condición requerida pero no suficiente para el desarrollo de ojos en quesos y afirmaron que la presencia de micropartículas de material vegetal (alfalfa seca) en la leche para la elaboración de queso es fundamental para la correcta formación de ojos en el queso tipo suizo. Estas partículas con estructura capilar sirven como “núcleos” o “sitios” en los que el CO<sub>2</sub> se disocia del estado soluble y se acumula como gas en la masa del queso. En trabajos previos ya se había sugerido la importancia de la presencia de núcleos, como las burbujas de aire microscópicas atrapadas en la cuajada (Martley & Crow, 1996) y las micropartículas sólidas (Polychroniadou, 2001), para la formación de ojos. Del total de CO<sub>2</sub> producido en un queso tipo suizo, la mitad permanece soluble en la masa del queso, un gran porcentaje (33%) se pierde por la corteza y el resto (17%) podría formar ojos en la masa del queso (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2007). Algunos tratamientos aplicados a la leche de elaboración, como la bactofugación, la centrifugación o la microfiltración, reducen el número de ojos, apoyando la hipótesis de que se necesitan micropartículas para la formación de ojos, las cuales podrían ser total o parcialmente eliminadas por los tratamientos mencionados (Fröhlich-Wyder et al., 2017). En ausencia de estos núcleos, el CO<sub>2</sub> producido permanece disuelto o se pierde por difusión a través de la corteza. Guggisberg et al. (2015) utilizaron leche microfiltrada a través de membranas cerámicas de 1,4 µm de poro para elaborar quesos tipo suizo con y sin adición de micropartículas de material vegetal con estructura capilar (alfalfa seca) de tamaño <100 µm. En todos los quesos obtenidos se produjo la misma cantidad de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, solamente se formaron ojos en los quesos con agregado de micropartículas, en número y tamaño controlados por la cantidad de polvo de alfalfa añadido. Por el contrario, no se formaron ojos en los quesos con leche microfiltrada y sin adición de micropartículas. De esta manera, la microfiltración tangencial demostró ser una estrategia efectiva para eliminar todas las micropartículas adventicias presentes en la leche de elaboración y controlar de esta manera la formación de ojos.

La prevención del desarrollo indeseable de los ojos en algunas variedades de queso es un tema interesante tanto para la industria como para los investigadores de nuestro instituto. Para ello, diferentes estrategias han sido evaluadas dirigidas principalmente al control del desarrollo de microorganismos indeseables (Giménez et al., 2021). El control de la presencia de micropartículas que podrían actuar como núcleo de ojos, según lo demostrado por Guggisberg et al. (2015), podría ser una alternativa adecuada. Sin embargo, las membranas cerámicas y poliméricas de 1,4 µm de diámetro de poro no son comunes en nuestro país. Además, la microfiltración tangencial es demasiado costosa para que los pequeños y medianos productores de queso la introduzcan en su

proceso de elaboración de queso para evitar el defecto de formación indeseada de ojos. El objetivo de este trabajo fue evaluar otro método de microfiltración más económico y fácilmente adaptable para pequeñas y medianas industrias queseras, la microfiltración a través de un filtro bolsa con tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$ , para eliminar las micropartículas que podrían actuar como núcleo de ojos y de esta manera inhibir la formación de ojos en quesos que deben presentar una masa cerrada. Para ello se utilizó leche microfiltrada para la elaboración de quesos tipo suizo con (queso experimental) y sin (queso control) adición de polvo de alfalfa. Las bacterias propiónicas se utilizaron como microorganismos productores de gas en todos los quesos, mientras que las micropartículas de alfalfa se agregaron para que actúen como núcleos capilares y promuevan la formación de ojos en los quesos experimentales. La microfiltración a través de un filtro bolsa con tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$  es una tecnología de bajo costo que se utiliza para eliminar impurezas de diferentes líquidos en diversas industrias. Sin embargo, el rendimiento de este sistema para eliminar micropartículas naturales (que podrían actuar como núcleos de ojos) en la leche de elaboración para evitar la formación de ojos indeseables en algunas variedades de queso no ha sido estudiada previamente.

## **2. Objetivos**

- Evaluar la microfiltración mediante un filtro bolsa con tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$  como estrategia para eliminar la presencia de núcleos capilares en la leche y así inhibir la formación de ojos en quesos.
- Implementar la tomografía computada como metodología no destructiva para el análisis de ojos y aberturas en quesos.

## **3. Materiales y Métodos**

### **3.1. Puesta a punto del protocolo de elaboración y de la metodología de análisis de ojos de queso tipo suizo**

En una primera etapa se llevaron adelante elaboraciones con el fin de establecer un protocolo de elaboración de quesos tipo suizo (quesos de pasta semidura con adición de bacterias propiónicas capaces de producir  $\text{CO}_2$ ). Asimismo, se evaluó la tomografía computada como metodología no destructiva para el análisis de ojos en estos quesos.

#### **3.1.1. Elaboración de quesos modelo para validación del análisis cuantitativo de ojos en quesos por TC**

Para validar el método tomográfico para la determinación cuantitativa del volumen de ojos, se elaboraron quesos modelo miniatura con la incorporación de esferas de vidrio para simular la presencia de ojos en la masa. Siete quesos (diámetro: 13 cm - alto: 8 cm) de pasta semidura fueron elaborados en la planta piloto del INLAIN (Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional

del Litoral, Santa Fe) a partir de leche pasteurizada (63 °C - 30 min). Estos quesos fueron elaborados sin la adición de bacterias propiónicas con el objetivo de que no exista un desarrollo espontáneo de ojos. Durante el moldeo se incorporaron a cada queso distintas cantidades de esferas de vidrio ( $\varnothing=16$  mm), las cuales aportaron un volumen conocido (teórico), calculado previamente a partir de su peso y densidad (2,404 g/mL). Los quesos se maduraron a 12 °C durante 15 días y luego se analizaron mediante tomografía computada (TC) de rayos X. A partir de las imágenes obtenidas, se calculó el volumen total de las esferas incorporadas a cada queso, y se correlacionó con el volumen conocido de las mismas. Para determinar el volumen de las esferas que fueron colocadas en la masa del queso se realizaron repetidas mediciones del diámetro de las mismas empleando un calibre y se calculó el promedio mediante la fórmula del volumen de una esfera, estimando un volumen general para todas las esferas utilizadas. Este valor obtenido lo denominamos “volumen teórico”.

### 3.2. Elaboración de quesos tipo suizo

Dos quesos tipo suizo (1 y 2) fueron elaborados en la planta piloto del INLAIN a partir de 85 L de leche suministrada por Milkaut S.A (Franck, Santa Fe, Argentina). En primer lugar, la leche fue estandarizada a una relación de materia grasa/proteína de 0,92. Para ello, una porción de leche fue descremada (Alfa Laval Separador Co., Tumba, Suecia) y adicionada al pool total para alcanzar la relación requerida. Luego de la pasteurización (63 °C - 30 min), la leche se enfrió a 37 °C y se le adicionó cloruro de calcio (Merck, Darmstadt, Germany) a un nivel de 0,02 % p/v. Se utilizaron los siguientes cultivos: *Streptococcus thermophilus* ST1, *Lactobacillus helveticus* B02 y *Propionibacterium freudenreichii* PS4 (Chr. Hansen, Argentina). La leche de elaboración del queso 1 y 2 fue inoculada con los siguientes niveles de los fermentos *S. thermophilus* y *P. freudenreichii*:  $6 \times 10^5$  y  $10^6$  UFC/mL de leche, respectivamente. La dosis del fermento de *L. helveticus* utilizada en el queso 1 fue de  $7,8 \times 10^4$  UFC/mL y para el queso 2 de  $2,6 \times 10^4$  (0,5 órdenes logarítmicos menor que en el queso 1). Antes de su incorporación a la leche, los fermentos se dispersaron en 50 mL de leche pasteurizada e incubaron a 37 °C durante 10 min. Pasado ese tiempo fueron añadidos a cada tina. Luego de 20 min se adicionó el coagulante (Chymax, Chr. Hansen, Argentina, 74 IMCU/mL) en una dosis de 30 IMCU/L, previamente dispersado en 25 mL de agua destilada. Cuando la cuajada alcanzó la firmeza apropiada se cortó en etapas sucesivas (con agitación manual entre cada etapa) hasta lograr un tamaño aproximado de 5 mm<sup>3</sup>. Se realizó un lavado de la cuajada reemplazando 20% del volumen de suero por un mismo volumen de agua a 40 °C, y una posterior etapa de calentamiento del grano bajo agitación hasta 47 °C a razón de 1 °C/min. Pasado este tiempo, la cuajada se retiró con tela, se separó del suero y se colocó en los moldes (Figura 7), que fueron apilados y prensados durante 5 h (0,2 – 0,3 Kg/cm<sup>2</sup>) hasta llegar a pH 5,3. Las hormas se llevaron a cámara fría (12 °C) durante 12 h con el objetivo de orearlas y posteriormente se colocaron en salmuera (20 % p/v, pH 5,4, 10 °C) durante 10 h. Los quesos (25



cm de diámetro, 6 kg), antes de su ingreso a cámara caliente, fueron tratados superficialmente con una pintura especial para quesos que contiene natamicina 0,04% para evitar el desarrollo de hongos. Los mismos se maduraron en tres etapas: 10 días a 12 °C, 23 días en cámara caliente (22-24 °C) hasta alcanzar el nivel de hinchazón adecuado que refleja la producción de gas por las bacterias propiónicas y por último cámara fría (12 °C) hasta los 60 días de maduración. En la Figura 8 se pueden observar los quesos al final de la maduración.



**Figura 7.** Moldeo de las hormas de quesos tipo suizo elaborados en la planta piloto del INLAIN.



**Figura 8.** Hormas de quesos tipo suizo en el período final de maduración.

El proceso de formación de ojos se evaluó mediante un seguimiento tomográfico en tres momentos durante el período de maduración: antes del ingreso a la cámara caliente (10 días), luego de la salida de la cámara caliente (33 días) y al final de la maduración (60 días). A los 60 días, luego del análisis por TC, los quesos fueron muestreados según ISO 707|IDF 50 (2008a) para posteriormente analizar pH, composición global y nivel de ácidos orgánicos y azúcares.

### **3.3. Evaluación de la microfiltración de la leche de quesería para prevenir la formación de ojos en quesos**

Una vez establecido el protocolo de elaboración y validada la metodología de TC, se realizaron elaboraciones de quesos con el objetivo de evaluar la eficiencia de la microfiltración, a través de un filtro bolsa de 1  $\mu\text{m}$ , para eliminar las micropartículas de la leche de elaboración y así prevenir la formación de ojos indeseables.

#### **3.3.1. Preparación del material microparticulado**

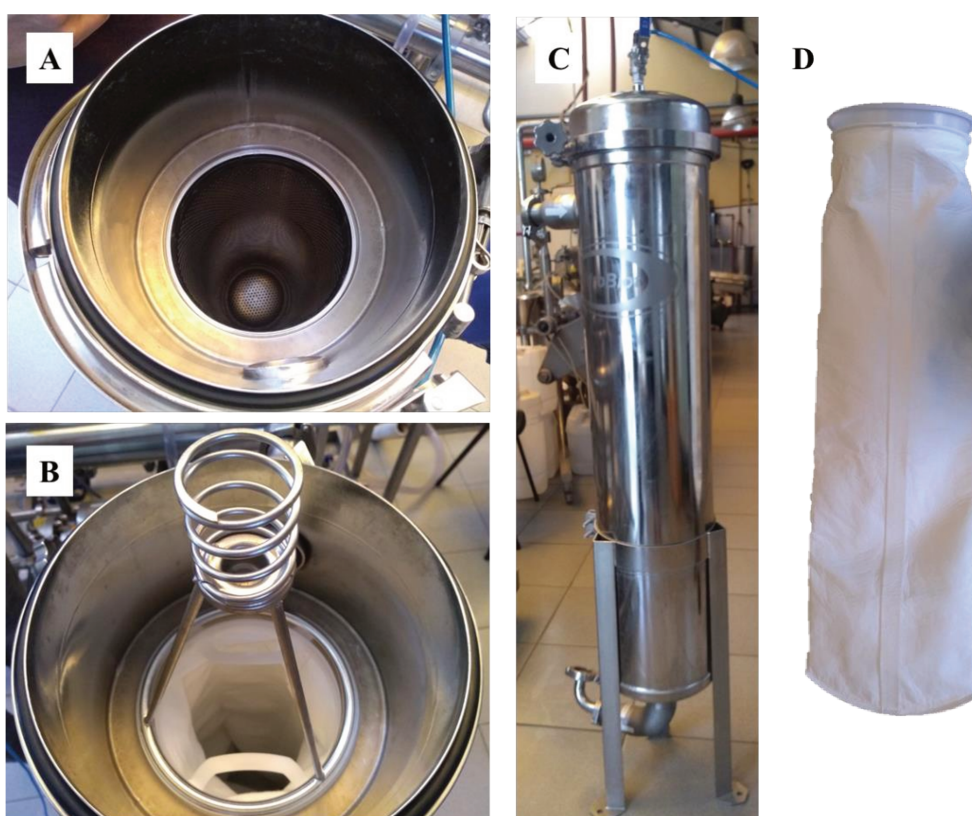
Las micropartículas destinadas a ser utilizadas como posibles núcleos para la apertura de ojos se preparó según Guggisberg et al. (2015) con algunas modificaciones: las hojas y tallos de alfalfa fueron cosechadas en San Cristóbal (Santa Fe, Argentina), se lavaron y secaron a temperatura

ambiente y luego se secaron en estufa con circulación de aire a 50 °C. El tejido vegetal seco se trituró en un procesador de alimentos y el material se separó mediante tamices para obtener un polvo que contenía partículas menores de 100 µm.

### 3.4. Elaboración de quesos con leche microfiltrada con y sin agregado de material microparticulado

Para la elaboración de estos quesos se siguió el protocolo de quesos tipo suizo descrito anteriormente (sección 3.2) con algunas modificaciones.

La leche, con una relación grasa/proteína de 0,90-0,92, se calentó y se microfiltró a 40 °C. El equipo de microfiltración (Figura 9) consistió en un filtro bolsa de poliéster (17'' x 32'') insertada dentro de una carcasa de acero inoxidable HBT-FB07 (HBT®, Santo Tomé, Argentina).



**Figura 9.** Equipo de microfiltración. A. Vista superior de la carcasa de acero inoxidable. B. Vista superior de la carcasa con el filtro bolsa adentro. C. Carcasa del equipo. D. Filtro bolsa de poliéster de 1 µm.

El filtro bolsa tiene un tamaño de poro de 1 µm y contiene un anillo de sellado de plástico. La leche se microfiltró a un caudal de 50 L/min. La presión de operación fue de 7 kg/cm<sup>2</sup> y el tiempo total de filtración para 200 L de leche fue de 4 min. La composición de la leche no fue modificada por la filtración. Luego de la microfiltración, la leche se pasteurizó a 63 °C durante 30 min. Paralelamente se elaboraron dos tipos de queso (control y experimental); la elaboración de los quesos se realizó por triplicado en diferentes días con distinta leche. La dosis de fermento para el queso control y experimental fue la misma que la utilizada en la elaboración del queso 2 de la

sección anterior. A la tina de queso experimental se le agregó alfalfa en polvo (4 mg), previamente resuspendida en 5 mL de agua junto con el agregado de los fermentos. La elaboración y maduración de los quesos obtenidos fue de la misma manera que la descrita en la sección 3.2.

Al final de la maduración (60 días) se determinó el pH, composición global, y el volumen de ojos de los quesos. El nivel de ácidos orgánicos y azúcares, y el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6) se determinaron a los 12 y 60 días de maduración. El muestreo de los quesos para los análisis químicos se realizó según ISO 707|IDF 50 (2008b).

### **3.5. Determinaciones analíticas**

#### **3.5.1. Evaluación de la estructura del material vegetal particulado**

La estructura de las micropartículas del polvo de alfalfa se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por su sigla en inglés Scanning Electron Microscope), la cual se llevó a cabo en un microscopio Phenom World ProX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). Las fotos se tomaron en el modo normal, después de la preparación de la muestra con un dispositivo de pulverización de plasma de argón (oro).

#### **3.5.2. Determinación del pH de los quesos**

El pH de los quesos durante la elaboración se determinó por contacto directo del electrodo de un peachímetro portátil (Hanna, Hanna Instruments, EEUU) con la muestra de queso en varios sectores de la masa del mismo. Al finalizar la maduración (60 días) el pH de los quesos se determinó por duplicado mediante el método de la American Public Health Association (APHA) (Bradley et al., 1992). Para ello, se utilizó un peachímetro Orion (Orion Research Incorporated, Estados Unidos), provisto de un electrodo combinado (vidrio y calomel), que se calibró con soluciones tamponadas de pH 4 y 7. La determinación se realizó por inmersión del electrodo en una mezcla de queso en agua destilada (1:1), y el valor se registró cuando la lectura se estabilizó en un valor constante.

#### **3.5.3. Análisis de la composición global de los quesos**

La composición global de los quesos se determinó por duplicado en el tiempo final de maduración (60 días), empleando los métodos normalizados de la Organización Internacional de Normalización - Federación Internacional de Lechería (ISO-IDF).

**Humedad.** La determinación del contenido de humedad en los quesos se realizó por secado de la muestra a  $102 \pm 1^\circ\text{C}$  hasta pesada constante según ISO 5534|IDF 004 (2004). Para ello, se utilizó un sistema de cristizador y varilla de vidrio, al cual se agregaron aproximadamente 30 g de arena, previamente lavada y tratada con ácido clorhídrico concentrado. Este conjunto se llevó a sequedad en estufa a  $102^\circ\text{C}$  durante 12 h, y luego se colocó en desecador durante  $\sim 1$  h para que alcance temperatura ambiente. Una vez seco y enfriado en desecador, se determinó exactamente

el peso del sistema de cristizador, arena y varilla, antes y después de la adición de aproximadamente 1,5 g de la muestra de queso, mediante el uso de una balanza analítica. El queso se dispersó en la arena utilizando la varilla de vidrio, para aumentar la superficie de evaporación de la muestra, y se llevó a estufa a 102 °C hasta pesada constante (aproximadamente 4 h). Las masas de la muestra húmeda y seca se obtuvieron por diferencia y se utilizaron para calcular el contenido de humedad de los quesos.

**Materia grasa.** El contenido de materia grasa en los quesos se determinó mediante el método butirométrico de Gerber según ISO 3433|IDF 222 (2008b), empleando un butirómetro específico para queso. Para ello, se pesaron aproximadamente 2,5 g de queso y se adicionaron lentamente 15 mL de ácido sulfúrico (densidad 1,52 g/mL). Los butirómetros se colocaron en un baño de agua a 65 °C hasta disgregación total del queso. Luego se adicionó 1 mL de alcohol isoamílico, se homogeneizó y se colocó nuevamente en el baño a 65 °C durante 5 min para facilitar y lograr una separación óptima de la materia grasa durante la centrifugación. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 10 min. Finalmente, los butirómetros se colocaron nuevamente en el baño de agua y se realizó la lectura a una temperatura de 65 °C.

**Proteínas totales.** El contenido de proteínas totales en los quesos se determinó mediante el método de Kjeldahl según ISO 8968|IDF 20 (2014). Se pesaron 0,8 g de queso en papel libre de nitrógeno y se colocaron en un tubo de digestión que contenía los siguientes catalizadores: 9,5 g de sulfato de potasio, 0,28 g de dióxido de titanio y 0,18 g de sulfato de cobre. Posteriormente, bajo campana, se adicionaron 20 mL de ácido sulfúrico concentrado utilizando un dosificador. La mineralización de la muestra se llevó a cabo en una unidad digestora con capacidad para seis tubos y con un sistema de aspiración de vapores (Digestion System 6, 1007 Digester, Tekator, Suecia). Durante la digestión, la temperatura se incrementó gradualmente hasta alcanzar el punto máximo (420 °C). Se dio por finalizado el proceso de digestión cuando la muestra se tornó translúcida y límpida. El análisis del contenido de proteínas totales se realizó sobre el digerido mediante una destilación y posterior titulación. Cada tubo conteniendo la muestra digerida se conectó a una unidad destiladora automática BÜCHI Distillation Unit B-324 (Suiza) programada con los siguientes parámetros: 70 mL de hidróxido de sodio al 32 % p/v, 60 mL de ácido bórico al 2 % p/v, 3 minutos de destilación, 100 % de vapor, con aspiración de la muestra. En primer lugar se adicionó hidróxido de sodio para transformar el amonio proveniente de las proteínas, péptidos y aminoácidos presentes en la muestra en amoníaco, y luego se inició la destilación por arrastre con vapor de agua. El destilado se colectó en un erlenmeyer conteniendo el ácido bórico y 4 gotas de solución indicadora de punto final, compuesta por azul de metileno (0,1 %, p/v) y rojo de metilo (0,15 %, p/v) en etanol al 96 % v/v. El amoníaco destilado fue de esta manera capturado en forma de ión amonio en la solución recolectora de ácido bórico. Finalmente, las muestras destiladas y recogidas como borato de amonio se titularon con una solución valorada de

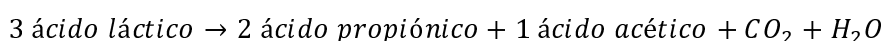
ácido sulfúrico aproximadamente 0,1 N hasta el viraje del indicador de verde a fucsia y la corroboración potenciométrica del pH a 4,65. Para expresar el resultado en % p/p de proteínas totales, se multiplica el valor obtenido de nitrógeno total por un factor, que varía de acuerdo al tipo de proteína. En el caso de los productos lácteos, este factor es igual a 6,38.

### 3.5.4. Análisis de ácidos orgánicos y azúcares de los quesos

Este análisis se llevó a cabo mediante HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), y un guardacolumna Aminex Cation-H (30 x 4,6 mm) (Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos) para la separación cromatográfica. El cromatógrafo HPLC utilizado, marca Perkin Elmer Series 200 y Flexar (Perkin Elmer, Norwalk, Estados Unidos), consta de una bomba cuaternaria, desgasificador en línea, inyector manual, horno para el control de la temperatura de la columna y dos detectores en línea: detector UV-visible y detector de índice de refracción (IR), interfase analógica y computadora provista de la aplicación Chromera® para el control del equipo y recolección/procesamiento de los resultados cromatográficos. El detector UV-Vis a una longitud de onda de 210 nm permitió cuantificar los ácidos orgánicos (cítrico, láctico, acético, propiónico), mientras que el detector de IR fue utilizado para cuantificar los azúcares (lactosa y galactosa). La separación se realizó en forma isocrática a 0,6 mL/min con una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M, a 65 °C. La cuantificación de los compuestos identificados se realizó utilizando curvas de calibrado construidas empleando estándares apropiados (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania), que se prepararon y analizaron por triplicado.

Las muestras de queso (5 g) se suspendieron en 25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M y se incubaron a 40 °C durante 15 min; luego se homogeneizaron en un homogeneizador Ultraturrax® (modelo T25, IKA, Staufen, Alemania) aplicando tres ciclos a 12000 rpm de 1 min cada uno. La fase soluble fue separada de las caseínas precipitadas y de la materia grasa por centrifugación (5000 g – 20 min - 4 °C) y posterior filtración a través de papel de filtro de flujo rápido (Deltalab, Barcelona, España). La solución se filtró nuevamente a través de membranas de 0,45 µm (GVS ABLUO, Fisher scientific, EEUU) y un volumen de 60 µL de la misma fue inyectado en el HPLC.

Para los quesos de la segunda experiencia, a partir de la cuantificación del ácido propiónico determinado por HPLC, se calculó la producción de CO<sub>2</sub> mediante la estequiometría de la reacción resultante de la fermentación del ácido láctico por las bacterias propiónicas:



A partir de los moles de CO<sub>2</sub> obtenidos de la estequiometría, se calcula el volumen del gas mediante la ley de gases ideales: 1 mol de gas bajo condiciones normales (0,1 MPa y 273,17 ° K) equivale a 22,414 L.

### 3.5.5. Estudio de la proteólisis de los quesos

El contenido de nitrógeno en distintas fracciones solubles del queso es un ensayo inespecífico muy usual para describir las características de la proteólisis que ocurre durante la maduración (Ardö, 1999). Las fracciones más comunes para determinar este avance en la hidrólisis de las caseínas son: nitrógeno soluble a pH 4,6, en ácido tricloroacético al 12 % p/v, y en ácido fosfotúngstico al 2,5 %, las cuales se expresan como proporción del nitrógeno total: NS pH 4,6/NT, NS TCA/NT, NS PTA/NT, respectivamente. La fracción de NS pH 4,6 incluye proteínas no caseínas, todos los péptidos de hasta 30-35 residuos de aminoácidos, aminoácidos libres y compuestos nitrogenados menores (aminas, urea y amoníaco) (Ardö, 1999).

El estudio de la proteólisis se llevó a cabo mediante la determinación de la fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 a los 60 días de maduración utilizando la metodología descriptas por Hynes et al. (2003a). Para obtener esta fracción, en primer lugar, se preparó una suspensión de queso en citrato de sodio. Para tal fin, se homogenizaron 10 g de queso con 20 mL de solución de citrato de sodio 0,5 M en un mortero de porcelana y la suspensión homogénea se trasvasó a un vaso de precipitado adicionando agua destilada hasta completar un volumen de aproximadamente 70 mL. El pH de la suspensión se ajustó a 4,6 mediante la adición de HCl 20 % v/v, bajo agitación mecánica. La muestra se transvasó a un tubo Falcon y se centrifugó a 3000 g durante 15 min, obteniéndose dos fracciones, una soluble y otra insoluble. La fracción soluble se enrasó a un volumen de 100 mL por adición de agua destilada, se homogeneizó y se verificó su pH; en el caso de variaciones se ajustó nuevamente al valor indicado mediante adición de HCl 20 % v/v o NaOH 30 % p/v según correspondiera. Se tomaron 10 mL con pipeta volumétrica para la determinación del contenido de nitrógeno que se realizó por digestión, destilación y posterior titulación como se indicó anteriormente. El contenido de nitrógeno de esta fracción representa el nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6) (Gripon et al., 1975).

### 3.5.6. Análisis de los quesos por tomografía computada de rayos X

Las mediciones de TC de rayos X se llevaron a cabo utilizando un tomógrafo de uso clínico Toshiba Activion 16 (Otawara-shi, Tochigi, Japón) con los siguientes parámetros de escaneo: 120 kV, 70 mA y 0,5 mm de espesor de corte. El tamaño de píxel en cada corte fue de 0,5 mm. El tiempo de tomografía computarizada para cada queso fue de aproximadamente 10 s. El queso se apoyó sobre un soporte de poliestireno (Figura 10). Las imágenes obtenidas se procesaron mediante el software 3D Slicer 4.8.1 (Fedorov et al., 2012), que permitió obtener el modelo 3D de la horma de queso y cuantificar el volumen total de masa y ojos. Con estos datos se calculó el porcentaje de ojos en relación al volumen total del queso. Al finalizar el tiempo de maduración (60 días) los quesos fueron cortados por la mitad para inspección visual y toma de fotografías. Es importante mencionar que la asistencia y aprobación del curso de postgrado: “Microtomografía,

Modelos Tridimensionales y Aplicaciones en Biología” (Universidad de Córdoba, junio 2018), permitió adquirir los conocimientos y entrenamiento práctico en la aplicación de la TC y el correcto procesamiento de imágenes en las muestras de quesos.



**Figura 10.** Tomógrafo utilizado para el análisis de los quesos.

### **3.6. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados fue realizado con el software IBM-SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas. El nivel de significancia se fijó en  $p < 0,05$ . Las diferencias entre medias se determinaron mediante el test de Tukey. En la validación de la metodología de TC se determinó la correlación obtenida mediante regresión lineal por el método de cuadrados mínimos (Massart et al., 1988).

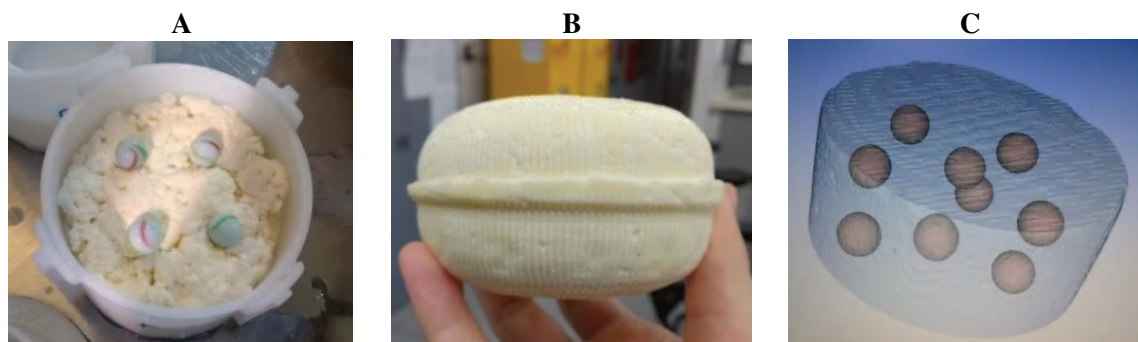
## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Puesta a punto del protocolo de elaboración y de la metodología de análisis de ojos de queso tipo suizo**

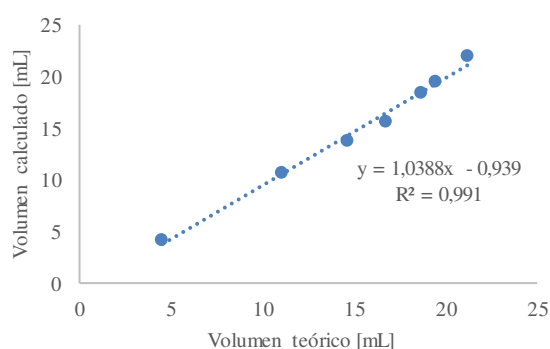
#### **4.1.1. Validación de la metodología de TC para evaluar el volumen de ojos en quesos**

La Figura 11 (A y B) muestra uno de los quesos elaborados con la incorporación de esferas de vidrio durante el moldeo, para la validación de la metodología de TC. Mediante los tomogramas obtenidos para cada queso, se elaboraron los modelos 3D de cada horma (Figura 11C). A partir del análisis de cada modelo obtenido se calculó el volumen de las esferas incorporadas (ojos artificiales) en cada queso que se comparó con el volumen teórico aplicando Regresión Lineal Simple (Figura 12). La buena correlación obtenida ( $R^2 > 0,99$ ) indica una adecuada performance

del procesamiento de imágenes aplicado para la evaluación cuantitativa del volumen de ojos en quesos.



**Figura 11.** Queso con la incorporación de esferas de vidrio (A y B) y modelo 3D de la horma de queso (C).



**Figura 12.** Correlación entre el volumen teórico de las esferas y el calculado por el análisis de las imágenes tomográficas.

#### 4.1.2. Composición global y ácidos orgánicos de los quesos tipo suizo

En una primera instancia, quesos con bacterias propiónicas sin la adición de partículas de alfalfa fueron elaborados para definir el protocolo de elaboración de los mismos. El pH y composición global de los quesos elaborados fue similar ( $p \geq 0,05$ ) y estuvo dentro de los parámetros normales para esta variedad. Los valores promedio del contenido de grasa, proteína y humedad y el pH fueron  $31,6 \pm 0,3$  % p/p,  $25,5 \pm 0,2$  % p/p,  $39,0 \pm 0,6$  % p/p y  $5,3 \pm 0,1$ , respectivamente. El contenido de ácido láctico y propiónico fue diferente en ambos quesos ( $p < 0,05$ ); el nivel de láctico fue de  $1101,7 \pm 15,2$  y  $765,7 \pm 6,3$  mg/100 g de queso y el de propiónico de  $320,0 \pm 65,4$  y  $451,9 \pm 70,8$  mg/100 g de queso para el queso 1 y 2, respectivamente. La lactosa no fue detectada, mientras que el nivel de galactosa fue muy bajo (entre  $5,4 \pm 0,5$  y  $21,6 \pm 1,2$  mg/100 g de queso), lo que indica un adecuado perfil de fermentación. El agregado de lactobacilos termófilos (*Lactobacillus helveticus*) como parte del cultivo iniciador está orientado justamente a estimular el crecimiento de las bacterias propiónicas, fermentar los azúcares residuales y también participar en la proteólisis. El consumo de galactosa en los quesos tipo suizo está asociado con la actividad metabólica de este lactobacilo y de los lactobacilos de origen NSLAB (Turner et al.,



1983). La galactosa que no es utilizada por *S. thermophilus* y se acumula en el queso, puede dar lugar a defectos de postacidificación o fermentaciones por microorganismos adventicios indeseables, por lo que su consumo total al inicio de la maduración por dichos lactobacilos es fundamental para la calidad del queso. Asimismo, altos niveles de galactosa afectan negativamente el crecimiento de las bacterias propiónicas (Bergamini et al., 2022).

#### **4.1.3. Evaluación de la formación de ojos de los quesos tipo suizo por tomografía computada**

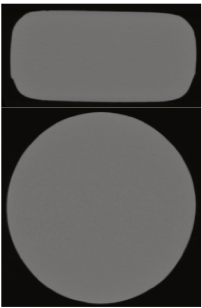
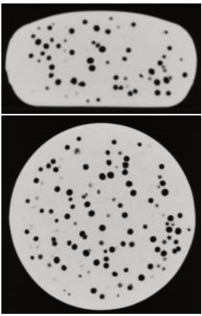
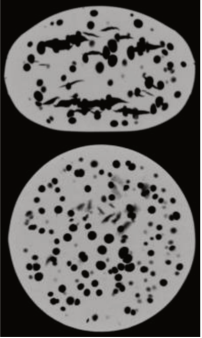

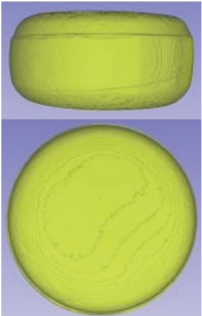
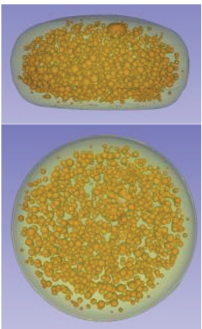
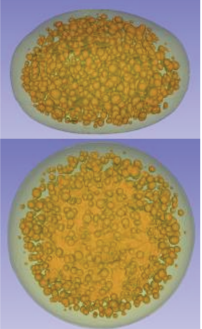
La formación de ojos en los quesos elaborados se evaluó mediante TC en tres momentos durante la maduración: antes del ingreso a la cámara caliente (10 días), luego de la salida de la cámara caliente (33 días) y al final de la maduración (60 días). La TC es un método interesante, eficaz y no destructivo para la evaluación del desarrollo de ojos en quesos tipo suizo que ha sido aplicado por varios investigadores en los últimos años (Guggisberg et al., 2015; O'Sullivan et al., 2016).

A modo de ejemplo, se muestran en la Tabla 2 las imágenes obtenidas de un corte de las hormas enteras (tomogramas); también se muestran los modelos 3D obtenidos luego del análisis de los tomogramas y las imágenes obtenidas luego del corte destructivo. Se indica el volumen y el porcentaje de ojos calculado en cada caso.

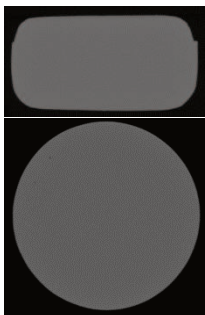
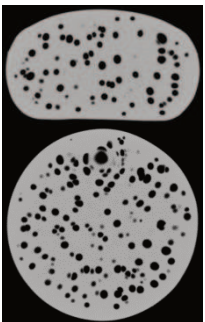
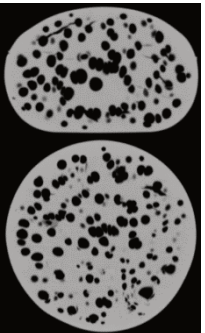

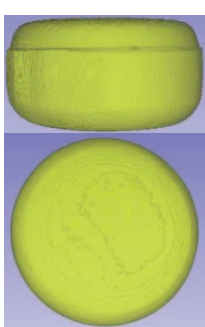
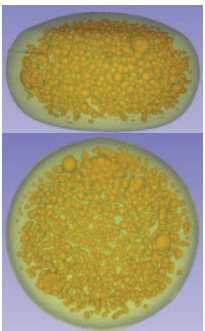
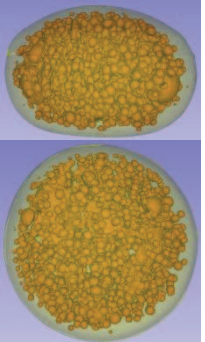
Del análisis de las imágenes tomográficas y los cálculos realizados, se evidenció la evolución del aumento del volumen total de ojos durante la maduración. En la primera etapa en cámara fría (12 °C/10 días) no hubo formación de ojos; durante los 22 días de cámara caliente se observó visualmente un aumento progresivo del volumen de las hormas que se correlacionó con las imágenes obtenidas al final de dicha etapa. Se observaron ojos esféricos, de pequeño a mediano tamaño de 4,5 a 9,0 mm en el queso 1 y de 6,0 a 10,0 mm de diámetro en el queso 2, distribuidos homogéneamente en la horma; además, no se observaron grietas ni ningún otro defecto en la masa. Estas imágenes indican una buena producción de CO<sub>2</sub> por parte del fermento propiónico y una excelente elasticidad de la masa del queso que permitió una buena apertura de ojos. El porcentaje de ojos en relación a la masa total del queso fue diferente entre los dos quesos: 5,9 y 7,6 % en el queso 1 y 2, respectivamente. Durante la etapa final de maduración en cámara fría (12 °C), se observó un incremento del doble del porcentaje de ojos y del volumen de los mismos, llegando a niveles de 11,8 y 15,4 % para el queso 1 y 2, respectivamente. Los diámetros de los ojos variaron entre 7,5 y 12,5 mm para el queso 1 y entre 8,0 y 15,0 mm para el queso 2. La capacidad de crecimiento y producción de gas de las bacterias propiónicas durante la maduración en cámara fría depende de la cepa (Rehn et al., 2011). En nuestro caso, la elevada producción de gas en la etapa final de maduración puede atribuirse a la capacidad del fermento propiónico utilizado de mantener su actividad metabólica a temperaturas cercanas a las utilizadas en la cámara fría. En el queso 1 se observó la aparición de grietas en la última etapa de maduración, las

que no estaban presentes al final de la cámara caliente. La elasticidad de la masa en este tipo de queso es fundamental para que el CO<sub>2</sub> producido pueda dar lugar a la formación correcta de ojos, sin llegar a la aparición de defectos en la masa (Goy et al., 2014). En el queso 2, en el que hubo mayor producción de gas y formación de ojos, se verificaron solamente algunas grietas pequeñas. Como ya fue mencionado, la única diferencia en el proceso de elaboración de los quesos fue la dosis de *L. helveticus*. La mayor dosis utilizada en el queso 1, condujo a una mayor producción de ácido láctico, lo que podría haber ejercido cierta inhibición (comparativamente al queso 2) de la actividad metabólica de las bacterias propiónicas (producción de ácido propiónico y CO<sub>2</sub>) y cambios en la elasticidad de la masa del queso, que condujeron a que la misma no soporte la apertura correcta de los ojos (Fröhlich-Wyder et al., 2017, Furtado, 2008).

**Tabla 2.** Imágenes de los tomogramas, modelos 3D, y del corte destructivo de los quesos analizados. Volumen y % de ojos calculados.

<b>QUESO 1</b>				
	Antes de cámara caliente (10d)	Salida de cámara caliente (33d)	Fin de maduración (60d)	Corte destructivo
Tomogramas				
Modelos 3D				
Volumen y Porcentaje de ojos	0 mL 0 %	310,9 mL 5,9 %	700,7 mL 11,8 %	

**QUESO 2**

	Antes de cámara caliente (10d)	Salida de cámara caliente (33d)	Fin de maduración (60d)	Corte destructivo
Tomogramas				
Modelos3D				
Volumen y porcentaje de ojos	0 mL 0 %	459,9 mL 7,6 %	980,6 mL 15,4 %	

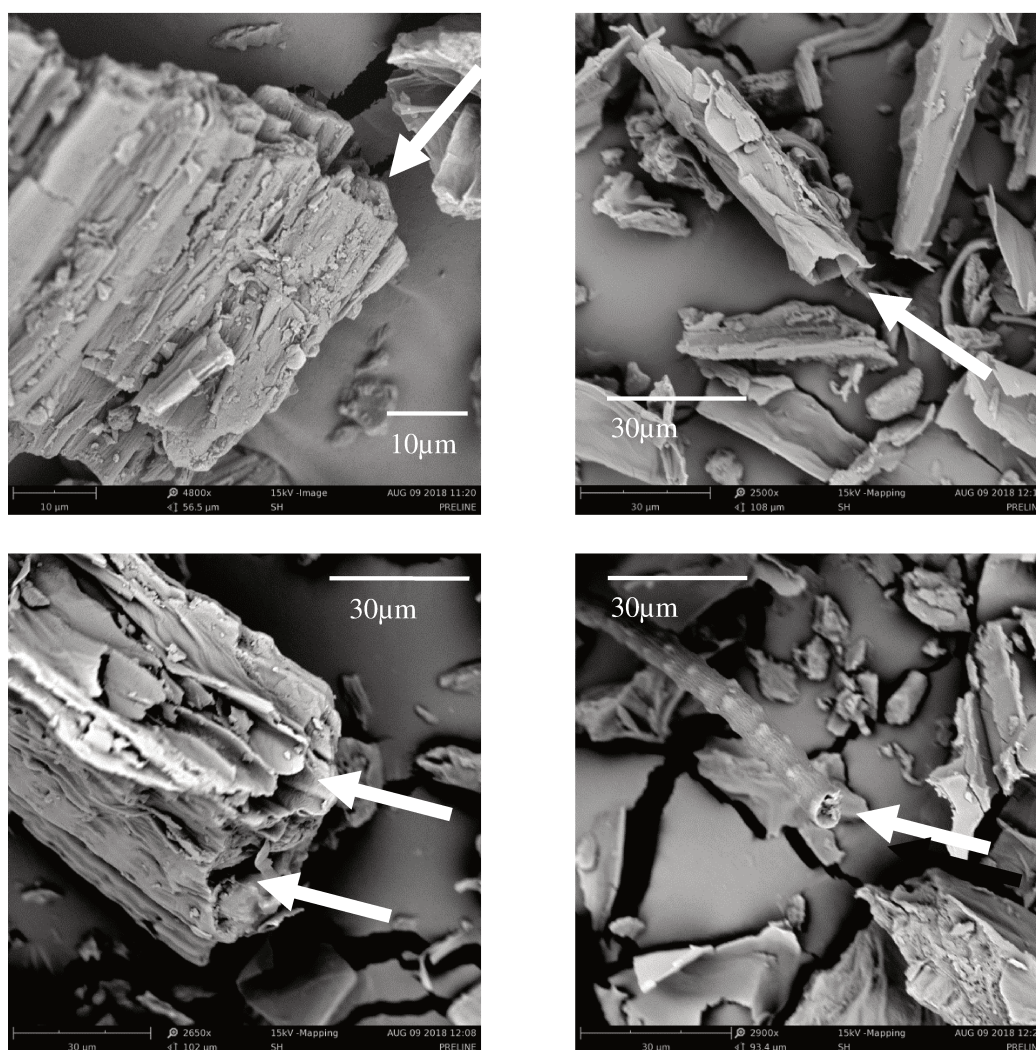
La elaboración y maduración de quesos tipo suizo es uno de los desafíos más complejos de los queseros ya que hay múltiples factores que deben ser rigurosamente controlados para la obtención de un queso de buena calidad (Furtado, 2007). El seguimiento de la formación de ojos durante la maduración mediante una metodología no destructiva aporta datos que facilitan el planteo de ajustes en el proceso cuando se producen defectos. En el caso del queso 1, la TC permitió verificar que las grietas se produjeron en la etapa final de maduración (luego de la cámara caliente). Por lo tanto, se podrían plantear modificaciones en esta última etapa para evitar la aparición de las grietas; algunas opciones posibles podrían ser el uso de una menor temperatura al final de la maduración o acortar el tiempo total de este proceso.

**4.2. Evaluación de la microfiltración de la leche de quesería para prevenir la formación de ojos en quesos**

**4.2.1. Microestructura del polvo de alfalfa**

Las imágenes de SEM de las micropartículas de alfalfa mostraron que tenían estructura capilar (Figura 13). Por lo tanto, nuestro ingrediente demostró tener las características requeridas para

actuar como núcleos para la formación de ojos durante la maduración del queso, tal como se reporta en estudios previos. Guggisberg et al. (2015) afirmaron que el atrapamiento de aire en los capilares promueve la difusión de CO<sub>2</sub> desde el cuerpo del queso a las micropartículas y luego la acumulación de gas en estas cavidades conduce a la formación de ojos visibles, mientras que las partículas sólidas, no capilares, no tienen el mismo efecto.



**Figura 13.** Imágenes obtenidas por SEM del material microscópico vegetal que fue adicionado a la leche de elaboración de los quesos experimentales.

#### 4.2.2. Composición global, pH y niveles de carbohidratos, ácidos orgánicos y nitrógeno soluble a pH 4,6 de los quesos

La composición global de los quesos experimental y control al final de la maduración (60d) fue similar ( $p \geq 0,05$ ) y estuvo en el rango adecuado para este tipo de queso (Tabla 3). El pH inmediatamente después de la elaboración del queso fue de 5,3-5,4 que es el valor adecuado para asegurar una masa elástica que permita la formación de ojos sin hendiduras ni grietas (Fröhlich-Wyder & Bachmann 2007). El pH de los quesos al final de la maduración fue ligeramente inferior al valor inicial (Tabla 3).

**Tabla 3.** pH, composición global y el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), expresados como porcentaje del nitrógeno total (NT) de los quesos tipo suizo al final de la maduración (60d).

Queso	pH	Humedad (%p/p)	Proteína (%p/p)	Grasa (%p/p)	NS-pH4,6/NT (%)
Control	5,15±0,13	41,6±1,2	24,6±0,5	29,0±0,9	17,54±1,05
Experimental	5,08±0,10	41,6±1,4	25,2±1,8	28,7±1,1	17,46±1,82

Control: Queso elaborado con leche microfiltrada sin adición de micropartículas de alfalfa. Experimental: Queso elaborado con leche microfiltrada con adición de micropartículas de alfalfa.

La concentración de carbohidratos y ácidos orgánicos en los quesos se muestra en la Tabla 4. No se detectó lactosa en ningún queso en ninguno de los momentos de muestreo, mientras que la galactosa disminuyó durante la maduración hasta un nivel muy bajo (< 40 mg/100 g de queso) a los 60 días. Simultáneamente a la disminución de carbohidratos, hubo un aumento en la concentración de ácido láctico, como era de esperar. Como se ha mencionado anteriormente, el consumo de galactosa en este tipo de quesos está relacionado con la actividad metabólica de *Lactobacillus helveticus* (cultivo iniciador). Estos resultados indican que la fermentación de los carbohidratos y consecuente producción de ácido láctico se desarrolló correctamente, lo cual es necesario para evitar el crecimiento y fermentación de microorganismos indeseables (Daly et al., 2010) y para permitir un buen crecimiento y actividad metabólica de las propionibacterias (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2007). En efecto, altos niveles de carbohidratos residuales en los quesos pueden promover el crecimiento de NSLAB y, de esta manera, incrementar su efecto potencialmente negativo en los quesos (Ortakci et al., 2015). O'Sullivan et al. (2016) encontraron que la eliminación de *L. helveticus* en el cultivo iniciador y la inclusión de una cepa heterofermentante facultativa en el queso tipo suizo condujo a altos niveles de carbohidratos residuales y formación atípica de ojos.

Las cantidades de ácido láctico, acético y propiónico fueron similares ( $p \geq 0,05$ ) entre los quesos control y experimental y aumentaron durante la maduración como resultado del metabolismo de la microbiota del queso. *S. thermophilus* y *L. helveticus* producen ácido láctico a partir de lactosa y galactosa (solo *L. helveticus*), y *Propionibacterium* spp. produce ácido propiónico y ácido acético en una proporción molar de 2:1 a partir del ácido láctico (Piveteau, 1999). En los quesos elaborados en esta etapa, esta relación molar fue inferior a este valor (aprox. 1,2:1), lo que sugiere una producción adicional de ácido acético por parte de otros microorganismos. Además, también se observó una disminución de ácido cítrico durante la maduración; estos cambios podrían estar asociados con la actividad de las NSLAB (O'Sullivan et al., 2016). En efecto, algunas cepas NSLAB pueden metabolizar citrato con la producción de acetato (Bouton et al., 2009; Sgarbi et al., 2013). O'Sullivan et al. (2016) encontraron que la inclusión de la cepa *L. casei* DPC6987 en quesos tipo suizo disminuyó significativamente la relación propionato/acetato debido a la producción de acetato por parte de la cepa de lactobacilos

mesófilos. Finalmente, no se detectó ácido butírico, lo que descarta la presencia de *Clostridium tyrobutyricum*, especie de bacilo que puede generar gas y otros compuestos, además del ácido butírico, lo que puede dar lugar al fenómeno conocido como hinchazón tardía y la producción de sabores desagradables en este tipo de queso (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2007).

**Tabla 4.** Concentración de ácidos orgánicos y galactosa (mg/100g de queso) y de CO<sub>2</sub> (mL/kg) en los quesos a tiempo inicial (12d) y al final de la maduración (60d).

Tiempo de maduración (días)	Queso			
	Control	Experimental	Control	Experimental
	12		60	
Ácido láctico	1568,3±31,5	1535,9±92,8	1763,8±353,1	1682,7±309,0
Ácido propiónico	11,1±0,7	11,9±2,2	143,7±21,5	191,9±48,2
Ácido cítrico	219,0±32,7	244,0±28,8	140,3±11,5	190,5±61,5
Ácido acético	15,0±3,0	18,0±5,4	102,1±58,9	115,3±57,0
Galactosa	410,8±91,9	466,6±66,7	32,4±18,0	37,8±37,8
CO <sub>2</sub> producido <sup>†</sup>	16,8±1,1	17,9±3,4	217,3±32,5	290,1±72,8

<sup>†</sup> Producción de CO<sub>2</sub> calculada por el contenido de ácido propiónico y la ley de gases ideales: 1 mol de gas bajo condiciones normales (0,1 MPa y 273,17 ° K) equivale a 22,414 L. Control: Queso elaborado con leche microfiltrada sin adición de micropartículas de alfalfa. Experimental: Queso elaborado con leche microfiltrada con adición de micropartículas de alfalfa.

Como mencionamos, ambos tipos de quesos contenían niveles similares de ácido propiónico ( $p \geq 0,05$ ). Así, la cantidad de CO<sub>2</sub> producida, calculada a partir de la concentración de ácido propiónico considerando una relación molar de 2:1 (2 ácido propiónico: 1 CO<sub>2</sub>), también fue similar (Tabla 4). Sin embargo, la proporción del CO<sub>2</sub> total que forma los ojos depende de diferentes factores, como la adición de micropartículas que actúan como núcleos de ojos (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2007; Guggisberg et al., 2015).

El porcentaje de nitrógeno soluble a pH 4,6 en relación al nitrógeno total de los quesos control y experimental fue similar, 17,5 %, lo cual es apropiado para este tipo de queso. El avance de la proteólisis es importante para el correcto desarrollo de los ojos. En este sentido, la producción de CO<sub>2</sub> en quesos con proteólisis avanzada puede causar grietas o hendiduras debido a la disminución de la elasticidad de la masa del queso (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2007).

#### 4.2.3. Análisis de los ojos en los quesos elaborados

La formación de ojos en los quesos depende de la cantidad y la tasa de producción de gas, así como de su difusión, la presencia de núcleos y la textura del queso, el pH y la temperatura de maduración (Fröhlich-Wyder et al., 2017). Como se explicó en la sección 2.2, los quesos control y experimental fueron los mismos excepto por la adición de micropartículas de alfalfa. El objetivo fue obtener quesos control sin núcleos y, por lo tanto sin ojos, mediante la eliminación de

partículas o posibles núcleos por microfiltración convencional, y quesos experimentales con micropartículas añadidas como núcleos, con ojos. La formación de ojos se evaluó por TC al final de la maduración (60 días). La Tabla 5 muestra las imágenes obtenidas de una de las réplicas de queso. Se puede observar que tanto los quesos control como los experimentales desarrollaron ojos. Estos resultados indican que el método de microfiltración utilizado en este trabajo no fue efectivo para eliminar las micropartículas que inicialmente se encontraban en la leche para la elaboración de queso. Sin embargo, tanto el volumen como la proporción de ojos fue mayor en los quesos experimentales: el volumen medio de los ojos fue de  $25,3 \pm 1,6$  y  $59,2 \pm 2,4$  mL/kg, y el volumen medio relativo de los ojos (porcentaje del volumen de los ojos en relación con el volumen total del queso) fue de 2,8 y 6,6 % para los quesos control y experimental, respectivamente. A partir del CO<sub>2</sub> total (calculado en base a los niveles de ácido propiónico) y el volumen de ojos (medido por TC), se estimó el porcentaje de gas que formó ojos en la masa de los quesos: 11,9 % y 21,2 % para los quesos control y experimental, respectivamente. Estos resultados sugieren que la adición del material particulado proporcionó mayor número de núcleos para la formación de ojos. Se encontraron varias grietas en ambos tipos de quesos, las cuales son indeseables y probablemente una consecuencia del pH alcanzado al final de la maduración (Fröhlich-Wyder et al., 2017).

La microfiltración de la leche a través del filtro bolsa no mostró el rendimiento esperado. Basándonos en los resultados reportados por Guggisberg et al. (2015) acerca de la eliminación de micropartículas de la leche mediante la microfiltración a través de membranas cerámicas con un tamaño de poro de 1,4  $\mu\text{m}$ , en el presente trabajo ensayamos un método más simple y económico: la microfiltración convencional a través de filtro bolsa con un tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, este tamaño de poro no es un valor absoluto sino nominal, y probablemente no todas las micropartículas de la leche fueron retenidas por el filtro. También es posible que además de las micropartículas capilares, otras microestructuras puedan actuar como núcleos. En este sentido, se ha propuesto que la no homogeneidad de la cuajada y las pequeñas aperturas mecánicas pueden facilitar la producción de ojos (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2007).

Teniendo en cuenta que la microfiltración con el sistema propuesto no fue adecuada para eliminar las micropartículas de la leche y de esta manera evitar la formación de ojos en quesos, otras alternativas se podrían ensayar. En este sentido, se ha postulado que la centrifugación o bactofugación podrían remover micropartículas de la leche mediante la fuerza centrífuga (Fröhlich-Wyder et al., 2017). La eficiencia y el costo de estos procesos debería ser evaluado para su uso en pequeñas y medianas industrias queseras.

**Tabla 5.** Tomogramas y modelo 3D obtenido por tomografía computada, y fotografías de las hormas de los quesos control y experimental.

Imagen TC	Modelo 3D	Queso
Queso Control		
Queso Experimental		

Control: Queso elaborado con leche microfiltrada sin adición de micropartículas de alfalfa. Experimental: Queso elaborado con leche microfiltrada con adición de micropartículas de alfalfa.

## 5. Conclusiones

En el presente capítulo se implementó un protocolo de elaboración de quesos de pasta semidura tipo suizo, que presentaron una composición global y pH adecuados para esta variedad.

En relación a la tomografía computada de rayos X, se verificó la potencialidad de la misma como herramienta para el análisis de ojos y aberturas en quesos sin necesidad de destruir la horma. Esta metodología permite detectar y controlar en quesos tipo suizo la correcta evolución de la



formación de los ojos durante la maduración, mientras que también posibilitaría la evaluación temprana de la aparición de ojos/aberturas en variedades que no deben presentarlos. De esta manera, la TC podría ser empleada como herramienta para la toma de decisiones. Si hay fallas que originen defectos de ojos en quesos, la TC facilita la identificación de la etapa de aparición de los mismos y el consiguiente planteo de modificaciones de los parámetros de elaboración o maduración para evitarlos. Esta metodología no se hallaba disponible en Argentina para su aplicación en quesos, y se encuentra aún en optimización en varios países.

En cuanto a la microfiltración mediante un filtro bolsa con un tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$  como método económico y adaptable para las pequeñas y medianas industrias, se verificó que no fue efectiva para nuestros objetivos. La misma no logró prevenir la formación de ojos en los quesos, probablemente porque no alcanzó a eliminar todos los núcleos que se encuentran naturalmente en la leche.

## Capítulo 2

---

Aplicación de fermentos adjuntos como estrategia para evitar defectos y mejorar la calidad de quesos

## 1. Introducción

La microbiota presente en la mayoría de los quesos se puede dividir en dos grupos principales: las bacterias del fermento primario adicionado, cuya función principal es acidificar la leche durante la elaboración (El Soda et al., 2000) aunque también contribuyen al desarrollo del flavour durante la maduración (Kieronczyk et al., 2003; Wouters et al., 2002), y las bacterias adventicias no pertenecientes al starter (NSLAB, por sus siglas en inglés, Non Starter Lactic Acid Bacteria), que pueden dominar la microbiota durante la maduración y contribuir a los cambios que ocurren en este período.

Las principales fuentes de NSLAB en los quesos son: la biota autóctona de la leche que resiste el tratamiento térmico de pasteurización y la contaminación proveniente del ambiente y equipamiento de la fábrica (Beresford & William, 2004; Cogan, 2007). Las NSLAB se encuentran en bajos niveles en los quesos al inicio de la maduración ( $< 10^2$  UFC/g), pero su población podría incrementarse durante la misma (pudiendo llegar a niveles superiores a  $10^6$  UFC/g) y convertirse en la biota dominante en algunas variedades si la población del fermento primario declina (Gobbetti et al., 2015). Su contribución en los quesos puede ser positiva o negativa dependiendo de su perfil enzimático. Pueden participar en el desarrollo adecuado del sabor y aroma del queso (Crow et al., 2002) metabolizando los hidratos de carbono y citrato, dando lugar a la producción de compuestos de interés como acetaldehído, etanol, diacetilo y acetoina (Marilley & Casey, 2004). También pueden participar en la lipólisis, y producir numerosos alcoholes de cadena larga, ácidos, metilcetonas y lactonas con diversas notas aromáticas (Collins et al., 2003). Finalmente, también tienen peptidasas mediante las cuales hidrolizan los péptidos dando lugar a otros de menor tamaño y aminoácidos libres, que pueden ser metabolizados con la consiguiente producción de una amplia gama de compuestos volátiles de importancia. De hecho, se considera que los compuestos volátiles presentes en los quesos y que tienen un impacto en el flavour provienen mayoritariamente del catabolismo de aminoácidos (Yvon, 2006). Por otro lado, algunas cepas de NSLAB también pueden contribuir negativamente a la calidad de los quesos mediante la producción de compuestos aromáticos y sápidos con impacto negativo (Antonsson et al., 2003; Crow et al., 2001; Gobbetti et al., 2015) o dando lugar a la aparición de defectos de textura. Uno de los defectos causados por NSLAB que se presenta con frecuencia en quesos blandos y semiduros de nuestro país, es la formación de aberturas no deseadas (ojos); este defecto aparece alrededor de la segunda o tercera semana de maduración y es atribuido generalmente a la actividad metabólica de cepas de *Leuconostoc* y *Lactobacilos* heterofermentantes (Quiberoni et al., 2008; Porcellato et al., 2015). Estos microorganismos pueden producir gas ( $\text{CO}_2$ ) a partir de la fermentación de lactosa, galactosa y/o del citrato (Bergamini et al., 2022; Peralta et al., 2022; Porcellato et al., 2015). Se encontraron altos niveles ( $>10^6$  UFC/g) de estas bacterias en quesos Cremoso con defectos de hinchazón y/o de formación de ojos (Cardamone et al., 2011; Quiberoni

et al., 2008). Los quesos con estos defectos, aunque no comprometan la seguridad porque las BAL involucradas son reconocidas como GRAS (Gobbetti et al., 2015; Settanni & Moschetti, 2010), son rechazados por los consumidores. De esta manera, estos productos se deben vender a un precio más económico o deben destinarse a otros fines como la producción de queso fundido o de otros productos de menor valor (Sheehan, 2011), provocando en todos los casos graves pérdidas económicas.

Dado que los microorganismos presentes en el queso durante la maduración difieren en sus capacidades metabólicas, las intervenciones tecnológicas para modificar la población microbiana son una herramienta potencial para la diversificación del flavour (Van Hoorde et al., 2010). La incorporación de cultivos adjuntos en quesería tiene como objetivos: dominar la microbiota adventicia, estandarizar la calidad del producto, acelerar la maduración y/o mejorar el flavour (Bancalari et al., 2017; Broadbent et al., 2011). También se ha propuesto el uso de cultivos adjuntos para mejorar en forma indirecta la calidad de los quesos a través de la prevención de los defectos ocasionados por NSLAB adventicias (Crow et al., 2001; Gobbetti et al., 2015; Settanni & Moschetti, 2010). En este contexto, la estrategia es el agregado de fermentos adjuntos constituidos por cepas de lactobacilos mesófilos de origen NSLAB aislados de quesos de buena calidad, y seleccionados en función de sus propiedades tecnológicas y su perfil enzimático de modo que tengan la capacidad de influir positivamente en las características sensoriales y no produzcan ningún defecto en los quesos. Esta estrategia se ha popularizado durante las últimas dos décadas (Burns et al., 2012; Katsiari et al., 2002; Merchán et al., 2022) y requiere ensayos *in vitro* e *in situ* para evaluar cada cepa en forma individual (Beresford, 2003).

La mayoría de los trabajos publicados sobre el estudio de la contribución de cepas seleccionadas de lactobacilos a la calidad del queso, se han realizado en variedades como Cheddar (McSweeney et al., 1994), Danbo (Antonsson et al., 2003), Manchego (Gómez-Ruiz et al., 2008), Gouda (Van Hoorde et al., 2010), Edam bajo en grasa (Tungjaroenchai et al., 2004), Caciotta bajo en grasa (Di Cagno et al., 2014), entre otros, en cuyos procesos de elaboración se utilizan mayoritariamente fermentos primarios mesófilos. Por el contrario, existe una menor cantidad de estudios referidos al impacto del uso de lactobacilos como cultivos adjuntos sobre la maduración de quesos en combinación con fermentos primarios termófilos, como los utilizados en nuestro país. En este contexto, en el INLAIN se han llevado a cabo en los últimos años diversos estudios para evaluar el impacto de varias cepas de origen NSLAB en la calidad de quesos blandos, semiduros y duros (Briggiler-Marcó et al., 2007; Burns et al., 2012; Cuffia et al., 2019; Milesi et al., 2009; Peralta et al., 2017). Sin embargo, hasta el momento no se evaluó la eficacia de estos adjuntos para inhibir la aparición de defectos específicos, como la formación de aberturas en quesos que no deben desarrollarlos. Por otro lado, los estudios previos han caracterizado

pormenorizadamente sólo cuatro cepas de la colección de NSLAB del INLAIN, lo que da lugar a la necesidad de conocer los otros cultivos de esta colección y su potencialidad como adjuntos.

## 2. Objetivos

- Valorar la contribución de un fermento adjunto de *Lacticaseibacillus paracasei* 90 (Lp90) para contrarrestar la acción de una cepa alterante productora de defectos gasógenos en quesos blandos.
- Evaluar la influencia de once cepas autóctonas de lactobacilos mesófilos (origen NSLAB) en la maduración de quesos semiduros miniatura.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Evaluación de la habilidad de un fermento adjunto para inhibir la formación indeseable de ojos en quesos

En esta experiencia se evaluó la habilidad de un fermento adjunto de la cepa autóctona *Lacticaseibacillus paracasei* Lp90 para inhibir la formación indeseable de ojos en quesos. Para ello, se elaboraron quesos de tipo Cremoso, que contenían tanto Lp90 como una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* capaz de producir CO<sub>2</sub> en grandes cantidades, que simulaba la contaminación con bacterias lácticas alterantes. Asimismo, se realizaron elaboraciones de quesos control. Los quesos obtenidos se maduraron en condiciones normales o con cortes en la cadena de frío. Se evaluó la viabilidad de la cepa alterante y del fermento adjunto, el perfil de fermentación de los quesos y la formación de ojos.

#### 3.1.1. Ensayos previos: selección de una cepa gasógena alterante

Se estudiaron tres cepas pertenecientes al cepario del INLAIN como posibles cepas gasógenas alterantes en queso: *Leuconostoc mesenteroides* D11 (D11), *Leuconostoc pseudomesenteroides* MB2 (MB2) y *Limosilactobacillus fermentum* Lf2 (Lf2). Las cepas de *Leuconostoc* fueron aisladas de quesos Cremoso con defectos de formación no deseada de ojos (Cardamone et al., 2011). *L. fermentum* Lf2 es una cepa autóctona que se aisló de queso Tybo semiduro como NSLAB.

Las cepas se encuentran congeladas a -80 °C, en caldo MRS (Biokar, Beauvois, Francia), adicionado con 15% (v/v) de glicerol como agente crioprotector. Para su uso habitual, las cepas se reactivaron por tres repiques sucesivos en caldo MRS (Biokar) durante 18 h a 30 °C para las cepas D11 y MB2 y a 37 °C para Lf2 y se almacenaron en heladera.

El recuento de las cepas de leuconostoc se realizó en MRS (Biokar Diagnostics, Allonne, Francia) agarizado con el agregado de vancomicina (MRS-V), con una incubación a 30 °C durante 24 h (D'Angelo et al., 2017; Cicotello et al., 2018). Las cepas de *Leuconostoc* utilizadas mostraron resistencia intrínseca a este antibiótico (Cardamone et al., 2011). La concentración de

vancomicina adicionada fue de 30 mg/mL. Las soluciones madre de antibiótico se prepararon en agua destilada y se esterizaron por filtración utilizando membranas con un diámetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Sao Paulo, Brasil) antes de su adición al medio previamente esterilizado (autoclave, 121  $^{\circ}\text{C}$  - 15 min).

Para el recuento de la cepa de *L. fermentum* Lf2 se utilizó MRS acidificado a pH 5,4 (MRSa), el cual permite el crecimiento de esta cepa pero inhibe al fermento primario ensayado.

Se llevaron a cabo elaboraciones de queso Cremoso a escala piloto con el objetivo de evaluar la habilidad de estas cepas para formar ojos. De esta manera, cuatro quesos Cremoso fueron elaborados: un queso Control con el protocolo habitual de elaboración (sin la adición de una cepa gasógena) y tres quesos Experimentales: quesos Cremoso elaborados con la adición de las cepas D11, MB2 y Lf2 en forma individual. Cada una de las elaboraciones se realizó en la planta piloto del INLAIN a partir de 50 L de leche cruda provista por una industria láctea cercana, Milkaut (Franck, Santa Fe, Argentina). La leche se pasteurizó a 65  $^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Terminado este período la leche fue enfriada hasta 37  $^{\circ}\text{C}$ , y adicionada con  $\text{CaCl}_2$  para lograr una concentración final de 0,02 % p/v. Se utilizó como fermento primario *Streptococcus thermophilus* ST1 (Chr. Hansen, Quilmes, Argentina), el cual fue hidratado en una alícuota de leche y 15 minutos más tarde fue agregado a la tina en una concentración de  $10^6$  UFC/mL. Además, la leche para cada tipo de queso experimental fue inoculada con la cepa gasógena específica en un nivel de  $10^4$  UFC/mL, recuento similar al encontrado en los quesos con defectos (Cardamone et al., 2011; Quiberoni et al., 2008). Luego de una agitación mecánica durante 10 min, se adicionó el coagulante en un nivel de 0,45 mL/L (Quimosina 34 IMCU/L, Chr. Hansen, Quilmes, Argentina). Cuando la cuajada alcanzó la consistencia adecuada (~ luego de 40 min) se cortó mediante el empleo de liras, intercalando con agitaciones suaves hasta conseguir el tamaño de grano buscado ( $5 \text{ mm}^3$ ). Luego, se dejó que la cuajada se asiente en el fondo de la tina y se extrajo el suero. La cuajada se colocó en moldes microperforados de sección cuadrada y se llevó a cámara caliente hasta lograr la acidificación a pH 5,2, momento en el cual los quesos fueron salados por inmersión en salmuera (20 % p/v, pH 5,4, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) a razón de 1 h/kg de queso. Los quesos se orearon durante 5 días y luego fueron envasados al vacío. La maduración (30 días) se llevó adelante en condiciones normales (4  $^{\circ}\text{C}$ ) o con cortes en la cadena de frío (al inicio, en el medio y al final de la maduración) para incentivar el crecimiento y actividad metabólica de la cepa alterante, como se indica a continuación:

1. 21 días a 4  $^{\circ}\text{C}$ , luego 2 días a 12  $^{\circ}\text{C}$  y por último 7 días a 4  $^{\circ}\text{C}$ .
2. 7 días a 12  $^{\circ}\text{C}$  y 23 días a 4  $^{\circ}\text{C}$ .
3. 15 días a 12  $^{\circ}\text{C}$  y 15 días a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Pasados los 30 días de maduración los quesos fueron observados minuciosamente para detectar la presencia de ojos y aberturas. A su vez, se les midió el pH y se realizó el recuento microbiológico en los medios previamente mencionados: MRS-vancomicina (MRS-V) para las cepas de *Leuconostoc* y MRSA para el recuento de Lf2; en los quesos control también se realizó un recuento en MRSA con el fin de detectar la presencia de NSLAB que también podrían contribuir al desarrollo de defectos.

### 3.1.2. Cepas y condiciones de crecimiento

En base a los ensayos preliminares, se seleccionó la cepa *Leuconostoc mesenteroides* D11 como alterante productor de defectos gasógenos en quesos blandos. La cepa conservada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en caldo MRS (Britania, Buenos Aires, Argentina) con la adición de glicerol al 15 % (v/v) como criopreservante fue reactivada en caldo MRS (2 %, v/v) durante 18 h a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se realizaron al menos dos repiques sucesivos antes de su uso.

La cepa *Lactocaseibacillus paracasei* 90 (Lp90), que pertenece también a la colección de cepas del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), se utilizó como cultivo adjunto para evaluar su capacidad de contrarrestar el efecto de la cepa alterante (Peralta et al., 2017). Lp90 es una cepa autóctona que se aisló como NSLAB a partir de queso Tybo de buena calidad (Bude-Ugarte et al., 2006). Esta cepa fue evaluada con éxito en modelos de queso, y en quesos blandos, semiduros y duros a los que se les adicionó como cultivo fresco o deshidratado por spray, luego de su crecimiento en el medio comercial MRS (Cuffia et al., 2019; Milesi et al., 2008; 2010; Peralta et al., 2016a; Peralta et al., 2017). En la presente experiencia, se utilizó un fermento deshidratado por spray de la cepa Lp90.

Se realizaron ensayos preliminares para verificar la performance de los medios de cultivo para realizar los recuentos del fermento primario, la cepa alterante (D11) y el fermento adjunto adicionado (Lp90). De esta forma se evaluó el recuento de una suspensión individual y de una mezcla de las tres cepas (starter, D11, Lp90, en los niveles esperables en los quesos  $\sim 9, 7$  y  $8\text{ log UFC/g}$ , respectivamente) en APC-leche, MRS acidificado a pH 5,4 (MRSA) y MRS-V para *S. thermophilus*, Lp90 y D11, respectivamente.

### 3.1.3. Elaboraciones de quesos

Para llevar adelante esta experiencia, se elaboraron quesos Cremoso miniatura a escala de laboratorio (2 L) según Peralta et al. (2017). La leche se pasteurizó a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, luego se enfrió a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y se dividió en cuatro mini tinas de 2 L. En cada tina se adicionó cloruro de calcio (Merck, Darmstadt, Alemania) para llegar a 0,02 % p/v en la leche, y el fermento primario de *S. thermophilus* (Chr. Hansen, Quilmes, Argentina) en un nivel de  $10^6\text{ UFC/mL}$ . Además, la leche se inoculó con *Leuconostoc mesenteroides* D11 a  $10^4\text{ UFC/mL}$ , para simular una alta contaminación con BAL heterofermentantes adventicias. Este nivel se seleccionó teniendo en

cuenta los recuentos de *Leuconostoc* registrados en quesos blandos con el defecto de formación indeseable de ojos (Cardamone et al., 2011; Quiberoni et al., 2008). Se obtuvieron dos tipos diferentes de quesos: control sin cultivo adjunto (C), y experimental con Lp90, inoculado en un nivel de  $10^6$  UFC/mL (E). Los quesos fueron madurados en dos condiciones: normales (N) durante todo el tiempo de maduración (30 días a 4 °C) o alteradas (A) simulando una ruptura de la cadena de frío (7 días a 4 °C seguidos de 7 días a 12 °C y luego por 16 días a 4 °C). La elaboración de estos quesos se realizó por cuatriplicado con diferentes leches en diferentes días. Los quesos fueron nombrados como: CN y EN: quesos control y experimental madurados en condiciones normales, y CA y EA, quesos control y experimental madurados en condiciones alteradas.

Los quesos (tres de las cuatro réplicas) fueron muestreados según ISO 707|IDF 50 (2008b) a los 4 y 30 días de maduración. El pH y la composición global se analizaron al final de la maduración (30 d), mientras que los recuentos microbiológicos y el nivel de azúcares, ácidos orgánicos, y etanol se determinaron a los 4 y 30 días de maduración. La formación de ojos se evaluó visualmente durante la maduración en todas las réplicas de quesos; además, este proceso se cuantificó mediante tomografía computada a los 7, 15 y 30 días en una cuarta réplica de los quesos.

### **3.2. Influencia de lactobacilos mesófilos autóctonos en el perfil de maduración de quesos semiduros**

En esta experiencia se evaluó el potencial de 11 cepas de lactobacilos mesófilos autóctonas para ser utilizadas como fermentos adjuntos en queso semiduro con el objetivo que aporten positivamente al flavour y a la calidad del producto final. En particular, se determinó la viabilidad de las cepas en el queso y su influencia en la composición y pH, y el nivel de ácidos orgánicos, azúcares y compuestos volátiles.

#### **3.2.1. Cultivos adjuntos de lactobacilos**

Las 11 cepas de lactobacilos mesófilos que se estudiaron en esta experiencia fueron aisladas en trabajos previos a partir de quesos de buena calidad (Bude-Ugarte et al., 2006), y se conservan congeladas en el cepario del INLAIN. Las cepas estudiadas fueron las siguientes: 5 cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* codificadas como Lpl29, Lpl33, Lpl87, Lpl89 y Lpl91, 1 de *Lacticaseibacillus paracasei* codificada Lp90 (la misma que la utilizada en la primera experiencia de este capítulo), 2 de *Lacticaseibacillus casei* codificadas Lc72 y Lc81, y 3 de *Lacticaseibacillus rhamnosus* codificadas Lr73, Lr77 y Lr78. Estas cepas fueron previamente evaluadas en cuanto a sus propiedades tecnológicas, su resistencia a las barreras biológicas y sus características probióticas (Bude-Ugarte et al., 2006). Los cultivos stock de cada cepa se encuentran almacenados en ultrafreezer a -80 °C en caldo MRS (Britania, Buenos Aires, Argentina)



suplementado con glicerol al 15% v/v como criopreservante. Previo a su empleo, las cepas se reactivaron mediante dos repiques sucesivos en caldo MRS incubando a 37 °C durante toda la noche (~ 18 h). Luego, se cosecharon las células por centrifugación (8000 – 20 min – 4 °C) y el pellet resultante se lavó dos veces con buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 7), y se resuspendió en leche descremada al 10 % p/v estéril (115°C – 30 min). Una alícuota de esta suspensión, suficiente para lograr una concentración de bacterias de 10<sup>6</sup> UFC/mL, se inoculó en la leche de elaboración.

### 3.2.2. Elaboraciones de quesos semiduro miniatura

Se realizaron elaboraciones de quesos semiduro miniatura a escala laboratorio con y sin adición de una cepa de lactobacilo como fermento adjunto. De esta forma se elaboraron doce tipos de quesos: un queso control (C) y once quesos experimentales (E) con la incorporación de cada una de las cepas en forma individual. La leche cruda utilizada en las elaboraciones se obtuvo de una planta láctea cercana (Milkaut S.A., Franck, Santa Fe, Argentina). En cada elaboración se trabajó con doce tinas en simultáneo (Figura 14A), las cuales contenían 1L de leche, que fue pasteurizada a 65 °C durante 30 min. Para el agregado de los fermentos, la leche fue enfriada a 37 °C. En todas las tinas se añadió el fermento primario de *Streptococcus thermophilus* y en las tinas de quesos experimentales se inoculó a su vez una cepa de lactobacilo como fermento adjunto. La cantidad adecuada de cada uno de los fermentos se dispersó en 50 mL de leche pasteurizada, se incubó a 37 °C durante 15 min y se agregó a la tina. Pasados 10 min del agregado de los fermentos, se añadió a cada tina el coagulante Chymax (Hansen, Argentina, 74 IMCU/mL) en una dosis de 34 IMCU/L, diluido previamente en 10 mL de agua destilada. Cuando la cuajada alcanzó la firmeza apropiada se cortó en etapas sucesivas con mini liras (con agitación manual entre cada etapa y reposo) hasta lograr un tamaño semejante al de un grano de maíz, manteniendo la temperatura en ~ 37 °C. La etapa de lirado y agitación demandó aproximadamente 10-15 min. Luego, la mezcla de suero y partículas de cuajada se agitó suavemente y la temperatura se incrementó a una velocidad de 1 °C/min hasta alcanzar los 45°C, que se mantuvieron durante ~ 15 min, a fin de reducir el contenido de humedad de la cuajada. Esta etapa se realizó con agitación constante con varillas de vidrio para mejorar el drenaje del suero. Pasado este tiempo, la cuajada se dejó reposar 2 min, se separó del suero y se colocó en los moldes perforados, para luego ser prensados en estufa hasta llegar a pH 5,4. Los quesos obtenidos, de aproximadamente 130 g, se salaron por inmersión en salmuera a raíz de 6 h/kg de queso y se dejaron orear en cámara a 12 °C. A los 6 días de elaborados fueron pintados y envasados al vacío (Figura 14B) y posteriormente madurados por 90 días a 12 °C. Las elaboraciones se realizaron por triplicado.

Al finalizar la maduración (90 días), los quesos fueron muestreados según ISO 707|IDF 50 (2008a) para posteriormente analizar los recuentos microbiológicos, pH, composición global, nivel de ácidos orgánicos y azúcares, compuestos volátiles y proteólisis (Figura 14C).

Los quesos experimentales fueron codificados según la cepa añadida.

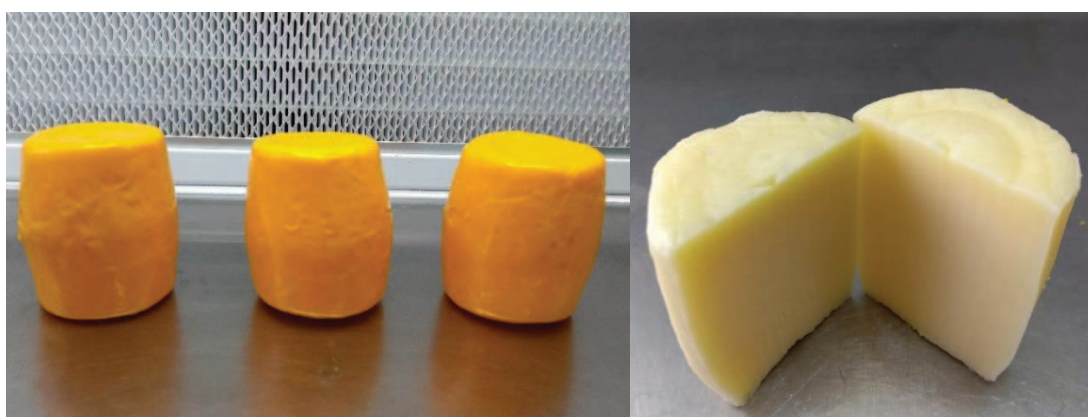
A



B



C



**Figura 14.** Tinas de elaboración (A), quesos obtenidos de una réplica de elaboración pintados y envasados al vacío (B) y muestreo de los quesos luego del período de maduración (C).

### 3.3. Determinaciones analíticas

#### 3.3.1. Composición global y pH

La composición global y el pH de los quesos se analizó al final de la maduración mediante los métodos estándar descriptos en el Capítulo 1 (secciones 2.3.1. y 2.3.2.).

#### 3.3.2. Análisis microbiológico de los quesos

Para el análisis microbiológico de los quesos se pesaron en condiciones de asepsia 10 g en bolsas estériles y luego se adicionaron 90 mL de solución de citrato de sodio 2 % p/v estéril (autoclave, 121 °C – 15 min) (Microquim, Santa Fe, Argentina). La mezcla se homogenizó en Stomacher aplicando dos ciclos de 1 minuto cada uno a fin de obtener la suspensión de queso que representó la dilución  $10^{-1}$ . A partir de esta suspensión se realizaron diluciones decimales en agua de peptona de caseína 0,1 % p/v estéril (autoclave, 121 °C – 15 min) y se sembraron en superficie 0,1 mL o en profundidad 1 mL de las diluciones apropiadas en diferentes medios, de acuerdo al grupo microbiano a analizar.

Los recuentos del fermento primario y de los lactobacilos mesófilos (adventicios en quesos control y adjuntos en quesos experimentales) en los quesos se realizaron a los 4 y 30 días para los quesos Cremoso y a los 90 días para los quesos semiduros. El recuento del fermento primario de *S. thermophilus* se realizó en APC-leche luego de 48 h de incubación a 37 °C (Frank et al., 1993). Las NSLAB (en quesos sin adición de cultivo adjunto) y los cultivos adjuntos se enumeraron en MRSa (Biokar, Beauvais, Francia) luego de la incubación de las placas a 37 °C durante 48 h bajo condiciones de microaerofilia según Peralta et al. (2017, 2020). Los recuentos de *Leuconostoc* se determinaron en MRS-Vancomicina (MRS-V) después de 24 h de incubación a 30 °C en condiciones de microaerofilia (Cardamone et al., 2011).

En los quesos semiduros se determinó también el recuento de coliformes, y de hongos y levaduras al final de la maduración (90 días) en los medios y condiciones apropiados: coliformes en: Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV) con una incubación a 32°C durante 24 h (Christen et al., 1993), y hongos y levaduras en Agar cloranfenicol – dextrosa (glucosa) – extracto de levadura (ACGY) con una incubación a 25°C durante 5 días (Frank et al., 1993).

#### 3.3.3. Niveles de carbohidratos, ácidos orgánicos y etanol

Los niveles de carbohidratos, ácidos orgánicos y etanol se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como se describió en el Capítulo 1 sección 3.4.4.

#### 3.3.4. Evaluación de la formación de ojos

La formación de ojos en los quesos Cremoso elaborados se evaluó mediante observación visual y mediante tomografía computada de rayos X (TC), metodología no destructiva para el

análisis de ojos, cuya implementación fue descrita en el Capítulo 1 (Guggisberg et al., 2013). El estudio mediante TC se realizó en los quesos a los 7, 15 y 30 días de maduración con la metodología descrita en el Capítulo 1 sección 2.1.3.3., con algunas modificaciones en los parámetros de escaneo: 100 kV, 50 mA y 0,5 mm de espesor de corte. Se obtuvieron los modelos 3D de cada queso y se cuantificó el volumen total del queso y de los ojos formados.

### 3.3.5. Estudio de la proteólisis

La proteólisis es el proceso que involucra la degradación de proteínas a péptidos de diversos tamaños y aminoácidos libres. La misma tiene un impacto significativo en la textura y flavour del queso y depende del tipo y actividad de los microorganismos presentes, así como también de la tecnología de elaboración y de las condiciones de maduración. La degradación de la matriz proteica y la formación de nuevos grupos amino y carboxilo (ionizados al pH del queso) determinan la interacción proteína-agua e influyen en la textura del queso maduro. Asimismo, la proteólisis libera aminoácidos (precursores de compuestos volátiles) y compuestos sápidos con gran impacto en el flavour del producto (Upadhyay et al., 2004a,b).

La proteólisis fue estudiada en los quesos semiduros miniatura a los 90 días de maduración mediante al análisis del nitrógeno soluble a pH 4,6 y la determinación de los perfiles peptídicos por HPLC.

**Nitrógeno soluble a pH 4,6.** La metodología utilizada para este estudio fue la misma que la descrita en el Capítulo 1 (sección 2.2.5.).

**Perfiles peptídicos.** Esta técnica permite la separación de péptidos o grupos de péptidos, obteniéndose un perfil proteolítico característico de cada muestra que, a distintos tiempos de maduración del queso, reflejan el complejo equilibrio entre su producción y su posterior degradación a aminoácidos (Pripp et al., 2000). En cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC), la fase móvil es polar mientras que la fase estacionaria es no polar. En general, al pH de los extractos de queso obtenidos, los péptidos presentan una elevada polaridad, por lo que tendrán baja afinidad por la fase estacionaria. Para mejorar la separación cromatográfica, la fase móvil se acidifica mediante la adición de ácido trifluoroacético (TFA), lo que disminuye la polaridad de los péptidos. La disminución del pH de la fase móvil a valores inferiores a 3, transforma los grupos carboxilos de los aminoácidos en su forma no disociada. Asimismo, el TFA actúa como par iónico bloqueando los grupos básicos de los aminoácidos que al pH ácido de la fase móvil se encuentran cargados (Singh et al., 1999).

Los perfiles peptídicos fueron obtenidos en el mismo equipo HPLC descrito en el Capítulo 1 sección 3.4.4. Para esta determinación se empleó una columna analítica tipo Aquapore OD-300 C18, de 220 x 4,6 mm, con un tamaño de partícula de 7 µm y un tamaño de poro de 300 Å (Perkin Elmer). Las corridas cromatográficas se llevaron a cabo a una temperatura de 40 °C y a una

longitud de onda de detección de 214 nm. La separación se llevó a cabo utilizando un gradiente lineal de acetonitrilo en agua, que se formó en la bomba del instrumento a partir de dos fases móviles: A, agua bidestilada:TFA (1000:1,1, v/v), y B: acetonitrilo:agua bidestilada:TFA (600:400:1, v/v/v).

La corrida se inició con 100% de A y el gradiente comenzó después de 10 min de la inyección de la muestra. Se incrementó gradualmente la proporción de fase móvil B en la mezcla a razón de 1 %/min durante 80 min, y luego en un 20 %/min durante 1 min, alcanzando posteriormente una meseta de 100 % de B que se mantuvo por 4 min. Finalmente, en el término de 1 min se retornó a las condiciones iniciales (100 % de A) que se mantuvieron durante 10 min (Bergamini et al., 2006). El tiempo total de corrida fue de 106 min y el flujo de fase móvil de 1 mL/min.

Las proteínas de suero  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina A y B se identificaron en los perfiles peptídicos por comparación con los tiempos de retención de estándares apropiados.

### 3.3.6. Compuestos volátiles

El análisis de compuestos volátiles se realizó según Vénica et al. (2020), con ligeras modificaciones. Se empleó la microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a un cromatógrafo gaseoso (CG) con detector de ionización de llama (FID) para aislar, separar y semicuantificar los compuestos.

Para la SPME, 5 g de cada muestra de queso se pesaron en viales de 30 mL, que se sellaron herméticamente y se introdujeron en un bloque de aluminio colocado sobre una placa calefactora (IKA, EE. UU.) durante 10 min a  $40 \pm 1$  °C. Luego, una fibra de SPME recubierta de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/Car/PDMS) 50/30  $\mu$ m (Supelco, Inc. Bellefonte, Estados Unidos) se expuso en el espacio de cabeza de los viales durante 30 min a la misma temperatura.

Los analitos retenidos en la fibra fueron desorbidos térmicamente durante 5 min a 250 °C en el puerto de inyección de un CG. Este equipo (Perkin Elmer, modelo 9000), está provisto de un holder (Supelco, Inc. Bellefonte, Estados Unidos) específico para la fibra, una columna capilar HP-Innowax (60 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) (Agilent J&W, Agilent Technologies, EE. UU.) y un detector FID mantenido a 290 °C. La temperatura del horno se fijó a 45 °C por 4 min y luego se aumentó a 150 °C (a razón de 8 °C/min) y se mantuvo por 3 min, y finalmente se aumentó a 250 °C (a razón de 10 °C/min) y se mantuvo durante 5 min. Se utilizó hidrógeno como gas portador a un caudal de 2,0 mL/min. Se utilizaron estándares inyectados en las mismas condiciones y confirmados por espectrometría de masas (GC Varian CP-3800 – MS Saturn 2000, Japón) para identificar los compuestos volátiles comparando los tiempos de retención. Los picos identificados fueron integrados utilizando el software TotalChrom® (Perkin Elmer, Estados Unidos) y las áreas obtenidas fueron expresadas en unidades arbitrarias (Wolf, 2009). Los compuestos que

presentaron valores de áreas menores a 5000 unidades arbitrarias fueron indicados como no detectados (nd).

### **3.3.7. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados fue realizado con el software Minitab 18 (Minitab Inc., PA, Estados Unidos). Todos los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas. Para todos los resultados se tomó como criterio una probabilidad de  $p < 0,05$  como diferencia significativa y las diferencias entre medias se determinaron mediante el test de Tukey. Por otro lado, para una mejor interpretación de los resultados, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) de los compuestos volátiles, ácidos orgánicos y azúcares y perfiles peptídicos en la experiencia de quesos semiduro miniatura utilizando Minitab 18 (Minitab Inc., PA, Estados Unidos). El ACP es una técnica multivariada que reduce el número de variables originales a un menor número de variables llamadas Componentes Principales (CP), las cuales son una combinación lineal de las originales. En el caso de los perfiles peptídicos, los cromatogramas fueron preprocesados para reducir el número de picos para su subsiguiente análisis por componentes principales. Los datos procesados consistieron de clases de tiempo de retención en las que las áreas de los picos se acumularon utilizando la distancia desde el centro de la clase como un factor de peso (Piraino et al., 2004). Por otro lado, se utilizó el paquete R ggplot2 para visualizar la conexión entre los compuestos volátiles, ácidos orgánicos, azúcares y pH, cuyos valores se representaron mediante celdas coloreadas según los puntajes Z (Serrazanetti et al., 2011; Unwin, 2015). La escala de colores representa la abundancia de cada variable, indicada como puntuación Z, donde el rojo indica abundancia alta y el azul indica abundancia baja.

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Evaluación de la habilidad de un fermento adjunto para inhibir la formación indeseable de ojos en quesos**

#### **4.1.1. Ensayos previos: selección de una cepa gasógena alterante**

Los resultados obtenidos en las elaboraciones de quesos realizadas en planta piloto con las cepas gasógenas alterantes y con cortes en la cadena de frío en cuanto al pH de los quesos al finalizar la maduración, la presencia de ojos en la superficie y en el interior de los mismos y el recuento de cada cepa utilizada se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Características de los quesos elaborados sin y con las cepas alterantes (*L. mesenteroides* D11, *L. pseudomesenteroides* MB2 y *L. fermentum* Lf2) en distintas condiciones de maduración: presencia de ojos, pH y recuentos de las cepas añadidas en los quesos experimentales y NSLAB en quesos control.

Condiciones de maduración	Quesos			
	Control	D11	MB2	Lf2
<b>Normal</b>				
Observación de ojos	-	-	-	-
pH	5,45	5,45	5,45	5,27
Recuentos (log UFC/g) ‡	<2	8,2	7,2	6,0
<b>Alterada*</b>				
Observación de ojos	-	-	-	-
<b>1</b> pH	5,15	5,30	5,15	5,20
Recuentos (log UFC/g) ‡	2,7	7,7	6,9	<6,0
Observación de ojos	-	+	+	-
<b>2</b> pH	5,20	5,20	5,10	5,15
Recuentos (log UFC/g) ‡	<2	7,0	8,6	6,0
Observación de ojos	-	+	+	-
<b>3</b> pH	5,20	5,15	5,10	5,20
Recuentos (log UFC/g) ‡	3,0	7,1	7,9	6,1

\*Condiciones de maduración alterada de los quesos: **1:** 21 días a 4 °C, luego 2 días a 12 °C y por último 7 días a 4 °C; **2:** 7 días a 12 °C y 23 días a 4 °C; **3:** 15 días a 12 °C y 15 días a 4 °C.

‡ Los resultados corresponden a los recuentos de NSLAB en quesos control, determinado en el medio MRSa, y de las cepas añadidas en los quesos experimentales, utilizando MRS-V para la cepa D11 y MB2 y MRSa para Lf2.

En general, en todas las condiciones ensayadas se encontraron valores de pH dentro del rango esperado, aunque en condiciones de maduración alterada, hubo valores de pH levemente menores. Además, se pudo corroborar que las dos cepas de *Leuconostoc* se mantuvieron viables y alcanzaron niveles de alrededor  $10^7$  UFC/g en el queso y fueron capaces de formar ojos únicamente cuando los quesos se sometieron a las condiciones 2 y 3 de cortes en la cadena de frío. Por otra parte, la cepa Lf2 no fue capaz de formar ojos en las condiciones estudiadas, por lo que fue descartada para los siguientes estudios. Los quesos que contenían la cepa D11 y sometidos a un corte de frío desde el inicio de la maduración fueron los que presentaron la mayor cantidad de ojos; sin embargo las hormas se deformaron bastante en esas condiciones. En base a estos resultados, se seleccionó la cepa D11 para utilizar como cepa gasógena alterante en las siguientes elaboraciones de queso y se optó por comenzar la maduración en las condiciones normales (4 °C) por 7 días, luego realizar el corte de la cadena de frío (12 °C) por 7 días y finalizar la maduración a 4 °C. Estas condiciones son similares a un buen manejo de la cadena de frío en etapas de producción, cuando los quesos están en la industria, y la ocurrencia de interrupciones de frío durante la comercialización. En los quesos madurados con este esquema de temperaturas se produjeron ojos, pero no deformación.

#### 4.1.2. Cepas y condiciones de crecimiento

Los resultados de las pruebas preliminares donde se evaluó el medio de cultivo a utilizar para el recuento de las cepas utilizadas (fermento primario, cepa gasógena alterante seleccionada y fermento adjunto) en la elaboración de los quesos Cremoso miniatura con corte en la cadena de frío se muestran en la Tabla 7. A su vez, en las Figuras 15, 16 y 17 se muestran las colonias obtenidas a partir del recuento de las mezclas de cepas (como se encuentran en el queso). En estas pruebas se verificó que el recuento de cada cepa fue similar para la suspensión individual y mixta.

**Tabla 7.** Recuentos obtenidos del ensayo de cepas individuales (*S. thermophilus*, D11 y Lp90) y de la mezcla de ellas (*S. thermophilus*+D11+Lp90) en los medios APC-leche y MRSa a 37 °C-48 h, y MRS-V a 30 °C-24 h. Los resultados se expresan como log UFC/mL.

Bacteria	<i>S. thermophilus</i>	D11	Lp90
Medio	APC-leche	MRS-V	MRSa
Individual	8,83±0,29	7,12±0,12	8,41±0,08
Mezcla	8,92±0,07	7,08±0,06	8,51±0,02

Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de este ensayo.

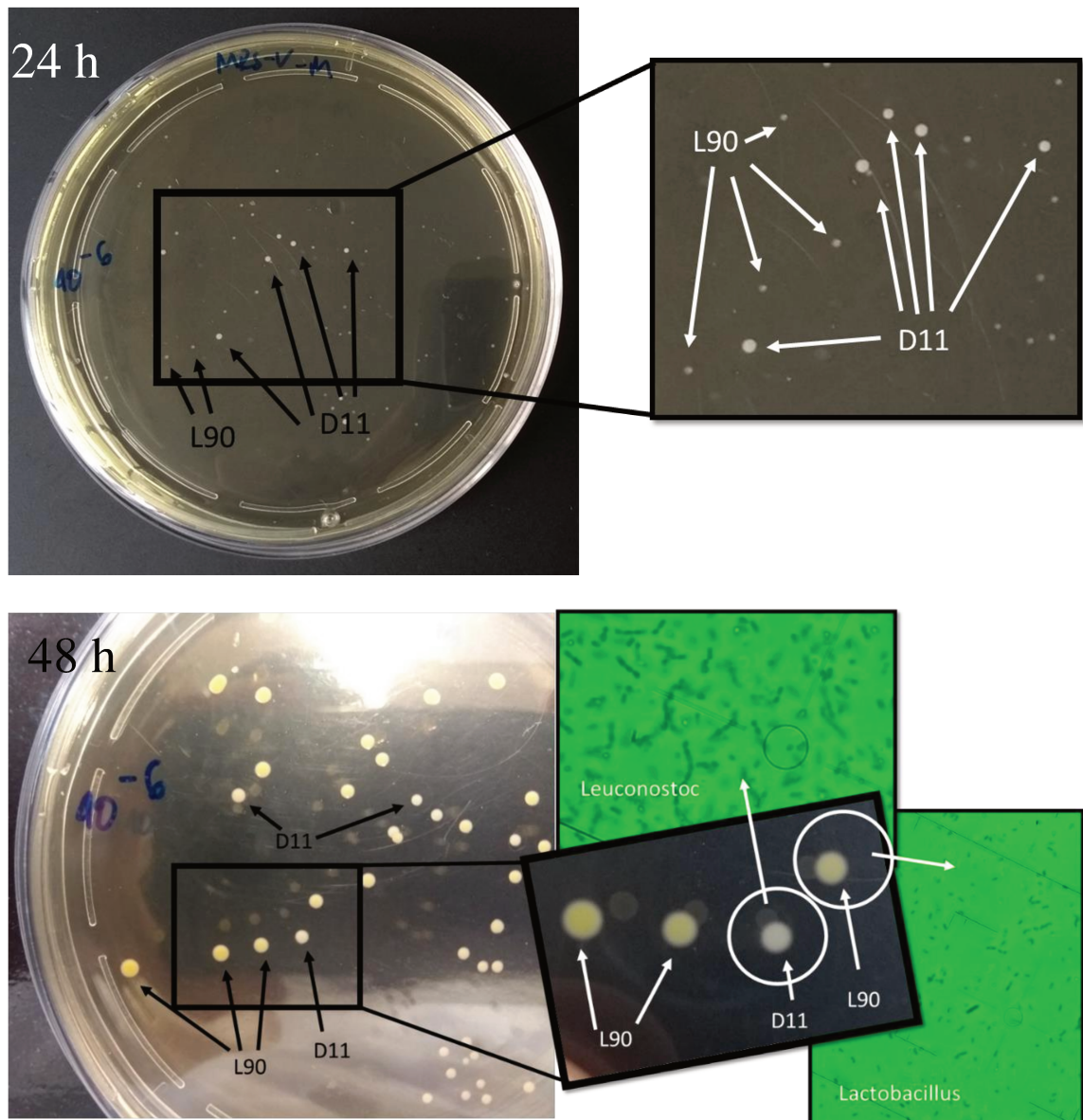
El medio MRS-V demostró ser adecuado para el recuento de la cepa D11, a pesar de que la cepa Lp90 también creció en el mismo. Ambas cepas se pudieron diferenciar en función del tiempo de incubación, tamaño y color de las colonias y características microscópicas (Figura 15). Colonias redondas, cremosas y de color blanco pertenecientes al cultivo D11 aparecen después de 24 h de incubación, mientras que el crecimiento de Lp90 fue más lento y a las 24 h las colonias fueron puntiformes y de color gris claro, por lo que no interfieren en el recuento de la cepa D11.

El recuento de Lp90 se realizó en MRSa (37 °C - 48 h), medio en el cual no crece el fermento primario ni la cepa D11. Las colonias de Lp90 son muy pequeñas a las 24 h de incubación mientras que aumentan de tamaño a las 48 h de incubación (Figura 16).

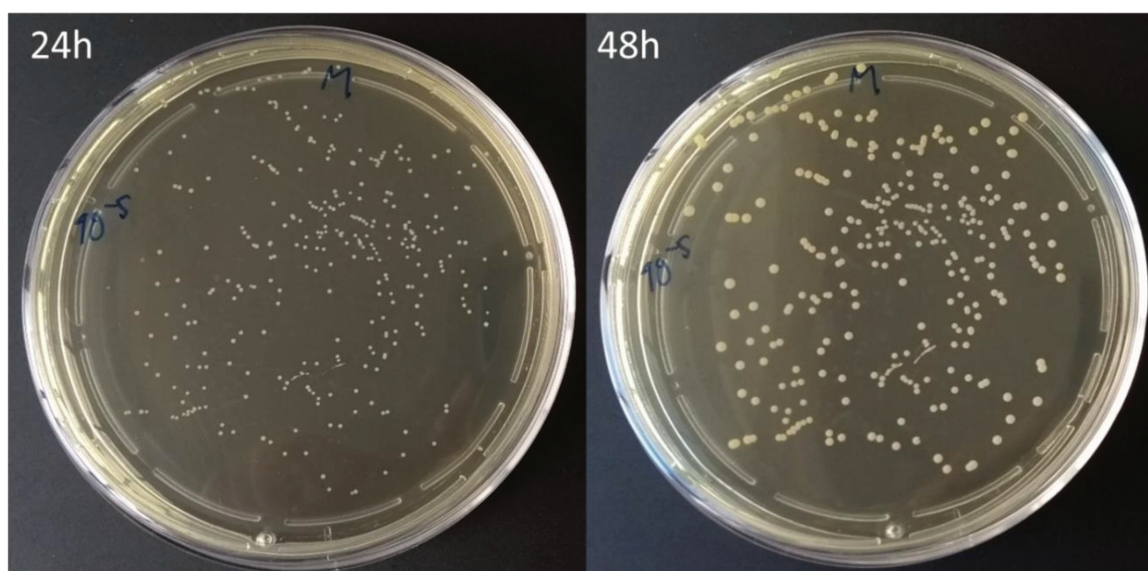
Para la enumeración de las bacterias lácticas totales se utilizó APC-leche, con una incubación a 37 °C – 48 h (Milesi et al., 2010; Peralta et al., 2017, 2020). En general, todas las BAL crecen en este medio. Sin embargo, los niveles del iniciador en los quesos Cremoso son 1 o 2 órdenes logarítmicos más altos que las cepas adjuntas o contaminantes, por lo que los resultados obtenidos en este análisis representan principalmente el recuento del iniciador *Streptococcus thermophilus*. Las colonias después de 24 h de incubación son muy pequeñas, pero aumentan de tamaño después de 48 h de incubación

Estos resultados revelan que es posible contar y diferenciar los grupos microbianos mediante las condiciones de crecimiento seleccionadas: Starter en APC-leche, 37 °C-48 h, D11 en MRS-V, 30 °C-24 h y Lp90 en MRSa, 37 °C-48 h.

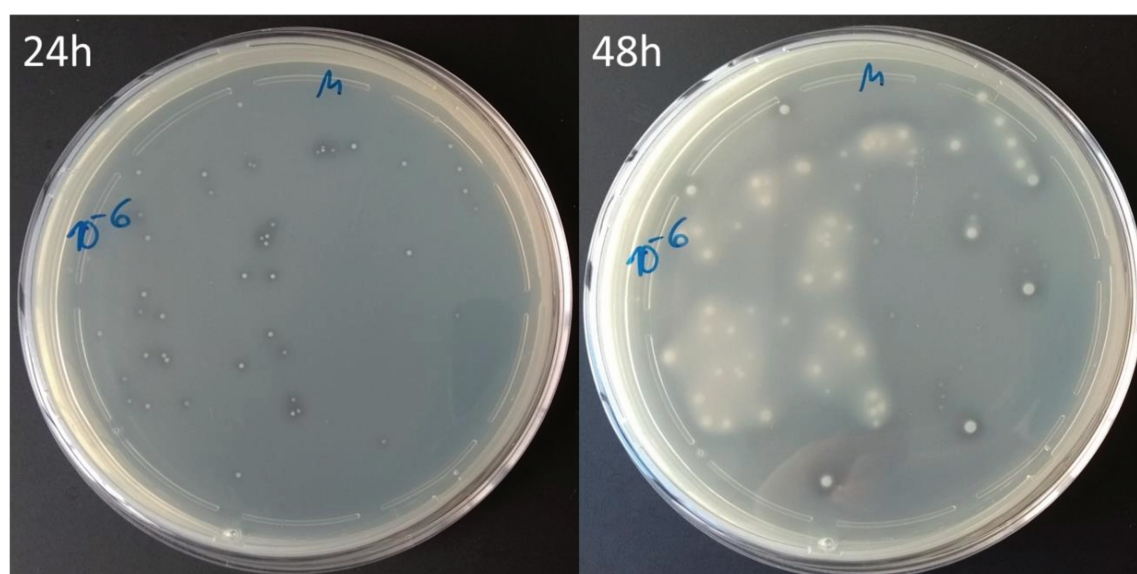




**Figura 15.** Colonias obtenidas luego de incubar en MRS-V durante 24h (A) y 48 h (B) a 30 °C la mezcla de cepas. Las colonias de D11 (colonias redondas blancas cremosas) están bien diferenciadas de las colonias de Lp90 (colonias gris claro, mucho más pequeñas y puntiformes) por tamaño y color. El recuento en placa de la cepa D11 se realizó en esta condición. Se muestra la morfología de ambas cepas bajo un microscopio con contraste de fase (100x).



**Figura 16.** Colonias obtenidas luego de incubar en MRSa durante 24 h y 48 h a 37°C la mezcla de cepas.



**Figura 17.** Colonias obtenidas luego de incubar en APC-leche durante 24 h y 48 h a 37 °C la mezcla de cepas.

#### 4.1.3. Composición global y pH de los quesos

La composición y el pH de los quesos a los 30 días de maduración se muestran en la Tabla 8. Los valores de pH, proteína y grasa fueron similares ( $p < 0,05$ ) para todos los quesos, mostrando los siguientes valores medios, respectivamente,  $5,18 \pm 0,16$ ,  $17,3 \pm 0,4$  % p/p,  $24,6 \pm 0,5$  % p/p. El nivel de humedad mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ): los valores más bajos se encontraron en los quesos experimentales con interrupciones de la cadena de frío durante la maduración ( $53,4 \pm 0,4$  % p/p), mientras que los quesos control madurados en condiciones normales tuvieron el mayor nivel de humedad ( $56,2 \pm 0,3$  % p/p).

El contenido de humedad en el queso depende principalmente de las variables de procesamiento durante la elaboración del queso: tamaño de corte de la cuajada, temperatura de cocción, acidificación, agitación de la mezcla de cuajada y suero, prensado y salado. Además, la post-acidificación durante la maduración del queso también podría afectar la humedad (McSweeney, 2007). El pH de todos los quesos fue de 5,3 al final de la elaboración. Sin embargo, disminuyó ligeramente durante la maduración, sobre todo en los quesos experimentales madurados en condiciones alteradas. Este hecho probablemente condujo a un ligero drenaje del suero durante la maduración y una disminución de los niveles de humedad en los quesos EA al final de la maduración. Una post-acidificación en quesos debido a la incorporación de cultivos adjuntos de *L. paracasei* también fue evidenciado por Bancalari et al. (2020).

**Tabla 8.** Composición global y pH de los quesos Cremoso a los 30 días de maduración.

Quesos	pH	Proteína % (p/p)	Grasa % (p/p)	Humedad % (p/p)
CN	5,35±0,14	17,0±0,6	23,9±2,1	56,2±0,3 <sup>c</sup>
CA	5,17±0,09	17,0±0,7	24,5±2,2	55,4±0,1 <sup>c,b</sup>
EN	5,23±0,25	17,6±0,1	24,6±1,8	54,8±0,8 <sup>b</sup>
EA	4,98±0,11	17,7±1,2	25,2±1,9	53,4±0,4 <sup>a</sup>

CN y CA, quesos controles sin adición de adjunto madurados en condiciones normales y alteradas, respectivamente. EN y EA: quesos experimentales con adición del cultivo adjunto Lp90 madurados en condiciones normales o alteradas, respectivamente. Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de quesos.

<sup>a,b,c</sup> Los valores con diferentes superíndices de una misma columna difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4. Recuentos microbiológicos

Los recuentos de las bacterias lácticas totales (BAL), leuconostoc y lactobacilos mesófilos se muestran en la Tabla 9. Los recuentos de BAL totales fueron similares ( $p \geq 0,05$ ) en todas las muestras de queso y oscilaron entre 9,6 y 9,9 log UFC/g; estos valores representan la población del fermento primario. En efecto, ha sido reportado que el fermento *S. thermophilus* permanece en niveles elevados en el queso Cremoso durante la maduración (Milesi et al., 2010, Peralta et al., 2017, 2020); estos resultados indican que la cepa alterante y el cultivo adjunto adicionados no interfirieron en el crecimiento y supervivencia del fermento primario (*S. thermophilus*). Por otro lado, aunque Lp90 y D11 también crecen en APC-leche, no interfirieron en el conteo del cultivo primario ya que su concentración estuvo al menos 1 y 2 órdenes logarítmicos por debajo, respectivamente.

Los lactobacilos mesófilos se encontraron en un nivel de 7,1 log UFC/g en quesos experimentales a los 4 días de maduración, luego aumentaron 1 y 2 órdenes logarítmicos cuando se usó una temperatura de maduración normal (EN) o alterada (EA), respectivamente. En los

quesos controles (CN y CA), los lactobacilos mesófilos se mantuvieron por debajo de 3 log UFC/g durante toda la maduración (30 días). Si bien el medio de cultivo no fue selectivo para *Lacticaseibacillus paracasei*, su identificación y conteo se considera confiable por las siguientes razones: i) el cultivo primario y la cepa de leuconostoc no crecen en MRSa, ii) los niveles de NSLAB fueron bajos en quesos controles, iii) la morfología macroscópica (color, forma, elevación, borde) de las colonias en quesos experimentales fue homogénea y coincidió con colonias de Lp90 obtenidas a partir de cultivos puros de la misma e incubado en las mismas condiciones, y iv) resultados previos que mostraron una buena correlación entre los recuentos en placa de Lp90 en MRSa y qPCR con cebadores específicos para *Lacticaseibacillus paracasei* (Peralta et al., 2020).

En cuanto al recuento de la cepa D11, el nivel inicial en todos los quesos estuvo entre 6,0 y 6,3 log UFC/g, es decir, 2 órdenes logarítmicos más altos que el nivel inoculado en la leche para la elaboración del queso. Después de 30 días de maduración, los recuentos aumentaron entre 0,95 y 1,69 log UFC/g. Los recuentos fueron ligeramente más bajos en los quesos experimentales que también tenían la cepa Lp90 que en los quesos control que contenían solo *S. thermophilus*. Aunque la diferencia de viabilidad fue baja, esta tendencia se observó en todas las réplicas de queso. Estos resultados sugieren cierto control de Lp90 sobre la viabilidad de la cepa D11. En este sentido, los cultivos adjuntos contribuyen a inhibir o controlar el crecimiento de microorganismos adventicios a través de diferentes mecanismos como la producción de moléculas inhibitoras y/o por un efecto competitivo (Gaggia et al., 2011; Gobbetti et al., 2015; Settanni & Moschetti, 2010). Sin embargo, las interacciones microbianas que determinan la microbiota del queso son complejas y no están completamente dilucidadas (Gobbetti et al., 2018). Por último, los quesos sin Lp90 madurados en condiciones alteradas mostraron los recuentos más altos de la cepa D11, aunque las diferencias no fueron significativas ( $p < 0,05$ ).

La implantación y la modulación de la microbiota del queso son cruciales para lograr un adecuado desarrollo de la bioquímica de la maduración, que depende en gran medida del metabolismo microbiano, que a su vez está relacionado a la tecnología (Gobbetti et al., 2018). Además del nivel de contaminación con NSLAB, se ha demostrado que las interrupciones de la cadena de frío durante el almacenamiento de quesos blandos aumentan el efecto negativo de estas bacterias en los quesos (Beresford, 2007; O'Sullivan et al., 2016; Porcellato et al., 2015; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2000), y pueden causar defectos que dependen de las especies y cepas presentes y de las interacciones o competencia entre ellas (Blaya et al., 2018). Es sabido que la calidad y seguridad de los productos alimenticios frescos requieren un adecuado mantenimiento de la cadena de frío durante el almacenamiento (Mercier et al., 2017). Sin embargo, son frecuentes las fallas en la misma, especialmente durante la comercialización (Dominguez et al., 2016; Mercier et al., 2017; Osorio et al., 2017). En este sentido, Ortakci et al. (2015) observaron una disminución

en la población del fermento primario de lactococos y un aumento simultáneo de NSLAB en queso Cheddar madurado a 12 °C, en comparación con los madurados a 6 °C. En nuestro caso se observó un leve aumento de los recuentos de las cepas D11 y Lp90 cuando hubo interrupciones de la cadena de frío. Sin embargo, los recuentos de los lactobacilos mesófilos en los quesos control no aumentaron cuando se alteraron las condiciones de maduración. Esto probablemente se debió a una buena calidad microbiológica de la leche cruda, las buenas condiciones de higiene mantenidas durante la elaboración del queso y la inoculación de la cepa D11 en la leche de elaboración que podría haber inhibido por competencia el crecimiento de lactobacilos adventicios.

**Tabla 9.** Recuentos microbiológicos (log UFC/g) en los quesos a los 4 y 30 días de maduración.

Quesos	CN	CA	EN	EA
<b>Bacterias lácticas totales<sup>1</sup></b>				
4 días	9,65±0,18	9,68±0,14	9,65±0,18	9,74±0,06
30 días	9,69±0,16	9,62±0,04	9,76±0,18	9,87±0,18
<b><i>Leuconostoc mesenteroides</i> D11<sup>2</sup></b>				
4 días	6,29±0,45	6,18±0,20	6,25±0,55	6,02±0,51
30 días	7,60±0,56	7,87±0,18	7,19±0,38	7,52±0,37
<b>Lactobacilos mesófilos<sup>3</sup></b>				
4 días	< 3,00	< 3,00	7,15±0,15	7,03±0,25
30 días	< 3,00	< 3,00	8,14±0,81	8,99±0,22

CN y CA, quesos controles sin adición de adjunto madurados en condiciones normales y alteradas, respectivamente. EN y EA: quesos experimentales con adición del cultivo adjunto Lp90 madurados en condiciones normales o alteradas, respectivamente. Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de quesos.

Condiciones utilizadas para los recuentos: <sup>1</sup> APC-leche a 37 °C por 48 h, <sup>2</sup> MRS-V (MRS con vancomicina) a 30 °C por 24 h, <sup>3</sup> MRSa (MRS acidificado a pH 5,4) a 37 °C por 48 h.

#### 4.1.5. Niveles de carbohidratos, ácidos orgánicos y etanol

La concentración de ácidos orgánicos (ácidos cítrico, orótico, láctico, hipúrico y benzoico), carbohidratos (lactosa y galactosa) y etanol se muestran en la Figura 18.

El nivel de lactosa fue similar en todos los quesos a los 4 días de maduración, mostrando un promedio de 557±65 mg/100g de queso. De los 4 a los 30 días, se observó una disminución del contenido de lactosa en todos los quesos, a excepción de los quesos CN. Después de los 30 días de maduración, el contenido de lactosa fue significativamente menor en los quesos EA (~330 mg/100 g de queso) que en los quesos CN, mientras que los quesos CA y EN tuvieron valores

intermedios (alrededor de 440 mg/100 g de queso). En cuanto a la galactosa, se encontraron niveles similares en todos los quesos al inicio de la maduración. Sin embargo, después de 30 días, la galactosa fue significativamente menor en los quesos EA que en los demás. En correlación con estos resultados, la concentración de ácido láctico fue similar en todos los quesos a los 4 días de maduración, mientras que a los 30 días se encontraron diferencias significativas. Se observó un aumento de este ácido durante la maduración en los quesos CA, EN y EA, alcanzando niveles de 1398, 1411 y 1792 mg/100g de queso, respectivamente. Los quesos CN, por su parte, presentaron una concentración de ácido láctico significativamente menor (~1200 mg/100g de queso).

El contenido de ácido hipúrico fue similar para todos los quesos a los 4 días, mientras que a los 30 días los niveles fueron significativamente menores en los quesos EN y EA que en los quesos CN y CA. El ácido benzoico solo se detectó después de 30 días de maduración; su contenido fue significativamente mayor en los quesos experimentales.

Los niveles de ácido cítrico y orótico fueron similares para todos los quesos y no cambiaron significativamente ( $p \geq 0,05$ ) durante la maduración. A pesar de ello, los valores de ácido cítrico a los 30 días fueron ligeramente inferiores en los quesos CA (150 mg/100 g queso) que en los demás quesos (200 mg/100 g queso) (valor  $p = 0,09$ ). El etanol se detectó solo en los quesos C a los 30 días de maduración; su contenido fue un poco mayor en CA (44 mg/100 g de queso) que en los quesos CN (19 mg/100 g de queso).

La fermentación por BAL produce ácidos orgánicos como ácido láctico, pero también propiónico y acético, que juegan un papel importante como bioconservadores para inhibir la microbiota adventicia en los productos lácteos fermentados (Gobbetti et al., 2015; Settanni & Moschetti, 2010). Los resultados obtenidos demuestran una mayor producción de ácido láctico tanto en los quesos experimentales como en los quesos CA en comparación con el queso control madurado en condiciones normales (CN). La mayor producción de ácido láctico en los quesos E está asociada a Lp90, mientras que en los quesos CA está ligada a una mayor actividad metabólica del fermento primario y de la cepa alterante adicionada cuando hubo interrupciones en la cadena de frío. A su vez, los mayores niveles de ácido láctico se correlacionaron con niveles más bajos de carbohidratos fermentables (lactosa y galactosa). Si bien una post-acidificación pronunciada puede afectar negativamente las características organolépticas del queso Cremoso, se ha reportado que un aumento de la concentración de ácido láctico y una disminución del pH similar a lo encontrado en esta experiencia no provocaron defectos sensoriales (Peralta et al., 2020).

Por otro lado, las BAL pueden convertir el ácido hipúrico, un compuesto natural presente en la leche, en ácido benzoico, un conocido conservante de alimentos (Sieber et al., 1995). En este sentido, la disminución significativa de ácido hipúrico y el aumento de ácido benzoico en quesos experimentales sugieren que Lp90 tiene esta actividad metabólica. Los cultivos adjuntos que

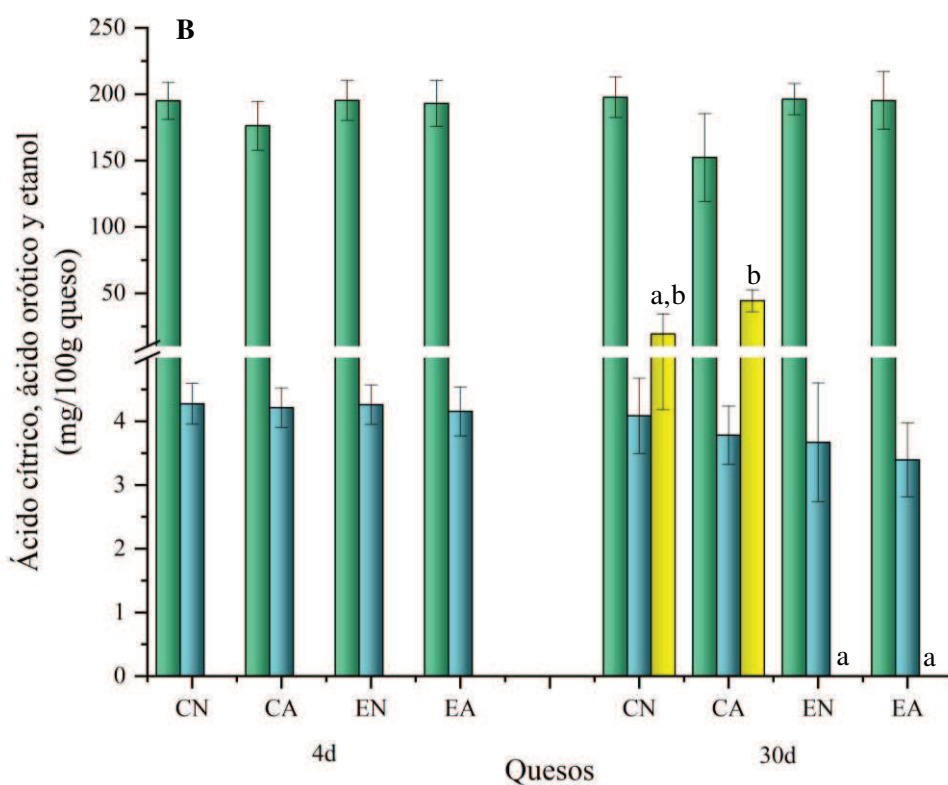
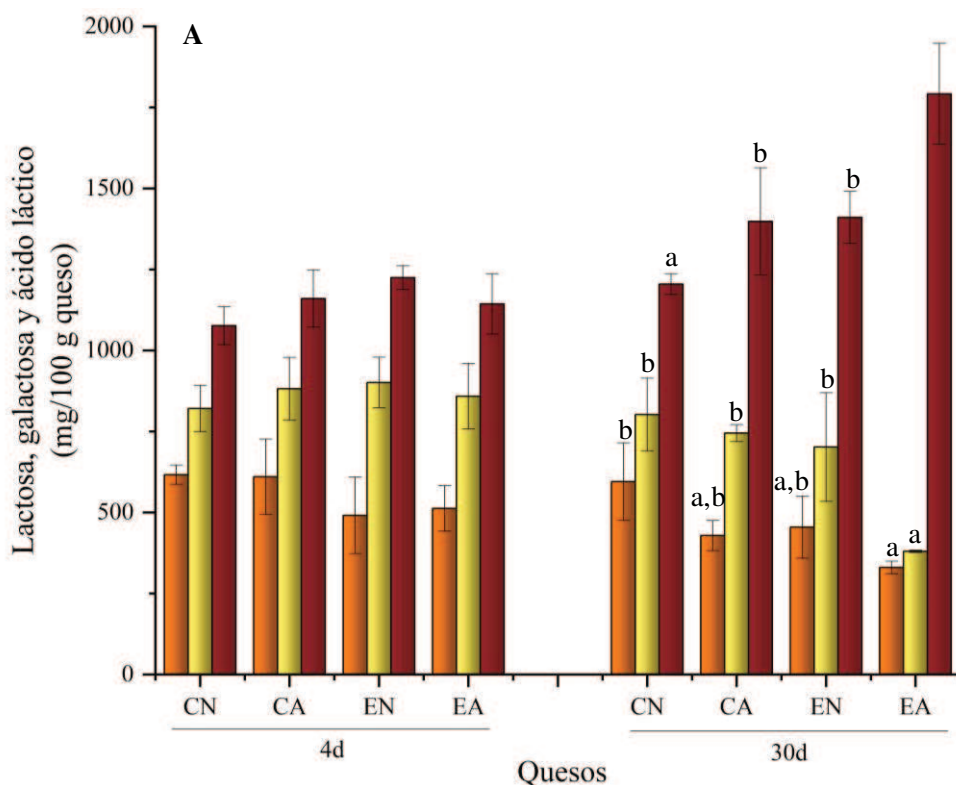
producen compuestos antimicrobianos *in situ* tienen potencial para ser utilizados como bioprotectores y mejorar la conservación de alimentos, con el objetivo de reemplazar los aditivos químicos (Devlieghere et al., 2004; Gaggia et al., 2011).

La influencia de Lp90 en el metabolismo de carbohidratos y los niveles de ácidos orgánicos cuantificados en estos quesos confirmaron resultados previos obtenidos por investigadores del INLAIN en quesos Cremoso sin la incorporación de la cepa alterante D11 (Peralta et al., 2017). En otro trabajo llevado a cabo en el instituto (Peralta et al., 2020), se estudió el impacto de la interrupción de la cadena de frío durante la maduración del queso Cremoso, centrándose en el comportamiento del cultivo adjunto de *Lactobacillus paracasei* 90 (Lp90), recientemente reclasificado como *Lacticaseibacillus paracasei* (Zheng et al., 2020). Se observó que Lp90 aumentó la proteólisis y la fermentación de carbohidratos, modificó favorablemente el perfil de volátiles y características sensoriales, y produjo algunos compuestos antimicrobianos (ácido láctico, diacetilo), modificaciones que se incrementaron por el aumento de temperatura durante la maduración, sin causar defectos. Sin embargo, en dicho trabajo no se observó una inhibición de la microbiota adventicia porque las NSLAB se mantuvieron en niveles bajos en todos los quesos incluyendo aquellos sin Lp90, lo que se atribuyó a la buena calidad microbiológica de la leche y las condiciones higiénicas de elaboración del queso a escala piloto. El presente estudio es el primero en el que se evaluó la capacidad de la cepa Lp90 para inhibir el crecimiento y efectos negativos de NSLAB, que normalmente crecen hasta altos niveles en quesos industriales.

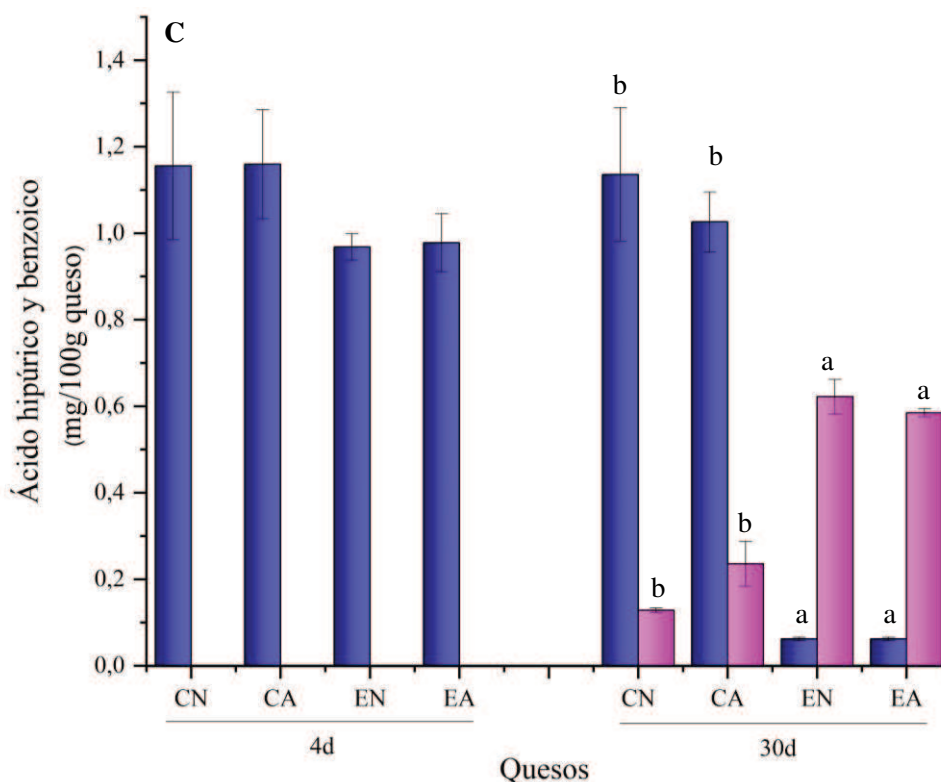
Los resultados obtenidos sugieren que las actividades bioquímicas favorables de Lp90 no fueron modificadas por altos niveles de BAL adventicias, representadas por la cepa D11. Finalmente, Lp90 no metabolizó el citrato en los quesos Cremoso, lo que puede ser atribuido a la presencia de un contenido relativamente alto de lactosa y galactosa residual. En trabajos anteriores, se encontró que Lp90 solo metaboliza citrato en quesos con niveles muy bajos o no detectados de lactosa y galactosa (Cuffia et al., 2020; Peralta et al., 2017, 2020). En quesos elaborados con un fermento primario que contenga únicamente *S. thermophilus*, es esperable que haya altos niveles de galactosa residual (McSweeney & Sousa, 2000; Peralta et al., 2017). La disminución de carbohidratos residuales es uno de los mecanismos por los cuales los cultivos adjuntos inhiben el crecimiento y actividad de NSLAB que pueden causar defectos en quesos (Gobbetti et al., 2015; Settanni & Moschetti, 2010). En este sentido, se ha reportado la producción de gas no deseado y la formación de grietas en quesos Cheddar (Porcellato et al., 2015) y Suizo (O'Sullivan et al., 2016) con niveles relativamente altos de lactosa y/o galactosa y contaminación por NSLAB.

La disminución en la concentración de citrato y la producción de etanol en los quesos C evidencian la actividad metabólica de la cepa D11 y resaltan el efecto inhibitorio que ejerce la cepa Lp90 sobre D11 en los quesos experimentales. Las cepas de *Leuconostoc* pueden

metabolizar el citrato y producir etanol (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004), cambios que no se han encontrado en los quesos Cremoso típicos (Milesi et al., 2010; Peralta et al., 2017, 2020). Una producción excesiva de etanol puede incrementar la síntesis de ésteres volátiles, los cuales no se esperan en este queso (Singh et al., 2003).







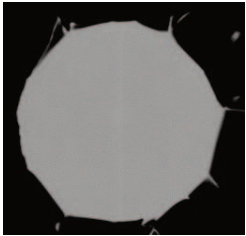
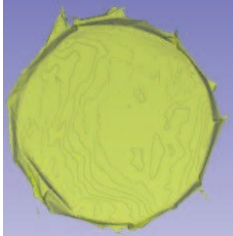

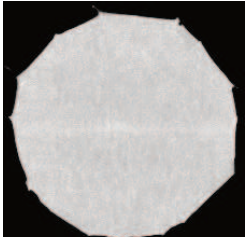
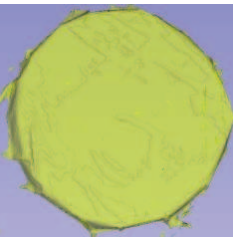

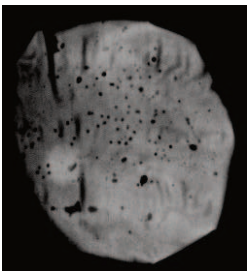
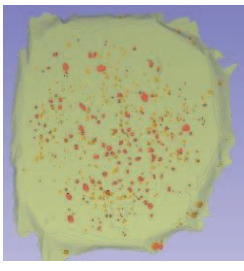

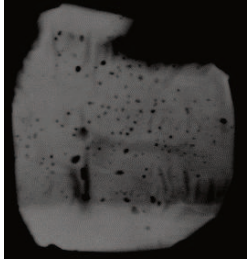
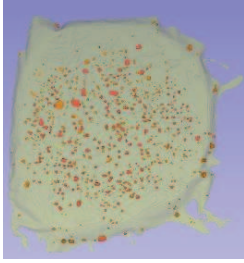

**Figura 18.** Niveles de carbohidratos (■, lactosa; ■, galactosa) y ácido láctico (■) (A), ácido cítrico (■), ácido orótico (■) y etanol (■) (B), ácido hipúrico (■) y ácido benzoico (■) (C), en quesos a 4 y 30 días de maduración. CN y CA, quesos controles sin adición de adjunto madurados en condiciones normales y alteradas, respectivamente. EN y EA: quesos experimentales con adición del cultivo adjunto Lp90 madurados en condiciones normales o alteradas, respectivamente. Barras para el mismo compuesto, al mismo tiempo de maduración, con diferente letra, difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Los valores (mg/100g de queso) se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de quesos.

#### 4.1.6. Formación de ojos

La producción de ojos se controló durante la maduración de los quesos en forma visual y mediante tomografía computada (TC). Las fotos e imágenes obtenidas por TC (tomograma y modelo 3D) se muestran en la Tabla 10. La apertura de ojos se detectó por primera vez en los quesos CA a los 15 días de maduración, es decir, después de la ruptura de la cadena de frío. Visualmente se observaron algunos ojos superficiales en todas las réplicas. La presencia de ojos en el interior de la masa fue detectada por TC. El volumen de los ojos representó 0,17 % del volumen total del queso. Al día 30, el volumen de los ojos calculado por TC se duplicó (0,31 %); además una mayor cantidad de ojos, pequeños y redondos, pudo ser observada tanto en la superficie como en el interior de los quesos CA luego del corte de la horma para el muestreo. Estos resultados reflejan que la producción de gas y el crecimiento de los ojos continuaron cuando los quesos regresaron a las condiciones normales de maduración. La formación de ojos en los quesos CA se puede atribuir a la producción de  $\text{CO}_2$  por la actividad metabólica de la cepa alterante D11; estos resultados se correlacionan con la disminución de citrato y lactosa en los

mismos quesos (Cardamone et al., 2011). La interrupción de la cadena de frío probablemente favoreció la actividad de D11 en los quesos CA, mientras que en CN no fue suficiente la producción de gas para lograr la formación de ojos. De esta manera, la conservación de una temperatura adecuada durante la maduración del queso Cremoso permitió controlar este defecto. Por otro lado, la falta de ojos en los quesos EA corrobora el efecto inhibitor de Lp90 sobre D11. También es importante mencionar que, los quesos E tuvieron un pH más bajo que los C, y esta condición mejora la solubilización de CO<sub>2</sub> (Fröhlich-Wyder & Bachmann, 2007). De hecho, la producción de CO<sub>2</sub> no es sinónimo de apertura de ojos en los quesos, ya que puede solubilizarse completamente en la fase acuosa (Laleye et al., 1987).

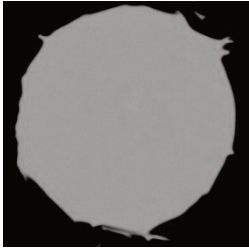
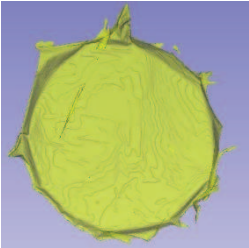

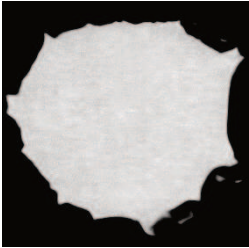
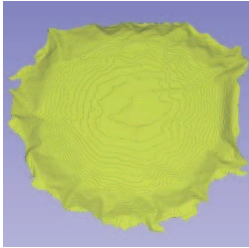

**Tabla 10.** Imágenes de quesos controles y experimental obtenidas por fotografía y tomografía computada (tomograma y modelos 3D). Volumen y % de ojos calculados en el volumen de queso.

QUESOS CONTROLES				
	Tomograma	Modelo 3D	Fotografía del Queso	Volumen y porcentaje de ojos
CN 30 días*				0 mL 0 %
CA 7 días				0 mL 0 %
CA 15 días				0,51 mL 0,17 %
CA 30 días				0,97 mL 0,31 %

---

**QUESOS EXPERIMENTALES**


---

	Tomograma	Modelo 3D	Fotografía del Queso	Volumen y porcentaje de ojos
EN 30 días *				0 mL 0 %
EA 30 días *				0 mL 0 %

\*Resultados similares fueron obtenidos a los 7 y 15 días de maduración.

CN y CA, quesos controles sin adición de adjunto madurados en condiciones normales y alteradas, respectivamente. EN y EA: quesos experimentales con adición del cultivo adjunto Lp90 madurados en condiciones normales o alteradas, respectivamente.

Los resultados obtenidos evidencian el potencial de la cepa Lp90 para inhibir la actividad de microorganismos adventicios alterantes, lo que podría atribuirse a varias razones: i) inhibición competitiva por el consumo de nutrientes presentes en el medio, ii) inhibición por compuestos antimicrobianos producidos por Lp90, o iii) cambios de las condiciones ambientales generando un medio más adverso para producir o formar ojos.

En queso Cheddar, Ortakci et al. (2015) observaron que la inoculación de una cepa de *L. wasatchensis* condujo a la producción de gas, y este defecto fue más pronunciado cuando la maduración se realizó a mayor temperatura (12 °C vs. 6 °C). El defecto no se evidenció en el queso Cheddar sin *L. wasatchensis* madurado a 12 °C o en queso con esta cepa madurado a 6 °C. Los autores sugirieron que el mayor crecimiento de esta cepa en quesos madurados a temperaturas más altas podría explicar la mayor producción de gas, pero también puede influir la menor solubilidad del CO<sub>2</sub> a temperaturas más altas.

## 4.2. Influencia de lactobacilos mesófilos autóctonos en el perfil de maduración de quesos semiduros

### 4.2.1. Composición global y pH de los quesos

La composición global y el pH de los quesos semiduros miniatura a los 90 días de maduración se muestran en la Tabla 11. Los valores de humedad estuvieron dentro del rango normal

establecido para queso de pasta semidura (Código Alimentario Argentino, 2020), salvo los quesos elaborados con la adición de *L. rhamnosus* 73 y 77 que tuvieron una humedad levemente menor a los que el código establece para este tipo de queso (límite 36%). Esto puede deberse a un incremento en la sinéresis (liberación de suero a partir de la cuajada) causada por la post-acidificación verificada en estas muestras, en forma similar a lo observado en los quesos Cremoso en la primera experiencia de este capítulo y a lo reportado por Herreros et al. (2007) y Milesi (2008). Los quesos elaborados con la incorporación de las cepas Lc72, Lr77 y Lr73 exhibieron valores de pH significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) al resto de los quesos luego de 90 días de maduración, lo que indica una mayor post-acidificación durante la maduración en los quesos inoculados con estos adjuntos. Resultados similares de post-acidificación fueron encontrados por Milesi et al. (2009) al utilizar la cepa Lr77 en queso Pategrás. El contenido de materia grasa y proteínas totales no mostró diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los quesos elaborados con distintas cepas.

El modelo elegido resultó ser representativo de la matriz de un queso semiduro estándar. Diversos autores a lo largo de los años han realizado ensayos en quesos miniatura y establecido protocolos para su elaboración, entre ellos pueden citarse el modelo de queso miniatura para queso Cheddar (Milesi et al., 2008; Shakeel-Ur-Rehman et al., 1998), “Saint-Paulin” (queso de pasta lavada) (Hynes et al., 2000), queso Caciotta (Di Cagno et al., 2006), quesos de pasta blanda tipo Cremoso Argentino (Giménez et al., 2021; Milesi et al., 2007), los modelos MicroCheese y ScreenCheese (Engels et al., 2012), entre otros. En todos los casos, los autores informaron que los valores de composición global fueron semejantes a los del queso convencional.

**Tabla 11.** pH y composición global de los quesos semiduros miniatura. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Queso	pH	Humedad (%p/p)	Proteína (%p/p)	Grasa (%p/p)
Control	5,27 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	36,9 $\pm$ 0,6 <sup>a,b,c</sup>	24,8 $\pm$ 0,4	33,5 $\pm$ 0,8
Lc72	4,80 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	36,6 $\pm$ 0,6 <sup>a,b,c</sup>	25,9 $\pm$ 1,3	34,2 $\pm$ 0,4
Lc81	5,20 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	37,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	24,2 $\pm$ 0,1	33,3 $\pm$ 1,5
Lp90	5,00 $\pm$ 0,18 <sup>a,b</sup>	37,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	24,8 $\pm$ 0,1	33,5 $\pm$ 0,9
Lpl29	5,02 $\pm$ 0,08 <sup>a,b</sup>	37,1 $\pm$ 0,3 <sup>a,b</sup>	24,6 $\pm$ 0,3	33,7 $\pm$ 1,4
Lpl33	5,05 $\pm$ 0,05 <sup>a,b</sup>	37,1 $\pm$ 0,2 <sup>a,b</sup>	24,6 $\pm$ 0,4	33,4 $\pm$ 1,3
Lpl87	5,03 $\pm$ 0,15 <sup>a,b</sup>	37,5 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	24,9 $\pm$ 0,8	33,9 $\pm$ 0,7
Lpl89	5,07 $\pm$ 0,12 <sup>a,b</sup>	36,8 $\pm$ 1,0 <sup>a,b,c</sup>	24,8 $\pm$ 0,6	34,7 $\pm$ 0,9
Lp191	5,08 $\pm$ 0,08 <sup>a,b</sup>	37,5 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	24,9 $\pm$ 0,3	32,9 $\pm$ 0,3
Lr73	4,83 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	35,3 $\pm$ 0,4 <sup>b,c</sup>	25,7 $\pm$ 0,7	35,0 $\pm$ 0,7
Lr77	4,78 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	35,1 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	26,1 $\pm$ 0,7	35,4 $\pm$ 0,6
Lr78	5,20 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	37,1 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	25,0 $\pm$ 0,3	33,4 $\pm$ 1,2

<sup>a,b,c</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma columna difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Recuentos microbiológicos

En la Figura 19 se presentan los resultados de los recuentos de las bacterias lácticas totales y lactobacilos mesófilos en los quesos semiduros al final del período de maduración (90 días). Los recuentos de las bacterias lácticas totales se encontraron dentro de los valores esperados y mostraron niveles similares en todos los quesos ( $\sim 9$  log UFC/g). Al igual que lo mencionado para quesos Cremoso, este recuento representa principalmente al fermento primario utilizado, que ha sido reportado que se mantiene en altos niveles en este tipo de queso (Bergamini et al., 2006, Bude-Ugarte et al., 2006; Milesi et al., 2009). Los resultados obtenidos indican que la incorporación de las cepas de lactobacilos en niveles de  $\sim 10^6$  UFC/mL en la leche de elaboración, no interfirieron en el crecimiento y supervivencia del fermento primario (*S. thermophilus*) ni afectaron su actividad acidificante, ya que la curva de acidificación fue similar en quesos control y experimentales. Bergamini et al. (2006) elaboraron quesos Pategrás con la adición de cultivos de lactobacilos probióticos comerciales, e informaron que la población del fermento primario permaneció en niveles de  $10^9$  UFC/g a lo largo de la maduración, y que sus recuentos no fueron afectados por la presencia de los lactobacilos ensayados, lo que coincide con los resultados de nuestra experiencia.

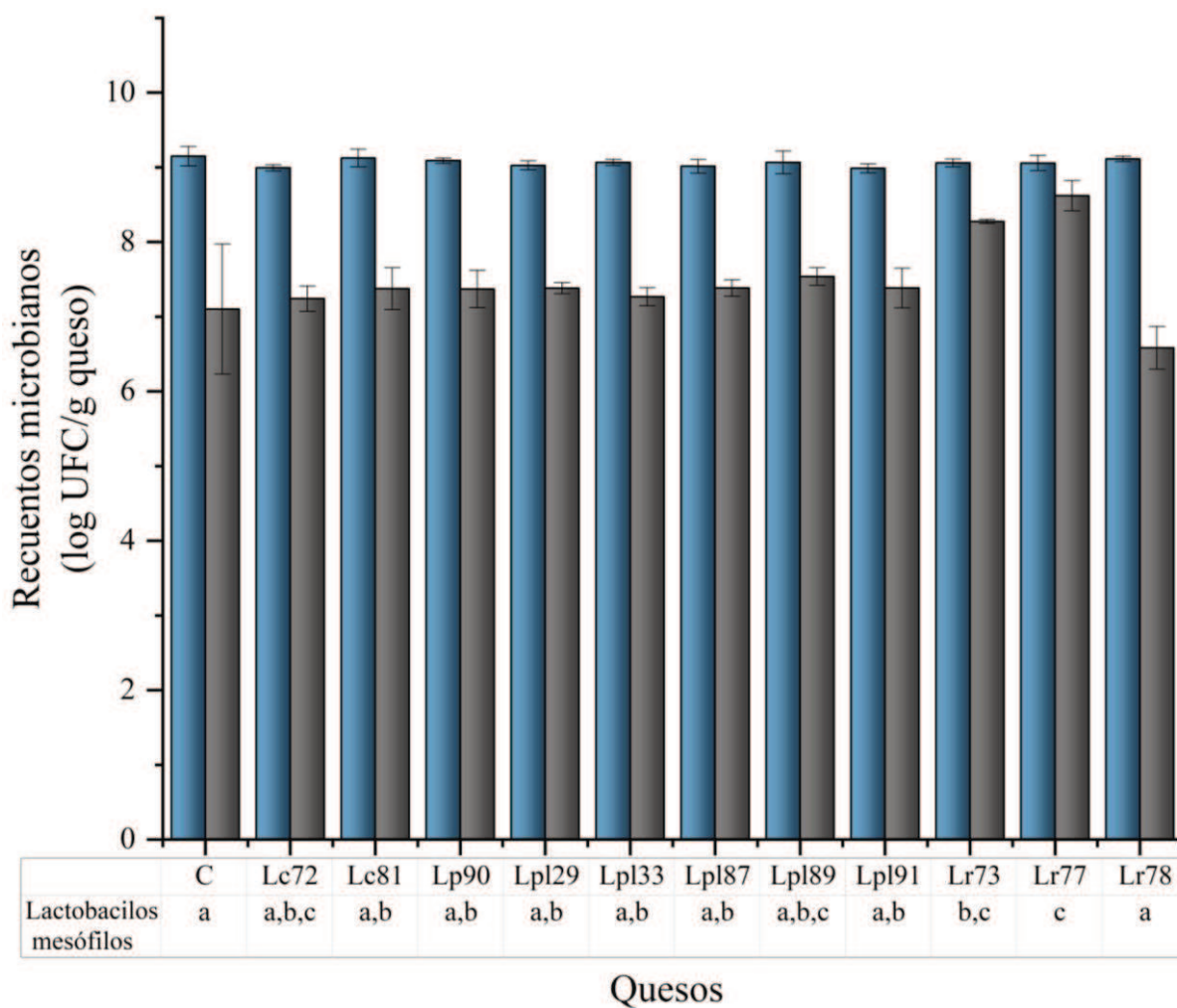
En cuanto a los quesos con fermentos adjuntos, los recuentos de lactobacilos mesófilos alcanzaron niveles cercanos a 7,3 log UFC/g a los 90 días de maduración, excepto en los quesos con las cepas de *L. rhamnosus* estudiadas. En efecto, los recuentos en quesos con *L. rhamnosus* 77 y *L. rhamnosus* 73 alcanzaron mayores niveles (8,4 log UFC/g), y en quesos con *L. rhamnosus* 78, los niveles fueron menores (6,6 log UFC/g). Si bien no se utilizaron métodos específicos para cada cepa ensayada, consideramos que los resultados de la enumeración de lactobacilos mesófilos representan adecuadamente la población del fermento adjunto en los quesos experimentales. Esta afirmación es posible por lo siguiente: en cada placa se comprobó que la morfología macroscópica de las colonias fue homogénea (color, forma, elevación, borde); asimismo, la morfología microscópica, observada mediante un microscopio con contraste de fase (100x), fue similar a cada una de las cepas. Por otro lado, las cepas ensayadas fueron aisladas de quesos, lo que demuestra su habilidad para sobrevivir en quesos, y fueron inoculadas en niveles elevados en la leche de elaboración ( $10^6$  UFC/mL), lo que conlleva a una alta probabilidad de dominar la microbiota durante la maduración.

Los quesos con los mayores recuentos de lactobacilos mesófilos fueron los de menor pH. Si bien ambas observaciones pueden estar relacionadas, se deberían realizar ensayos adicionales con un menor inóculo y verificar la influencia en la acidificación.

En los quesos control, los recuentos de lactobacilos mesófilos, que representan a las NSLAB, fueron de 7 log UFC/g a los 90 días de maduración, lo que coincide con lo reportado en trabajos

previos; a diferencia de lo observado en los quesos experimentales, las colonias en este caso presentaron una morfología macroscópica heterogénea. En quesos Pategrás sin cultivos adjuntos, se encontraron niveles de NSLAB de 8 log UFC/g a los 60 días de maduración (Milesi et al., 2009). En quesos Pategrás comerciales, el recuento de NSLAB a los 10 días de maduración estuvo entre 5,9 y 7,7 log UFC/g, lo que se incrementó durante la maduración manteniéndose en todos los casos por encima de 7 log UFC/g (Bude-Ugarte et al., 2006).

Las bacterias coliformes no fueron detectadas en ningún queso mientras que los recuentos de hongos y levaduras resultaron < 2 log UFC/g de queso.



**Figura 19.** Niveles de recuentos de bacterias lácticas totales (■) y de lactobacilos mesófilos (■) en quesos semiduros miniatura a los 90 días de maduración. En la tabla inferior se muestran los grupos de medias homogéneas según el test de Tukey: resultados con diferente letra, difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Los niveles (log UFC/g de queso) se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de quesos.

### 4.2.3. Niveles de carbohidratos y ácidos orgánicos

Se cuantificaron cuatro ácidos orgánicos (láctico, acético, cítrico y orótico), y dos carbohidratos (lactosa y galactosa) en los quesos control y experimentales a los 90 días de maduración (Figura 20).

Según el análisis de ANOVA, se hallaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para todos los compuestos analizados. Los azúcares presentes en los quesos, principalmente la lactosa residual y la galactosa producida a partir de la misma, son una de las fuentes de energía que pueden utilizar las NSLAB, al igual que los fermentos adjuntos, para su crecimiento en los quesos (Williams et al., 2000). En este sentido, se observó que todas las cepas metabolizaron parcialmente la galactosa, que no es consumida por el fermento primario *S. thermophilus*, como ya ha sido mencionado previamente. El nivel de este carbohidrato fue significativamente menor en la mayoría de los quesos experimentales con relación al control, excepto en los quesos con las cepas Lc81, Lp90, Lpl87, Lr78. También se observó un incremento del ácido láctico en todos los quesos experimentales; ( $p < 0,05$ ) este cambio fue significativo en los quesos elaborados con las cepas Lpl 29, Lpl87, Lpl89, Lc72, Lr73 y Lr77, con respecto al control. Las últimas tres cepas también disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) el nivel de lactosa en relación al control; estos resultados se correlacionan con la disminución significativa de pH en estos quesos.

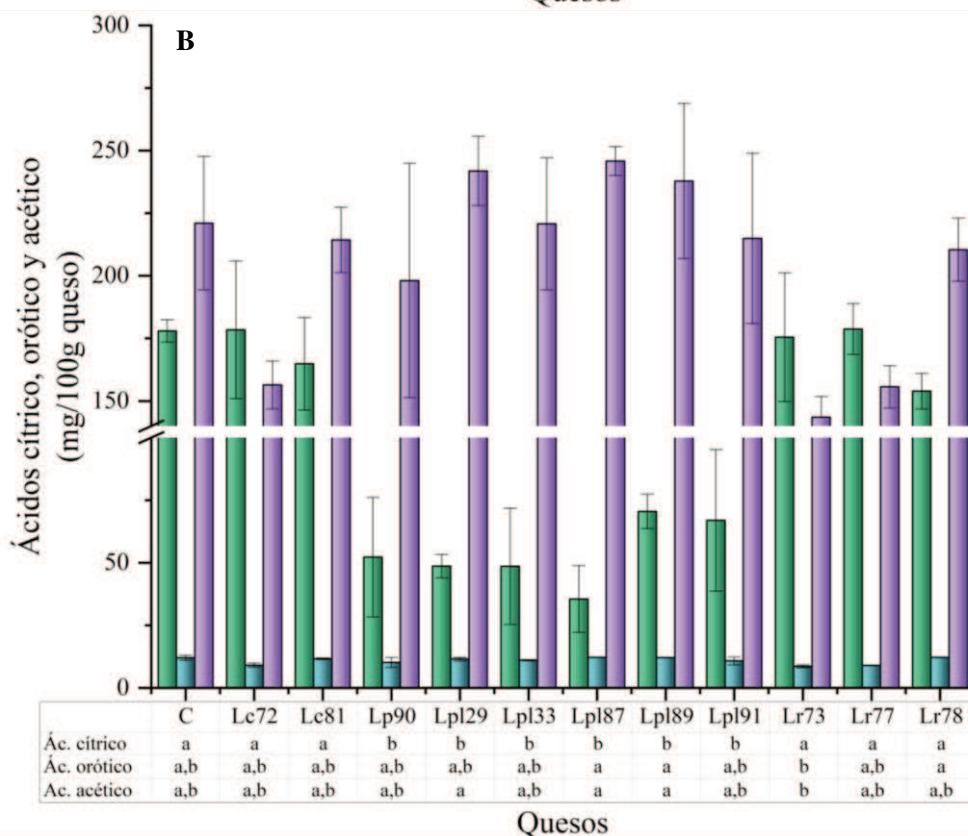
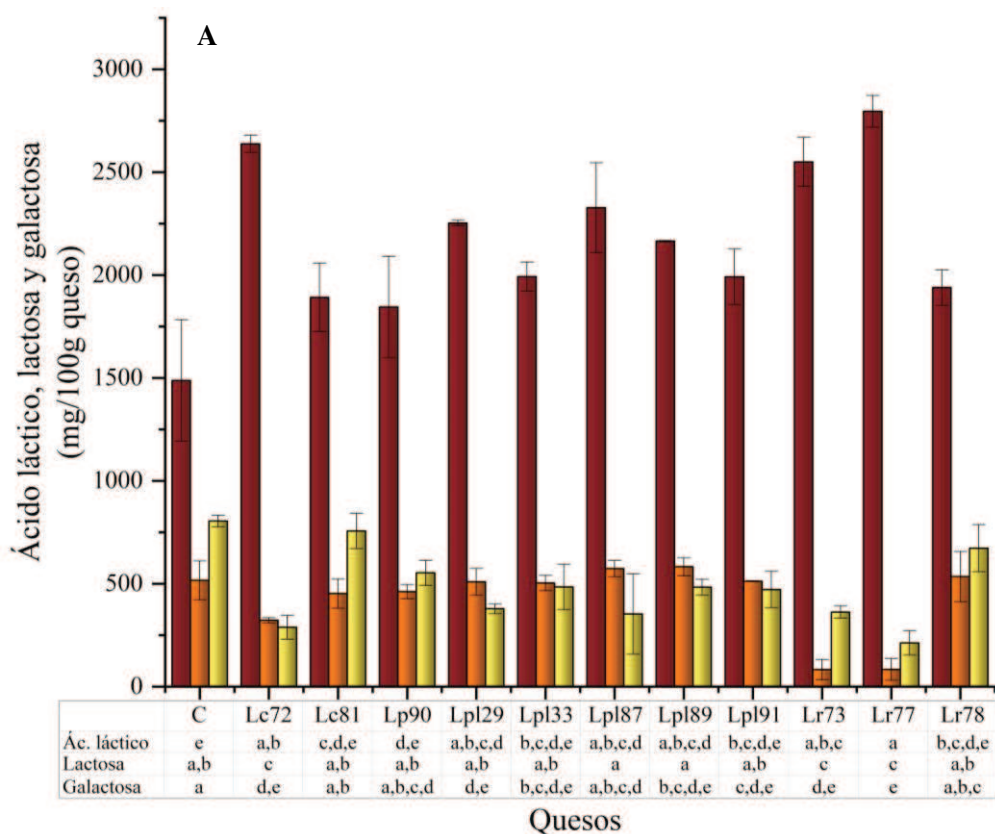
En los quesos madurados por bacterias, la evolución de las poblaciones microbianas, tanto del fermento primario como de las NSLAB, depende de las condiciones ambientales y los nutrientes disponibles durante la elaboración y la maduración, lo que afecta la acidificación, la transformación bioquímica de los sustratos y el desarrollo del sabor y aroma (Bautista-Gallego et al., 2014). Además de la lactosa y galactosa, algunas cepas de lactobacilos de origen NSLAB también pueden utilizar el citrato como fuente de energía, dando como resultado distintos productos como acetato, lactato, succinato, aspartato, así como también compuestos volátiles de interés en este tipo de quesos como diacetilo y acetoína (Palles et al., 1998; Medina et al., 2000; Dudley et al., 2005). En particular, se hallaron niveles menores de ácido cítrico en los quesos con las cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* (Lpl29, Lpl33, Lpl87, Lpl89 y Lpl91) y con *Lacticaseibacillus paracasei* 90 en relación al queso control, lo que indica que las mismas fueron capaces de metabolizarlo. Estos resultados se correlacionan con la mayor producción de acetoína y diacetilo en estos quesos, como se describe más adelante. Skeie et al. (2008a) evaluaron fermentos adjuntos de dos especies de lactobacilos mesófilos, *L. paracasei* ssp. *paracasei* y *L. plantarum*, en queso tipo holandés. En dicho trabajo se encontró que estos fermentos produjeron distintos compuestos a partir del citrato residual, y que esto también fue variable según el starter utilizado: la primera cepa produjo lactato, mientras que la segunda produjo succinato y aspartato, a partir del cual produjo acetoína. De la misma manera, Dudley et al. (2005) reportaron que las cepas *L. casei*, *L. zeae* y *L. rhamnosus* produjeron acetato, lactato y etanol a partir del citrato,

mientras que las cepas de *L. plantarum* produjeron aspartato, acetato, lactato y succinato. En nuestro caso, no observamos la producción de succinato ni de etanol en ninguno de los quesos, y tampoco observamos una influencia significativa en el metabolismo del citrato por parte de las cepas de *L. rhamnosus* y *L. casei* ensayadas. Esto puede ser consecuencia de las diferentes actividades enzimáticas de las cepas estudiadas en comparación con los trabajos citados, aunque también es importante resaltar que la expresión y actividad de las enzimas involucradas puede diferir según la composición y condiciones presentes en la matriz estudiada (Pedersen et al., 2013).

Los niveles de ácido acético y orótico en cada queso experimental fueron similares al control. Se encontraron diferencias únicamente entre algunos quesos experimentales; el acético fue mayor en los quesos con las cepas Lpl87, Lpl89 y Lpl29 y menor en el queso con Lr73, mientras que el orótico también fue menor en este queso y mayor en aquellos con las cepas Lpl87, Lpl89 y Lr78. El ácido acético puede provenir de la degradación de citrato, lactato y aminoácidos (Liu, 2003), mientras que el orótico puede ser utilizado por algunas BAL para su crecimiento en quesos (Upreti et al., 2006).

Los dos primeros componentes principales (CP) del ACP realizado sobre los resultados de carbohidratos y ácidos orgánicos extrajo 85% de la varianza total. En la Figura 21 se presentan los gráficos de scores y loadings para los dos primeros CP. En el gráfico de scores se observa una separación de las muestras en dos grupos a lo largo del CP1: **1-** quesos con las cepas Lc72, Lr77 y Lr73 en el hemiplano negativo de CP1, caracterizados por el ácido láctico (que lo produjeron en mayor cantidad) y cítrico (que no lo consumieron), y **2-** el resto de los quesos en el hemiplano positivo de CP1, caracterizados por la lactosa, galactosa, ácido acético y orótico. Dentro de este último grupo se puede observar una separación de dos grupos a lo largo del CP2: **1-** quesos sin adjunto (control) y quesos con las cepas Lr78 y Lc81, que se ubicaron en el hemiplano positivo de CP1 y CP2, y se caracterizaron fundamentalmente por la galactosa (consumida en menores niveles); y **2-** quesos adicionados con las cepas de *L. plantarum* (Lpl29, Lpl33, Lpl87, Lpl89 y Lpl91) y con Lp90, que se ubicaron en el hemiplano positivo para CP1 y negativo para CP2, y se caracterizaron por el ácido orótico y lactosa (consumidos en menores niveles) y el ácido acético (mayor producción).

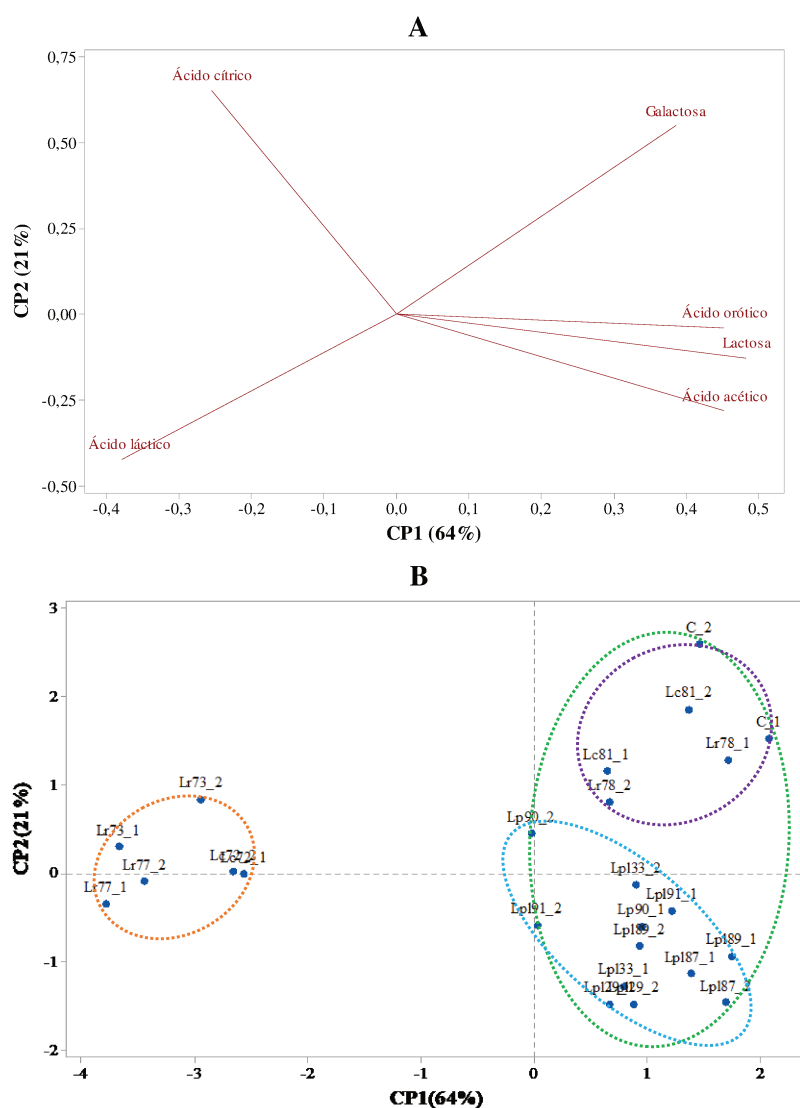




**Figura 20.** Niveles de carbohidratos (■, lactosa; ■, galactosa) y ácido láctico (■) (A), ácido cítrico (■), ácido orótico (■) y ácido acético (■) (B), en quesos semiduros miniatura a los 90 días de maduración. En la tabla inferior se muestran los grupos de medias homogéneas según el test de Tukey. <sup>a,b,c,d,e</sup>Resultados con diferente letra para un mismo compuesto difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Los niveles (mg/100 g de queso) se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de quesos.

El consumo de nutrientes presentes en el queso (lactosa, galactosa, citrato) y la producción de compuestos inhibidores (ácidos) representan una característica positiva de los fermentos adjuntos ya que son mecanismos de control de la microbiota contaminante y potencialmente perjudicial (Irlinger & Mounier, 2009; Settani & Moschetti, 2010). Por otro lado, el metabolismo de algunos de los ácidos con la consiguiente producción de compuestos volátiles de interés también es una característica deseable en estos fermentos (Khattab et al., 2019). A excepción de las cepas Lc81 y Lr78, cuyo perfil de azúcares y ácidos fue similar a los quesos control, el resto de las cepas demostró la capacidad de producir modificaciones favorables para su uso como cultivos adjuntos.

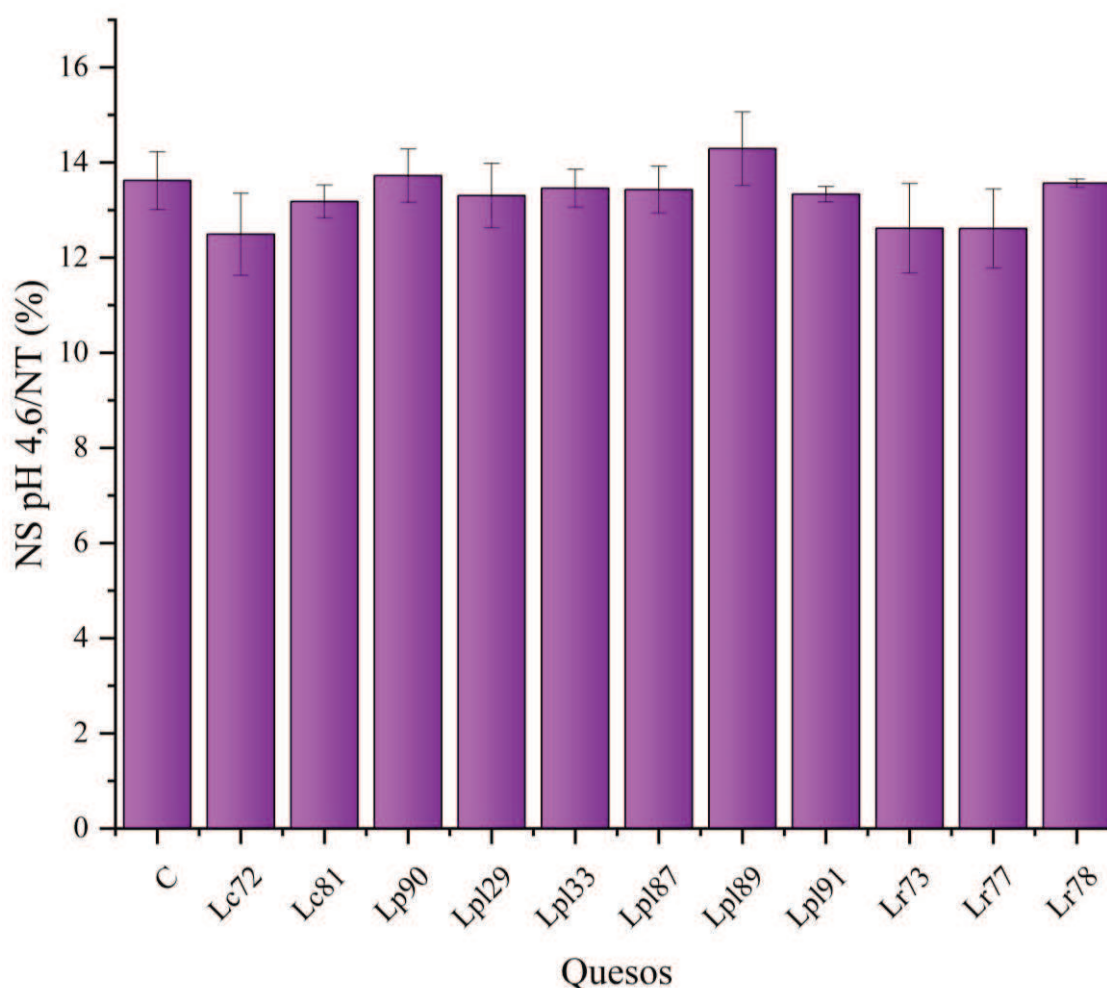
Sin embargo, la mayor producción de ácido láctico y menor pH causado por algunas de las cepas podría tener un impacto negativo en el sabor o textura, lo cual debería corroborarse con ensayos sensoriales y de textura en elaboraciones de queso a mayor escala.



**Figura 21.** Análisis de Componentes Principales (ACP) de los carbohidratos y ácidos orgánicos de los quesos semiduros miniatura. A.- Gráfico de loading de las variables analizadas para CP1 vs. CP2. B.- Gráfico de scores de las muestras de queso para CP1 vs. CP2. Las elipses encierran las muestras que se agrupan en el gráfico.

#### 4.2.4. Proteólisis

La fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 como proporción del nitrógeno total de los quesos es un indicador de la hidrólisis de las caseínas en péptidos grandes y medianos, conocido como proteólisis primaria. En la Figura 22 se muestran los valores de esta fracción para cada uno de los quesos elaborados. No se observaron diferencias significativas entre los quesos control y experimentales ( $p \geq 0,05$ ) aun cuando se observaron cambios en el contenido de humedad y pH debido al uso de cultivos adjuntos más acidificantes. Estas variables han demostrado tener una influencia significativa en la actividad de las enzimas proteolíticas (Sousa et al., 2001; Upadhyay et. al., 2004).



**Figura 22.** Contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), expresados como porcentaje del nitrógeno total (NT), de los quesos semiduros miniatura luego 90 días de maduración.

Las reacciones proteolíticas que ocurren durante la elaboración y la maduración del queso se consideran los principales contribuyentes al desarrollo de la textura y el sabor (McSweeney & Sousa, 2000), y por ello tienen un impacto directo en la calidad del producto. Los lactobacilos mesófilos en los quesos, tanto aquellos de los fermentos adjuntos o de las NSLAB, presentan, por lo general, una débil o baja actividad proteolítica sobre las caseínas, por lo que su influencia en

los niveles de NS a pH 4,6 es limitada (Crow et al., 2001; Di Cagno et al., 2006; Morea et al., 2007). Por el contrario, la enzima coagulante residual, retenida en la matriz del queso, cataliza la hidrólisis de la  $\alpha_1$ -caseína, con la producción de un péptido denominado  $\alpha_1$ -I-caseína, un hecho que tiene un impacto importante sobre los niveles de NS a pH 4,6 (Hesari et al., 2006; Hynes et al., 2001b; O'Mahony et al., 2005). Los resultados obtenidos sugieren que la retención de la enzima coagulante y su actividad fue similar en todos los quesos ensayados, y que las cepas evaluadas no tuvieron una actividad proteolítica significativa.

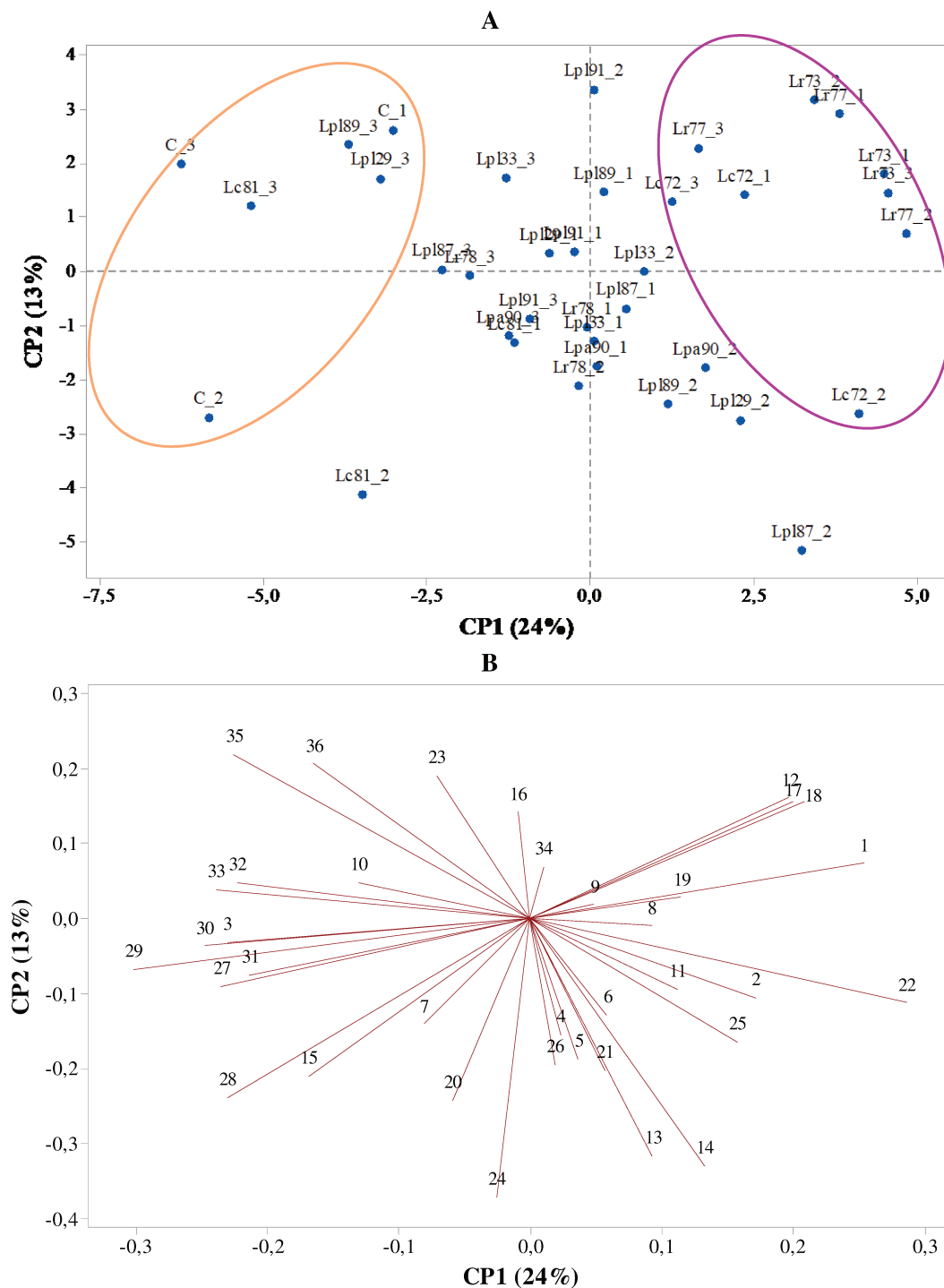
Los lactobacilos mesófilos, que constituyen la mayor parte de las NSLAB en quesos, se destacan en general por su actividad peptidolítica que conduce a un aumento de los niveles de péptidos pequeños y aminoácidos libres (AA), considerada como proteólisis secundaria en el queso (Gobbetti et al., 2015). Esto podría conducir a cambios favorables tales como la aceleración de la maduración y el mejoramiento del flavour por el aporte de algunos oligopéptidos y AA, pero sobre todo mediante un efecto indirecto al proporcionar AA como precursores de compuestos volátiles (Ardö, 2006; Upadhyay et al., 2004; Yvon, 2006).

Los perfiles peptídicos de los quesos se muestran en la Figura 24. Mediante una comparación visual de los cromatogramas, se detectaron algunas diferencias entre los quesos. En aquellos en los cuales se utilizó como cultivo adjunto Lc72, Lr73 y Lr77 se observó principalmente un aumento del pico con tiempo de retención de 58 min y una disminución de los picos cuyos tiempos de retención se encontraban entre los 72-76 min (péptidos más hidrofóbicos). Este último cambio se observó también, aunque menos marcado, para el resto de las cepas, excepto la Lc81 y Lr78. Asimismo, se observaron modificaciones entre los quesos experimentales y el queso control en los picos en torno a los 67 minutos del cromatograma, y en los picos iniciales. Los picos correspondientes a los tiempos de retención de 82, 86 y 87 min aproximadamente fueron identificados como las proteínas de suero  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina A y B, respectivamente. Estas proteínas se mantuvieron en niveles similares en todos los quesos.

Los cambios cuantitativos en los perfiles se evaluaron mediante ACP de las áreas de los picos. Los gráficos de scores y loadings de CP1 frente a CP2 se muestran en la Figura 23.

Los dos primeros CP explicaron el 55 % de la varianza total. En la gráfica de scores se puede observar una separación parcial entre algunos quesos a lo largo del CP1. Los quesos control se encuentran ubicados en el hemiplano negativo del CP1, mientras que en el lado opuesto (hemiplano positivo de CP1) están los quesos con las cepas Lc72, Lr73 y Lr77. Estos últimos quesos se caracterizaron principalmente por mayores niveles de los picos de la primera parte del cromatograma (más hidrofílicos) y menores niveles de los picos ubicados en la parte final del perfil, que son más hidrofóbicos. Lo opuesto caracterizó a los quesos control. El resto de los quesos se ubicó en la zona intermedia entre estos dos grupos. Estos resultados indican que las

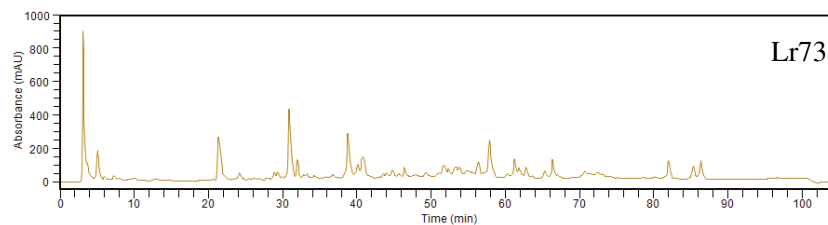
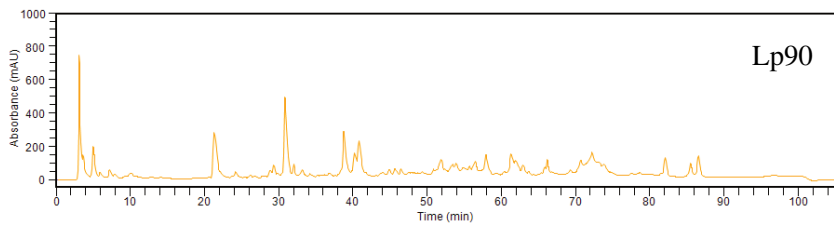
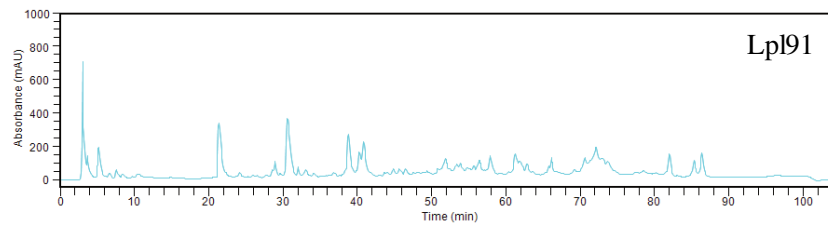
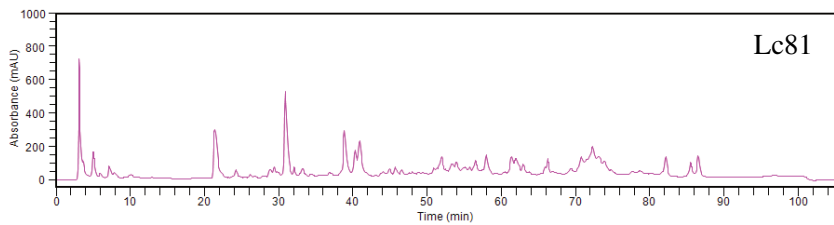
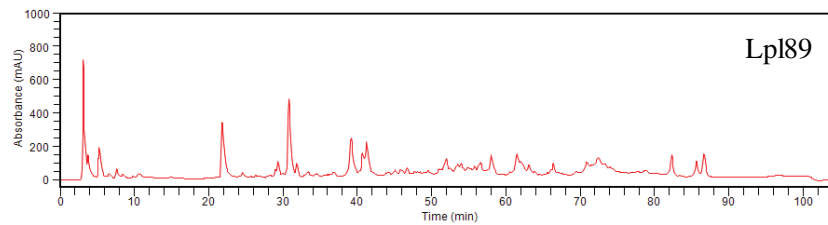
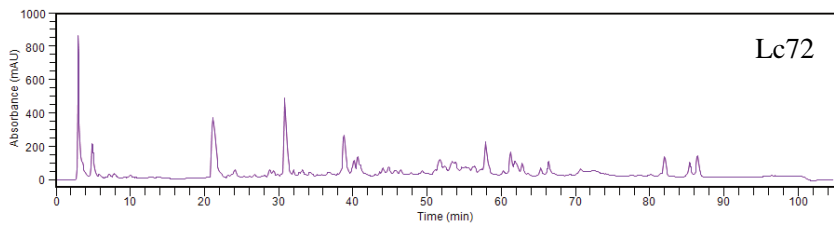
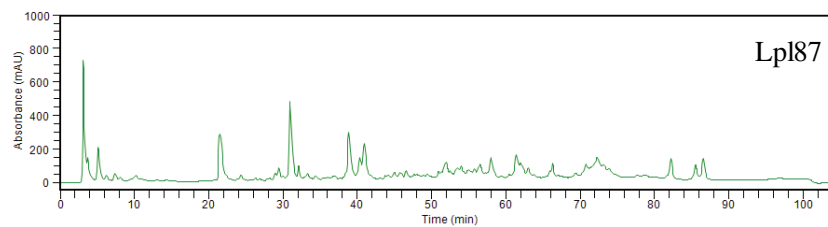
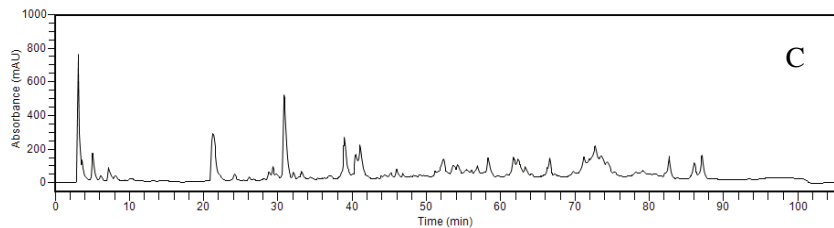
cepas mencionadas tuvieron una actividad peptidolítica mayor que el resto o que su actividad se vio favorecida por los cambios de pH verificados en estos quesos, lo que condujo a modificaciones favorables en el perfil peptídico. En este sentido, los péptidos hidrofóbicos pueden otorgar sabor amargo y afectar negativamente las propiedades sensoriales de los quesos (Lemieux & Simard, 1992), lo que debería ser confirmado mediante un adecuado análisis sensorial.

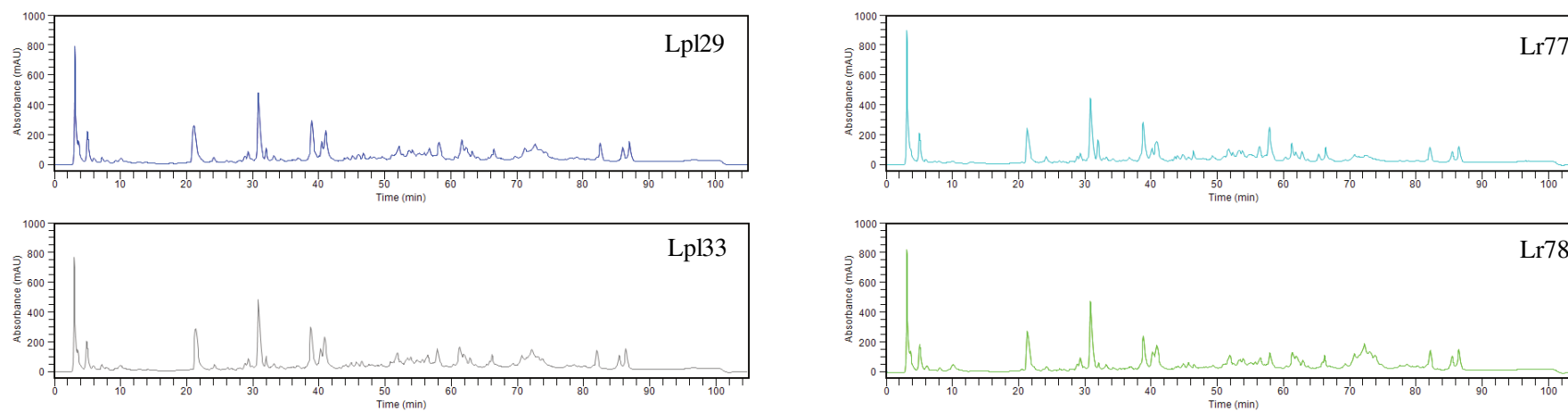


**Figura 23.** Análisis de Componentes Principales (ACP) de los perfiles peptídicos de los quesos semiduros miniatura. A.- Gráfico de loading de las variables analizadas para CP1 vs. CP2. B- Gráfico de scores de las muestras de queso para CP1 vs. CP2. Las elipses encierran las muestras que se agrupan en el gráfico

Algunas de las cepas estudiadas en estos quesos semiduros miniatura fueron evaluadas en quesos Cremoso y Pategrás elaborados en planta piloto, en los que se estudió la proteólisis. En particular, las cepas *L. rhamnosus* (73 y 77) modificaron los perfiles peptídicos y aumentaron la concentración de aminoácidos, lo que sugiere una aceleración en la maduración del queso (Milesi et al., 2009, 2010), tal como se observó en los quesos semiduros ensayados en esta experiencia. La influencia de *L. paracasei* 90 y *L. plantarum* 91 en las mismas variedades de queso fue menor, verificándose únicamente un incremento de algunos aminoácidos. En otro estudio llevado a cabo en un modelo de queso blando, se verificó un aumento de los niveles de aminoácidos debido a la actividad peptidolítica de *L. paracasei* 90 y *L. casei* 72, siendo la influencia más marcada para esta última cepa (Peralta et al., 2016a), al igual que lo observado en los quesos semiduros elaborados en esta experiencia.

La evaluación de cultivos adjuntos en combinación con el fermento primario utilizado en cada variedad de queso es importante ya que pueden existir interacciones microbianas que potencien o inhiban alguna actividad particular (Hynes et al., 2001a, 2003b). Además, es imprescindible la evaluación de cada cepa en forma individual para caracterizar su impacto en las distintas características del queso, incluida la proteólisis, ya que la influencia puede ser cepa dependiente (Oneca et al., 2007).





**Figura 24.** Perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC de los extractos solubles de los doce quesos semiduros luego de 90 días de maduración. Se muestran los cromatogramas de una de las réplicas de elaboración; los cromatogramas de las otras réplicas fueron similares.



#### 4.2.5. Compuestos volátiles

Identificamos un total de 23 compuestos volátiles pertenecientes a las familias químicas de las cetonas (8), ésteres (2), aldehídos (3), alcoholes (5) y ácidos (5) en los quesos elaborados

La Tabla 12 muestra los valores de los compuestos identificados en cada uno de los quesos a los 90 días de maduración y los resultados del análisis de ANOVA y test de Tukey. La mayoría de los compuestos identificados presentaron niveles significativamente diferentes entre los distintos tipos de quesos.

Dentro del grupo de los alcoholes se pudieron determinar alcoholes primarios lineales como el etanol, y un alcohol ramificado, el 2-metil-1-propanol. También fueron identificados alcoholes secundarios tales como 2-pentanol y 2-octanol y dioles como el 2,3-butanodiol. Dentro del grupo de los aldehídos, se detectó el acetaldehído, 2-metil butanal y benzaldehído. En el grupo de los ésteres fueron detectados el acetato de etilo y el butanoato de etilo. En el grupo de los ácidos se detectaron: acético, butírico, hexanoico, octanoico y decanoico. El grupo más variado fue el de las cetonas. Se identificó 2-propanona, 2-butanona, 2-pentanona, 2-hexanona, 2-heptanona, 2-nonanona, diacetilo (2,3-butanodiona) y acetoína (3-hidroxi-2-butanona).

En el ACP de los compuestos volátiles, los dos primeros componentes principales extrajeron el 55% de la varianza total con CP1 y CP2 describiendo el 38 y el 17 % de la variabilidad, respectivamente. En la Figura 25, se presentan los gráficos de scores y loadings para CP1 vs. CP2. CP1 se asoció positivamente con la abundancia de muchas de las cetonas, incluidas la acetoína y el diacetilo, aldehído aromático como el benzaldehído y, en menor medida, algunos ésteres, mientras que se asoció negativamente con aldehídos lineales, y alcoholes (2-metilpropanol y 2-pentanol); mientras que CP2 se asoció positivamente con ácidos y negativamente con algunos alcoholes (2-metilpropanol y 2-pentanol y 2,3-butanodiol). En el gráfico de scores se observa la agrupación de los quesos de acuerdo a los compuestos volátiles identificados en tres conjuntos: **1-** quesos elaborados sin adjunto y con las cepas Lr78 y Lc81, los cuales se ubicaron en el hemiplano negativo del CP1 y CP2, y se caracterizaron por los alcoholes y 2-metilbutanal; **2-** quesos adicionados de las cepas Lc72, Lr77 y Lr73, que se separaron del resto en el hemiplano negativo de CP1 y positivo de CP2, y se asocian principalmente a los compuestos identificados dentro de las familias de los ácidos y los aldehídos; **3-** quesos adicionados de las cepas de Lpl29, Lpl33, Lpl87, Lpl89 y Lpl91 y Lp90, que se ubicaron en el hemiplano positivo para CP1 y en ambos hemiplanos de CP2 y se asociaron a los compuestos de la familia de las cetonas, principalmente a los dos compuestos de mayor interés diacetilo y acetoína.

La capacidad de cepas de lactobacilos mesófilos para generar compuestos que aportan al flavour se ha documentado en trabajos anteriores. Pogačić et al. (2016) evaluaron la producción de compuestos volátiles de cepas de *Leuconostoc* spp. y *Lactobacillus* spp. (incluidas *L. paracasei*

y *L. rhamnosus*) en un medio a base de cuajada como un modelo de maduración de queso. Las cepas de las dos especies mencionadas fueron las principales productoras de compuestos dicarbonílicos o relacionados, especialmente diacetilo y 2,3-pentanodiona, moléculas asociadas a los atributos de flavour manteca y crema. Skeie et al. (2008b) también encontraron que la adición de *L. plantarum* INF15D degradó el citrato principalmente a aspartato, a partir del cual se produjo acetoína y diacetilo. En la misma línea, Stefanovic et al. (2017) estudiaron diez cepas del grupo de *L. casei* en función de su potencial para contribuir al flavour en dos sistemas modelo: mezcla de aminoácidos libres y un modelo de cuajada procesada. Estos investigadores encontraron en estas cepas una capacidad diferente para metabolizar los aminoácidos (AA) y producir una variedad de compuestos volátiles, no sólo en presencia de AA solos, sino también en presencia de otros sustratos disponibles en la cuajada procesada, como la lactosa, utilizando varias rutas metabólicas (catabolismo de AA, glucólisis, lipólisis).

En nuestra experiencia, el perfil de compuestos volátiles de los quesos con *L. plantarum* fue muy similar, ya que todas las muestras con las 5 cepas ensayadas se ubicaron juntas en el gráfico de scores. Por el contrario, en el caso de los quesos con *L. rhamnosus*, los perfiles variaron según la cepa: los quesos con Lr78 se agruparon con el control, mientras que los quesos con Lr73 y Lr77 se agruparon por separado. La producción cepa dependiente de compuestos volátiles se ha informado en trabajos previos (Pogačić et al., 2016; Sgarbi et al., 2013). Randazzo et al. (2021) encontraron que las propiedades tecnológicas y actividades aminopeptidasa de 27 cepas aisladas de queso Provola dei Nebrodi (queso semiduro de pasta hilada), también fueron dependientes de la cepa. Entre las cepas estudiadas por estos investigadores, seleccionaron *Lacticaseibacillus paracasei* PN 76 y *Limosilactobacillus fermentum* PN 101 para su uso como cultivos adjuntos en quesos ya que afectaron positivamente el desarrollo del sabor y modificaron los perfiles de compuestos volátiles. Los investigadores además sugirieron que las cepas seleccionadas pueden contribuir a otorgar un perfil sensorial único y diferenciado al queso Provola dei Nebrodi tradicional. Otros autores (Poveda et al., 2014) lograron intensificar y mejorar el sabor del queso Manchego elaborado con leche pasteurizada y el agregado de la cepa *L. paracasei* CECT7882 y consiguieron que adquiriera características similares a las del queso tradicional obtenido a partir de leche cruda. Estos trabajos ponen en evidencia la potencialidad de utilizar cepas de origen NSLAB como fermentos adjuntos para mejorar el perfil sensorial de los quesos, lo que nuestros resultados confirman para varias de las cepas ensayadas.

**Tabla 12.** Compuestos volátiles (expresados en unidades arbitrarias de áreas /1000) en quesos semiduros miniatura a los 90 días de maduración.

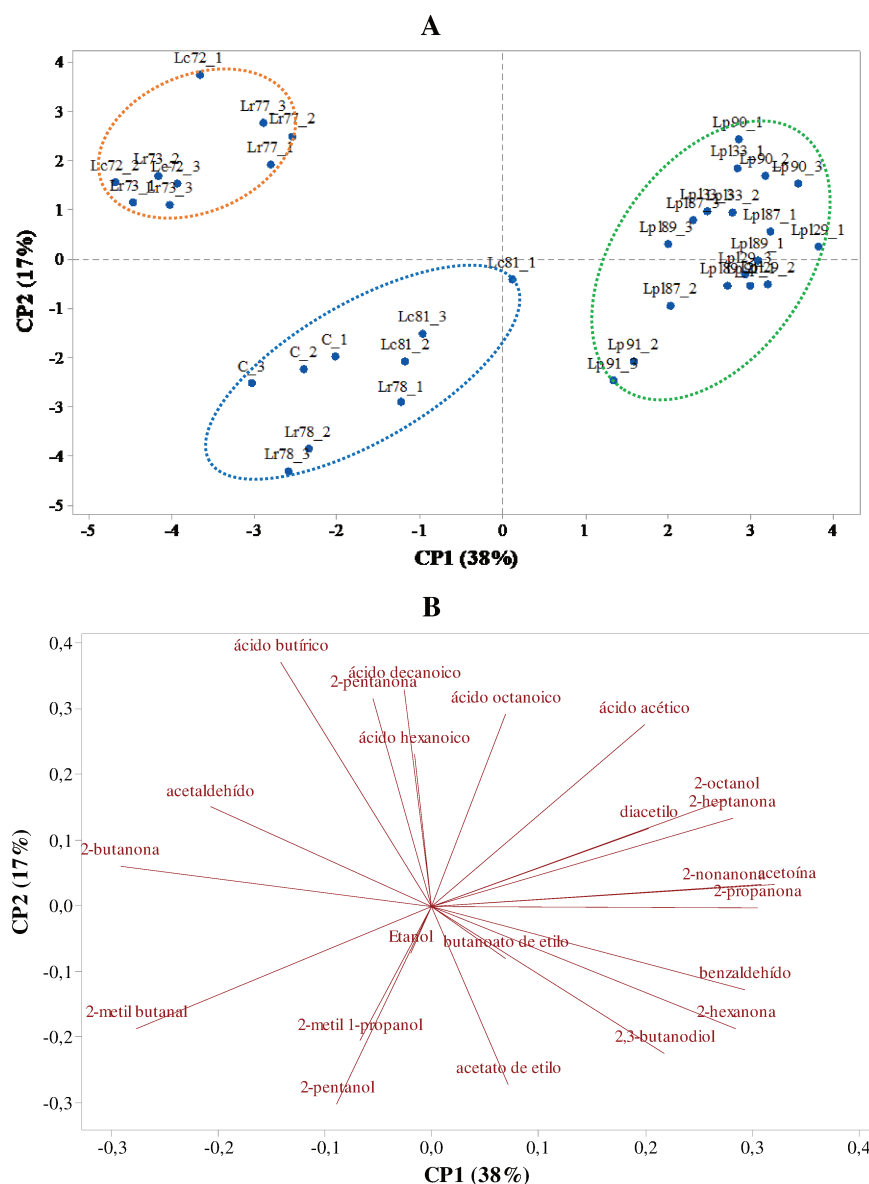
Compuestos volátiles	Quesos												Sig.
	C	Lc72	Lc81	Lp90	Lpl29	Lpl33	Lpl87	Lpl89	Lpl91	Lr73	Lr77	Lr78	
<b>Cetonas†</b>	1111,3 <sup>d</sup>	1114,0 <sup>d</sup>	1433,6 <sup>c</sup>	2451,9 <sup>a</sup>	2241,2 <sup>a,b</sup>	2153,9 <sup>b</sup>	2463,7 <sup>a</sup>	2283,4 <sup>a,b</sup>	2202,1 <sup>b</sup>	1082,9 <sup>d</sup>	1172,1 <sup>d</sup>	1171,5 <sup>d</sup>	*
2-propanona	46,9 <sup>c,d</sup>	33,8 <sup>d,e</sup>	48,6 <sup>c,d</sup>	95,5 <sup>a</sup>	94,4 <sup>a</sup>	78,4 <sup>a,b</sup>	62,4 <sup>b,c</sup>	90,7 <sup>a</sup>	94,8 <sup>a</sup>	22,1 <sup>e</sup>	37,4 <sup>d,e</sup>	31,5 <sup>d,e</sup>	*
2-butanona	69,2 <sup>c,d</sup>	91,4 <sup>b</sup>	69,1 <sup>c,d</sup>	47,2 <sup>e</sup>	47,2 <sup>e</sup>	52,9 <sup>d,e</sup>	40,3 <sup>e</sup>	50,9 <sup>e</sup>	73,5 <sup>c</sup>	131,4 <sup>a</sup>	118,5 <sup>a</sup>	92,7 <sup>b</sup>	*
2-pentanona	25,9 <sup>d,e</sup>	47,1 <sup>b,c</sup>	32,7 <sup>c,d,e</sup>	45,6 <sup>b,c</sup>	39,1 <sup>b,c,d</sup>	50,0 <sup>b</sup>	34,8 <sup>b,c,d,e</sup>	37,8 <sup>b,c,d</sup>	45,4 <sup>b,c</sup>	44,9 <sup>b,c</sup>	101,3 <sup>a</sup>	20,4 <sup>e</sup>	*
Diacetilo	102,0 <sup>c,d,e</sup>	76,5 <sup>d,e</sup>	143,8 <sup>a,b</sup>	140,3 <sup>a,b</sup>	169,8 <sup>a</sup>	124,9 <sup>b,c</sup>	106,1 <sup>c,d</sup>	139,6 <sup>b</sup>	102,9 <sup>c,d,e</sup>	86,1 <sup>d,e</sup>	142,8 <sup>a,b</sup>	75,4 <sup>e</sup>	*
2-hexanona	9,8 <sup>b</sup>	nd <sup>c</sup>	18,9 <sup>a</sup>	16,1 <sup>a</sup>	17,2 <sup>a</sup>	17,4 <sup>a</sup>	18,0 <sup>a</sup>	14,5 <sup>a,b</sup>	16,1 <sup>a</sup>	nd <sup>c</sup>	nd <sup>c</sup>	9,9 <sup>b</sup>	*
2-heptanona	45,8 <sup>d</sup>	46,3 <sup>d</sup>	57,5 <sup>d</sup>	107,5 <sup>a</sup>	85,9 <sup>b,c</sup>	116,9 <sup>a</sup>	103,9 <sup>a,b</sup>	86,1 <sup>b,c</sup>	107,1 <sup>a</sup>	45,1 <sup>d</sup>	78,4 <sup>c</sup>	40,0 <sup>d</sup>	*
Acetoína	767,0 <sup>e</sup>	770,3 <sup>e</sup>	1014,1 <sup>d</sup>	1926,4 <sup>a,b</sup>	1712,8 <sup>b,c</sup>	1642,3 <sup>c</sup>	2026,4 <sup>a</sup>	1787,7 <sup>b,c</sup>	1693,0 <sup>c</sup>	713,7 <sup>e</sup>	644,0 <sup>e</sup>	842,5 <sup>d,e</sup>	*
2-nonanona	44,7 <sup>b,c</sup>	48,6 <sup>b,c</sup>	48,9 <sup>b,c</sup>	73,4 <sup>a</sup>	74,7 <sup>a</sup>	71,2 <sup>a</sup>	71,7 <sup>a</sup>	76,1 <sup>a</sup>	69,3 <sup>a</sup>	39,7 <sup>c</sup>	49,7 <sup>b,c</sup>	59,0 <sup>a,b</sup>	*
<b>Ésteres†</b>	29,7 <sup>b,c,d</sup>	33,0 <sup>a,b,c,d</sup>	39,1 <sup>a</sup>	32,6 <sup>a,b,c,d</sup>	37,7 <sup>a,b</sup>	26,9 <sup>c,d</sup>	28,5 <sup>c,d</sup>	40,0 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a,b,c,d</sup>	26,2 <sup>d</sup>	26,0 <sup>d</sup>	35,3 <sup>a,b,c</sup>	*
Acetato de etilo	12,1 <sup>c</sup>	13,0 <sup>b,c</sup>	14,9 <sup>a,b,c</sup>	12,4 <sup>c</sup>	18,5 <sup>a</sup>	12,0 <sup>c</sup>	11,5 <sup>c</sup>	14,1 <sup>a,b,c</sup>	14,9 <sup>a,b,c</sup>	10,6 <sup>c</sup>	11,7 <sup>c</sup>	17,8 <sup>a,b</sup>	*
Butanoato de etilo	17,6 <sup>c</sup>	20,0 <sup>a,b,c</sup>	24,2 <sup>a,b</sup>	20,2 <sup>a,b,c</sup>	19,1 <sup>b,c</sup>	14,9 <sup>c</sup>	17,0 <sup>c</sup>	26,0 <sup>a</sup>	16,4 <sup>c</sup>	15,6 <sup>c</sup>	14,3 <sup>c</sup>	17,5 <sup>c</sup>	*
<b>Aldehídos†</b>	66,7 <sup>a</sup>	57,7 <sup>a,b,c</sup>	54,5 <sup>b,c</sup>	59,6 <sup>a,b</sup>	59,2 <sup>a,b</sup>	46,2 <sup>c</sup>	49,2 <sup>b,c</sup>	56,1 <sup>a,b,c</sup>	58,1 <sup>a,b,c</sup>	53,3 <sup>b,c</sup>	50,2 <sup>b,c</sup>	58,8 <sup>a,b</sup>	*
Acetaldehído	11,9 <sup>b</sup>	17,1 <sup>a</sup>	8,8 <sup>b</sup>	8,7 <sup>b</sup>	9,8 <sup>b</sup>	8,4 <sup>b</sup>	9,1 <sup>b</sup>	10,0 <sup>b</sup>	8,9 <sup>b</sup>	10,5 <sup>b</sup>	11,5 <sup>b</sup>	8,7 <sup>b</sup>	*
2-metil butanal	46,7 <sup>a</sup>	40,7 <sup>a,b,c</sup>	39,1 <sup>a,b,c</sup>	33,7 <sup>b,c,d</sup>	32,4 <sup>b,c,d</sup>	30,4 <sup>c,d</sup>	29,6 <sup>d</sup>	31,4 <sup>c,d</sup>	36,4 <sup>a,b,c,d</sup>	42,8 <sup>a,b</sup>	38,7 <sup>a,b,c,d</sup>	42,8 <sup>a,b</sup>	*
Benzaldehído	8,1 <sup>c,d</sup>	nd <sup>e</sup>	6,6 <sup>d</sup>	17,2 <sup>a</sup>	17,0 <sup>a</sup>	7,4 <sup>d</sup>	10,5 <sup>b,c,d</sup>	14,7 <sup>a,b</sup>	12,8 <sup>a,b,c</sup>	nd <sup>e</sup>	nd <sup>e</sup>	7,3 <sup>d</sup>	*
<b>Alcoholes†</b>	68,9 <sup>c,d</sup>	60,4 <sup>d</sup>	64,7 <sup>d</sup>	78,3 <sup>b,c</sup>	95,1 <sup>a</sup>	79,9 <sup>b,c</sup>	79,2 <sup>b,c</sup>	81,6 <sup>b,c</sup>	83,4 <sup>a,b</sup>	60,4 <sup>d</sup>	73,3 <sup>b,c,d</sup>	70,0 <sup>c,d</sup>	*
Etanol	5,9 <sup>c,d</sup>	9,3 <sup>b,c</sup>	10,0 <sup>b</sup>	6,0 <sup>c,d</sup>	17,2 <sup>a</sup>	0,0 <sup>e</sup>	5,4 <sup>d</sup>	9,2 <sup>b,c</sup>	6,4 <sup>b,c,d</sup>	8,0 <sup>b,c,d</sup>	8,1 <sup>b,c,d</sup>	9,3 <sup>b,c</sup>	*

2-metil 1-propanol	18,9	15,6	14,9	13,8	16,3	14,5	15,4	17,1	15,5	14,9	16,2	16,8	NS
2-pentanol	17,8 <sup>a,b</sup>	14,7 <sup>a,b</sup>	14,5 <sup>a,b</sup>	13,3 <sup>b</sup>	16,0 <sup>a,b</sup>	14,1 <sup>a,b</sup>	15,6 <sup>a,b</sup>	16,3 <sup>a,b</sup>	16,0 <sup>a,b</sup>	15,3 <sup>a,b</sup>	16,1 <sup>a,b</sup>	18,3 <sup>a</sup>	*
2-octanol	12,8 <sup>d</sup>	13,2 <sup>d</sup>	14,8 <sup>d</sup>	33,6 <sup>a,b</sup>	29,6 <sup>b,c</sup>	37,9 <sup>a</sup>	30,2 <sup>b,c</sup>	24,9 <sup>c</sup>	32,8 <sup>a,b</sup>	13,9 <sup>d</sup>	25,8 <sup>c</sup>	12,3 <sup>d</sup>	*
2,3-butanodiol	13,5 <sup>a,b</sup>	7,6 <sup>c,d</sup>	10,5 <sup>a,b,c,d</sup>	11,6 <sup>a,b,c,d</sup>	16,0 <sup>a</sup>	13,5 <sup>a,b</sup>	12,6 <sup>a,b,c,d</sup>	14,1 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a,b,c,d</sup>	8,3 <sup>b,c,d</sup>	7,0 <sup>d</sup>	13,3 <sup>a,b,c</sup>	*
<b>Ácidos</b> †	1649,4 <sup>d</sup>	2287,2 <sup>a,b</sup>	1859,5 <sup>d</sup>	2455,9 <sup>a,b</sup>	2472,7 <sup>a,b</sup>	2289,4 <sup>a,b</sup>	2476,6 <sup>a</sup>	2473,1 <sup>a</sup>	2176,6 <sup>a,b</sup>	2300,0 <sup>a,b</sup>	2349,9 <sup>a,b</sup>	1894,8 <sup>c,d</sup>	*
Ácido acético	953,4 <sup>f</sup>	1406,6 <sup>c,d</sup>	1129,2 <sup>e,f</sup>	1659,1 <sup>a,b</sup>	1731,8 <sup>a,b</sup>	1571,1 <sup>a,b,c</sup>	1785,8 <sup>a</sup>	1729,2 <sup>a,b</sup>	1518,6 <sup>b,c</sup>	1508,9 <sup>b,c</sup>	1588,8 <sup>a,b,c</sup>	1224,3 <sup>d,e</sup>	*
Ácido butírico	410,8 <sup>d</sup>	569,6 <sup>a</sup>	460,7 <sup>b,c,d</sup>	487,7 <sup>b,c</sup>	448,5 <sup>c,d</sup>	436,8 <sup>c,d</sup>	429,2 <sup>d</sup>	460,1 <sup>b,c,d</sup>	424,5 <sup>d</sup>	511,8 <sup>b</sup>	489,7 <sup>b,c</sup>	419,0 <sup>d</sup>	*
Ácido hexanoico	200,6 <sup>a,b</sup>	220,8 <sup>a</sup>	194,4 <sup>a,b</sup>	221,0 <sup>a</sup>	198,4 <sup>a,b</sup>	194,9 <sup>a,b</sup>	180,0 <sup>b</sup>	197,2 <sup>a,b</sup>	170,8 <sup>b</sup>	192,1 <sup>a,b</sup>	186,4 <sup>b</sup>	185,1 <sup>b</sup>	*
Ácido octanoico	57,2 <sup>a,b</sup>	60,1 <sup>a,b</sup>	55,0 <sup>a,b</sup>	62,3 <sup>a</sup>	62,2 <sup>a,b</sup>	61,7 <sup>a,b</sup>	52,8 <sup>a,b</sup>	57,8 <sup>a,b</sup>	48,4 <sup>b</sup>	55,6 <sup>a,b</sup>	56,6 <sup>a,b</sup>	49,6 <sup>a,b</sup>	*
Ácido decanoico	27,4 <sup>a,b</sup>	30,1 <sup>a</sup>	20,1 <sup>b,c,d</sup>	25,6 <sup>a,b</sup>	31,8 <sup>a</sup>	24,9 <sup>a,b,c</sup>	28,8 <sup>a</sup>	29,0 <sup>a</sup>	14,3 <sup>d</sup>	31,6 <sup>a</sup>	28,3 <sup>a</sup>	16,9 <sup>c,d</sup>	*

nd, no detectado; NS, No significativo;

†Valores del área total para cada familia química.

<sup>a,b,c,d,e,f</sup> Los valores de cada fila con diferente superíndice difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).



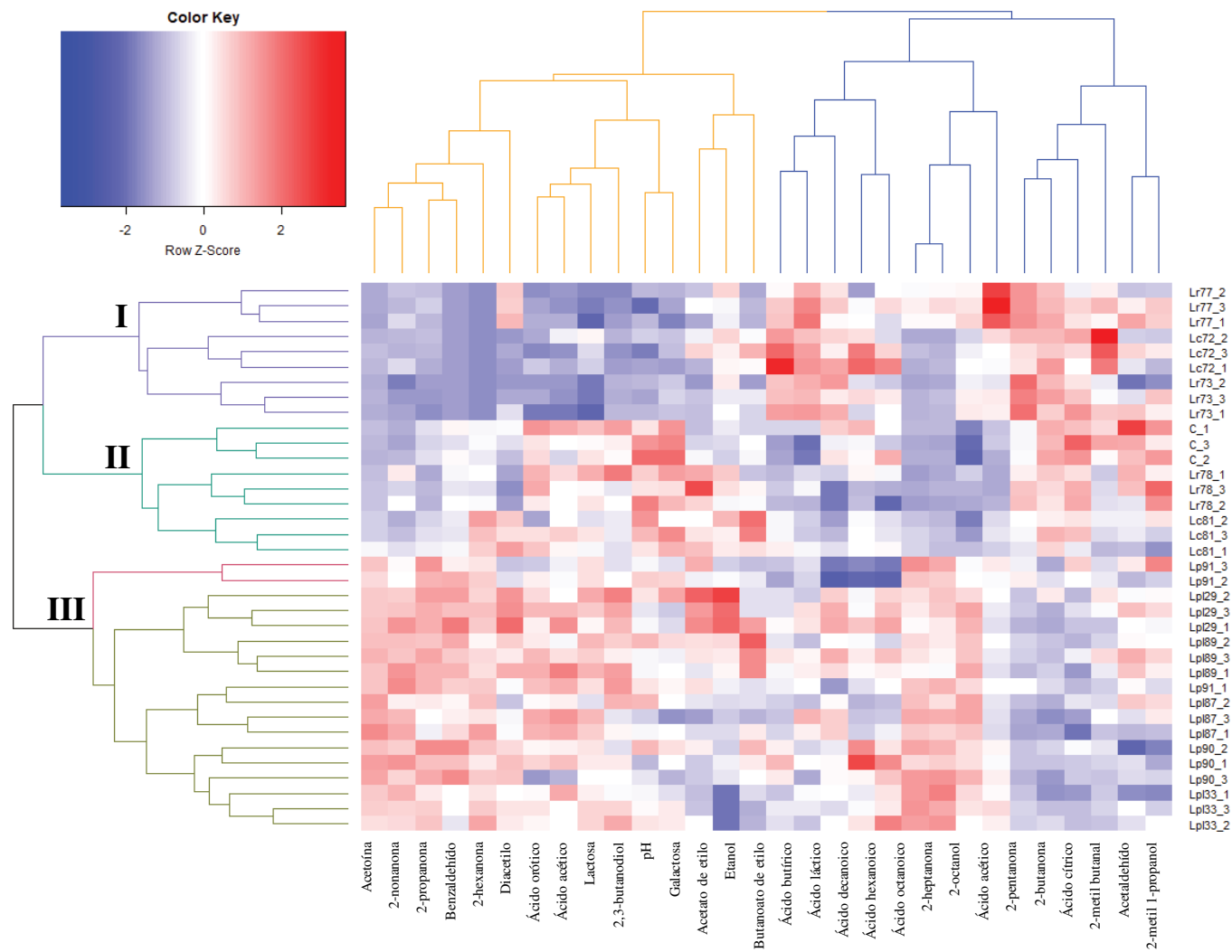
**Figura 25.** Análisis de Componentes Principales (ACP) de los compuestos volátiles detectados en los quesos semiduros miniatura. A.- Gráfico de loading de las variables analizadas para CP1 vs. CP2. B.- Gráfico de scores de las muestras de queso para CP1 vs. CP2. Las elipses encierran las muestras que se agrupan en el gráfico.

Los datos de compuestos volátiles, pH, ácidos orgánicos y azúcares también fueron analizados en forma conjunta mediante un análisis multivariado. Los resultados se presentan mediante un mapa de calor (Figura 26) en el cual cada fila representa cada uno de los quesos elaborados y las columnas las variables analizadas. Los colores de las celdas representan el puntaje asignado donde las celdas rojas y azules indican una abundancia alta y baja de las variables, respectivamente (Unwin, 2018). A su vez, este análisis proporciona un agrupamiento tanto de las variables como de las muestras en clusters que se observan en la parte inferior y en la parte derecha del mapa de calor, respectivamente. En particular, las muestras se agruparon en tres grupos principales. El Grupo I concentró las muestras de queso con las cepas Lr73, Lr77 y Lc72, asociadas a altas

concentraciones de aldehídos (acetaldehído y 2-metilbutanal), ácidos y cetonas (2-pentanona y 2-butanona), y a bajas concentraciones de otras cetonas (2-propanona, 2-hexanona, 2-nonanona, acetoína), benzaldehído, 2,3-butanodiol, como también a una alta concentración de ácido cítrico, ya que no lo metabolizaron. Estas cepas además fueron las más acidificantes, por lo que también se agruparon por el menor pH en los quesos y mayores niveles de ácido láctico, y bajas concentraciones de lactosa, galactosa y ácido acético. Estas cepas también tuvieron una influencia significativa en los perfiles peptídicos revelando la actividad peptidolítica de las mismas. Los ácidos grasos encontrados (hexanoico, octanoico y decanoico) derivan de la lipólisis, y contribuyen al sabor y aroma del queso (Khattab et al., 2019). El ácido hexanoico está asociado a los atributos de sabor rancio, picante y sudoroso (Clark, 2009); el ácido octanoico tiene un sabor a grasa de cabra y el ácido decanoico imparte olores grasos y cítricos (Gan et al., 2016). El grupo III estuvo conformado por todos los quesos con cepas de *L. plantarum* (Lpl29, Lpl33, Lpl87, Lpl89, Lpl91) y con Lp90, asociados a altas concentraciones de la mayoría de las cetonas (2-nonanona, 2-propanona, 2-hexanona, 2-heptanona, acetoína y diacetilo), ácido acético, 2-octanol y benzaldehído. A su vez también estas cepas tuvieron bajos niveles de ácido cítrico ya que lo metabolizaron. Finalmente, el grupo II estuvo conformado por el queso control y los adicionados de Lc81 y Lr78. Estos quesos se caracterizaron por mayores niveles de unos pocos compuestos volátiles como 2-metilbutanal, 2-metilpropanol y 2-pentanol. También se caracterizaron por tener un pH más elevado y menores niveles de ácido láctico que los demás quesos. Los niveles de galactosa fueron mayores en este grupo que en los quesos incluidos en el grupo I y III.

El metabolismo de la lactosa y el citrato es importante para el flavour del queso. Las BAL pueden producir, a partir de la lactosa, moléculas de impacto en el flavour como etanol, ácido acético, entre otras. Por otro lado, las bacterias lácticas citrato positivas son consideradas agentes clave para la producción de compuestos como diacetilo y acetoína, los que proporcionan notas aromáticas a crema y manteca, importantes en diversos tipos de quesos (McSweeney & Sousa, 2000; Yvon, 2006). Estos compuestos pueden también derivar de otras vías metabólicas como la glucólisis (fermentación de la lactosa) por el fermento primario o NSLAB (Singh et al., 2003), o del catabolismo de aspartato por cepas de BAL con actividad aspartato-aminotransferasa (Kierononczyk et al., 2004; Le Bars & Yvon, 2008). Peralta et al. (2016b), estudiaron la actividad aminotransferasa hacia distintos aminoácidos, incluido el aspártico, de las cepas de lactobacilos mesófilos ensayadas; estas enzimas están involucradas en los pasos iniciales del catabolismo de aminoácidos. Las cepas Lpl89, Lpl33 y Lpl91 fueron las que mostraron mayor actividad aminotransferasa hacia el Asp, seguidas por Lc81, Lr73, Lp90 y Lpl87, mientras que Lpl29, Lc72 y Lr78 tuvieron las actividades más bajas. A su vez, la capacidad de Lp90 y Lpl91 para generar diacetilo y acetoína fue estudiada previamente en nuestro instituto en quesos blandos y extractos de queso (Milesi et al., 2010; Peralta et al., 2014, 2017). En particular, en un estudio realizado en

queso Cremoso, en el que se elaboraron quesos control (sin cultivo adjunto) y experimentales (con Lpl91 o Lp90), se observaron mayores niveles de acetoína en estos últimos; los quesos experimentales tuvieron además un nivel de citrato y aspartato que fue similar y mayor, respectivamente, en comparación a los quesos control. De esta manera, el mayor nivel de acetoína en los quesos experimentales se atribuyó al catabolismo del ácido aspártico por los cultivos adjuntos adicionados (Milesi et al., 2010). En nuestra experiencia, la producción de diacetilo y acetoína por las cepas de *L. plantarum* ensayadas y la cepa de Lp90 probablemente deriven del metabolismo del citrato, el cual fue consumido por estas cepas. Sin embargo, teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, también se podría atribuir la producción de estos compuestos al catabolismo del aspártico.



**Figura 26.** Mapa de calor de correlaciones entre los 23 compuestos volátiles identificados, el pH, los ácidos orgánicos y azúcares identificados en quesos semiduros miniatura a los 90 días de maduración. La escala de colores representa la abundancia de cada variable, indicada como puntuación Z, donde el rojo indica abundancia alta y el azul indica abundancia baja. Del lado derecho se muestran los doce quesos: once con la adición de las cepas ensayadas y el queso control sin adición de adjunto; en la parte inferior se muestran las variables estudiadas.



## 5. Conclusiones

Los resultados de la primera parte de este capítulo evidencian que la cepa *Lacticaseibacillus paracasei* Lp90 fue capaz de disminuir la actividad metabólica de la cepa alterante *Leuconostoc mesenteroides* D11 y evitar el defecto de formación de ojos en los quesos Cremoso. Esta habilidad es de gran interés para el uso de esta cepa como fermento adjunto en queso Cremoso. A su vez, la cepa Lp90 demostró otras características que refuerzan su potencialidad como fermento adjunto: i) no influyó en el crecimiento de la biota láctica primaria durante la maduración y, si bien incrementó el ácido láctico, los niveles estuvieron dentro de rangos normales para la variedad y no se vio afectado el pH del queso, ii) mostró un desarrollo y una supervivencia favorables en el ambiente del queso durante los 30 días en condiciones normales y con interrupción en la cadena de frío, iii) no produjo defectos en los quesos. Finalmente, en esta experiencia demostramos que dos factores fueron necesarios para la aparición del defecto de formación de ojos no deseados: altos niveles de una cepa productora de CO<sub>2</sub> e interrupciones de la cadena de frío. Esto enfatiza que el mantenimiento de la cadena de frío es crucial y puede ser suficiente en algunos casos para garantizar quesos de buena calidad, incluso si la contaminación con NSLAB adventicias es significativa.

En la segunda parte de este capítulo demostramos que las once cepas de lactobacilos mesófilos ensayadas exhibieron propiedades tecnológicas adecuadas para la formulación de cultivos adjuntos para quesería. La evaluación de las cepas en sistemas de queso miniatura antes de la elaboración a escala piloto o industrial proporciona información útil para la selección de cepas con potencial para diversificar el flavour del queso.

Los cultivos ensayados alcanzaron recuentos elevados en los quesos y mostraron una influencia diferencial en la maduración.

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* (Lpl29, Lpl33, Lpl87, Lpl89 y Lpl91) y la cepa de *Lacticaseibacillus paracasei* 90 ejercieron una influencia similar, caracterizada por el consumo de nutrientes (galactosa y citrato) presentes en el queso y producción de compuestos inhibidores (láctico, acético), que son mecanismos de control de la microbiota contaminante y potencialmente perjudicial, incremento leve de la peptidólisis, a través de modificaciones en los perfiles peptídicos, y producción de compuestos volátiles de interés, sobre todo del grupo de las cetonas como diacetilo y acetoina, que podrían mejorar las características sensoriales de los quesos. Los resultados respaldaron la evidencia obtenida previamente en nuestro Instituto acerca del desempeño de Lpl91 y Lp90 como fermentos adjuntos.

Por otro lado, el grupo de cepas de *L. rhamnosus* Lr73 y Lr77, y *L. casei* Lc72 se caracterizaron por producir los mayores niveles de ácido láctico con la consiguiente disminución significativa del pH, lo que podría afectar negativamente las propiedades sensoriales; esto debería ser

corroborado mediante análisis sensoriales. Una estrategia para la utilización de estas cepas podría ser el uso de una dosis menor o su inclusión como parte del fermento de acidificación. Estas cepas también se caracterizaron por el consumo de galactosa, pero no del citrato, por su actividad peptidolítica (mayor que el resto de cepas) que podría tener un impacto en la aceleración de la maduración, y por la producción de compuestos volátiles principalmente del grupo de los ácidos.

Finalmente, las cepas de *L. rhamnosus* Lr78 y *L. casei* Lc81 no mostraron cambios significativos en los quesos en comparación con los quesos control. De esta manera, estas cepas no son adecuadas para modificar el perfil de maduración del queso, pero pueden ser utilizadas para controlar la microbiota adventicia, ya que ambas cepas se mantuvieron en altos niveles en el queso.

Para el uso de estas cepas como adjuntos en quesos sería interesante la evaluación en forma conjunta de cepas que mostraron un impacto diferente en la maduración del queso con el objetivo de obtener productos diferenciados. Es importante destacar que luego de la evaluación realizada en este capítulo, la selección definitiva de cepas de origen NSLAB como cultivos adjuntos, debería incluir análisis sensoriales que permitan evaluar la influencia en la aceptabilidad de los productos por los consumidores. Para ello se deberían hacer elaboraciones a mayor escala con las cepas seleccionadas en este primer estudio (como fermentos individuales o mix).

## Capítulo 3

---

Efectos del nivel proteico, dosis de coagulante, calcio y nivel de materia grasa en las propiedades de coagulación y rendimiento de la leche bovina

## 1. Introducción

La leche destinada a quesería debe contar con una composición química equilibrada y poseer parámetros físicos y microbiológicos dentro de los valores normales para la especie en cuestión (bovina, ovina, caprina, bubalina, etc.) (Meinardi et al., 2022). A su vez, debe formar un coágulo homogéneo con una pérdida de humedad controlada y permitir el desarrollo de los microorganismos del fermento. Las propiedades de coagulación de la leche que se destina a quesería constituyen una medida importante de su calidad tecnológica (Annibaldi et al., 1977) ya que tienen impacto en el rendimiento quesero, la rentabilidad de la producción y la calidad del queso (Harboe et al., 2010). El coagulante añadido a la leche modifica las micelas de caseínas (hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína), lo que trae aparejado la coagulación de las micelas desestabilizadas (Dalglish 1993; O'Callaghan et al., 2002), permitiendo la formación de un coágulo cuyas propiedades texturales son evaluadas tradicionalmente en forma subjetiva y visual por los queseros, para establecer el momento de corte y lirado del mismo. Sin embargo, existen otras metodologías más objetivas para determinar estos parámetros como: la medición dinámica del arrastre viscoso de un péndulo suspendido en la leche coagulada mediante el equipo Formagraph (Foss, Hillerød, Dinamarca) (McMahon et al., 1984; Zalazar et al., 1995), la medición dinámica de parámetros tales como viscosidad, módulo de cizallamiento elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y ángulo de fase ( $\delta$ ) mediante la aplicación de una tensión oscilante de baja amplitud a la muestra de leche mediante un reómetro (Guinee et al., 1997; Karami et al., 2009), la medición dinámica de algunas propiedades físicas de la leche en proceso de gelificación como la reflectancia de la luz infrarroja cercana mediante el equipo Optigraph (AMS, Frépillon, Francia) (Cipolat-Gotet et al., 2012; Kübarsepp et al., 2005), la medición de propiedades viscoelásticas relacionadas con la formación de gel y la evolución de la estructura de la red con el tiempo mediante espectroscopía de ondas de difusión multimoteado (MS-DWS) mediante el equipo Rheolaser Master (Formulation, Toulouse, Francia) (Guggisberg et al., 2022; Rohart et al., 2016), entre otras. En particular, en el presente capítulo se utilizará el equipo Optigraph para el estudio de las propiedades de coagulación de la leche.

Algunos de los factores más importantes que influyen en las propiedades de coagulación son: la concentración de la enzima coagulante, la temperatura de coagulación, el tratamiento térmico aplicado a la leche, el nivel proteico y el pH, la concentración de calcio, entre otros (Fox et al., 2017; Govindasamy–Lucey et al., 2004, 2011; Horne, 2020; Nájera et al., 2003). Estos factores han sido ampliamente estudiados, pero pocos autores han evaluado las interacciones entre ellos y su influencia en las propiedades coagulantes de la leche mediante técnicas ópticas.

El enriquecimiento de leche con proteínas lácteas o sólidos lácteos se ha propuesto con distintos objetivos, tales como estandarizar la composición de la leche para evitar variaciones estacionales, mejorar las propiedades nutricionales o tecnofuncionales, e incrementar el

rendimiento quesero y con ello la capacidad operativa de las plantas queseras (Acharya & Mistry, 2004; Catarino et al., 2013; Pellegrino et al., 2010; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2003). Esto último es importante principalmente para las pequeñas y medianas empresas, que son la mayoría en nuestro país.

Particularmente, la ultrafiltración (UF) de la leche de quesería es un proceso que permite concentrar la leche ya que retiene las caseínas y proteínas de suero, y también la materia grasa si se filtra leche entera. El factor de concentración volumétrica (FCV) indica cuántas veces se ha concentrado la corriente de alimentación, y se define como la razón entre los volúmenes de alimentación y retenido. Los niveles de concentración bajos ( $FCV < 2,0$ ) son los más frecuentemente utilizados en la industria quesera para lograr los objetivos mencionados en el párrafo anterior. La elaboración de quesos con leches concentradas a niveles medios ( $FCV: 2-5$ ) y altos ( $FCV: 6-7$ ) requieren equipamientos especiales y son menos habituales (Kelly et al., 2008; Pouliot et al., 2008). Otra alternativa es aumentar las proteínas o los sólidos totales de la leche de elaboración mediante la adición de polvos lácteos: leche en polvo, proteínas de suero microparticuladas, concentrado de proteína de leche, caseinato de calcio, entre otros (Shakeel-Ur-Rehman et al., 2003; Stankey et al., 2017). Es de esperar que las propiedades de coagulación de la leche enriquecida con proteínas o sólidos lácteos de diverso origen se modifiquen de acuerdo al contenido proteico alcanzado, por lo que es esencial su evaluación antes de su uso en elaboraciones de queso. A su vez, también es imprescindible evaluar el impacto que tendrán las modificaciones en la composición de la leche sobre el rendimiento quesero y la capacidad operativa de la planta.

## **2. Objetivos**

- Evaluar el impacto de la concentración de la leche de quesería mediante ultrafiltración o adición de polvos lácteos (leche en polvo descremada y proteínas de suero microparticuladas), en las propiedades de coagulación y rendimiento quesero.

## **3. Materiales y Métodos**

En el presente capítulo se realizaron tres experiencias independientes en las que se estudiaron las propiedades de coagulación y el rendimiento quesero de leche concentrada empleando distintas estrategias: ultrafiltración, agregado de leche en polvo descremada (LPD), y agregado de proteínas de suero microparticuladas (PSM). En cada una de las experiencias se evaluaron distintos niveles de concentración de la leche y distintas dosis de coagulante. En la experiencia de UF y LPD también se estudió el agregado o no de calcio, y en la experiencia con agregado de PSM, se evaluaron también distintos niveles de materia grasa.

Se describen a continuación el diseño experimental y la preparación de la leche a evaluar de cada una de las tres experiencias, y luego se describen las determinaciones analíticas realizadas.

### **3.1. Influencia del uso de leche ultrafiltrada**

#### **3.1.1. Diseño experimental**

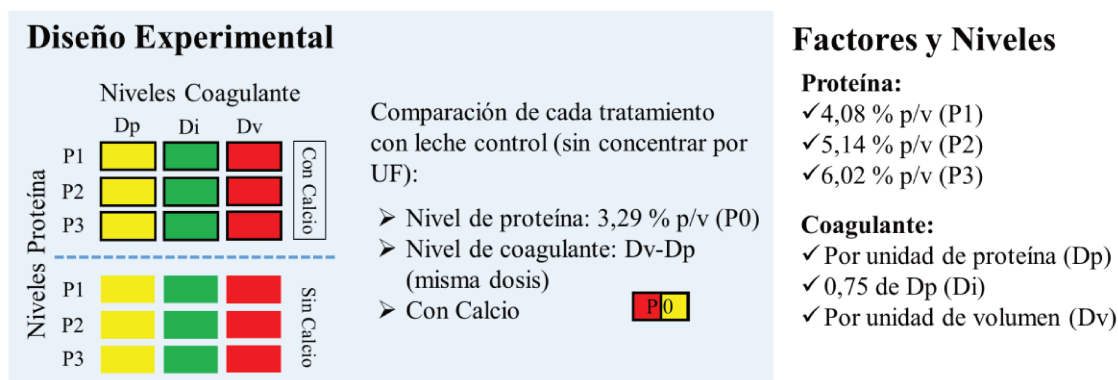
En esta experiencia se evaluó la influencia de la concentración de la leche mediante UF (a tres niveles) y la dosis de coagulante (a tres niveles) con un diseño factorial completo en dos ensayos independientes en los que se trabajó con y sin adición de calcio. El diseño experimental se encuentra en Figura 27.

Los niveles de concentración evaluados en esta experiencia fueron menores de 2, que son los que se utilizan comúnmente para estandarizar la leche o incrementar el rendimiento quesero sin necesidad de equipos especiales (Cunha et al., 2004; Fox, 2017; Heino, et al., 2010; Kosikowski, 1986).

Las dosis de coagulante ensayadas se seleccionaron en base a otras investigaciones sobre el tema, que no han arribado a un consenso. En este sentido, en algunos trabajos se propone la determinación de la dosis con referencia al volumen de leche (Catarino et al., 2013; Waungana et al., 1998), mientras que en otros con respecto a las proteínas (Ardisson-Korat & Rizvi, 2004; Govindasamy-Lucey et al., 2011). Por este motivo, en esta experiencia estudiamos tanto la dosis por unidad de volumen como por unidad de proteína, e incluimos además una dosis intermedia entre estos dos niveles. De esta manera, las dosis de coagulante ensayadas fueron: Dp- 0,012  $\mu\text{L}/\text{mg}$  proteína (dosis estandarizada por cantidad de proteína), Di- 0,009  $\mu\text{L}/\text{mg}$  proteína (0,75 de la dosis Dp), y Dv- 0,405  $\mu\text{L}/\text{mL}$  leche (dosis estandarizada por volumen de leche).

Finalmente, los factores mencionados anteriormente se estudiaron en experiencias utilizando leches con y sin adición de calcio, ya que, según algunos investigadores, en la leche UF se pueden retener altos niveles de calcio, el cual puede afectar negativamente el flavour de los quesos ya que aporta sabor amargo (Catarino et al., 2013; Lin et al., 2015; Schäfer et al., 2019; Vyas & Tong, 2003). Asimismo, la adición de calcio se realiza normalmente para mejorar las propiedades de coagulación de la leche; sin embargo, en el caso de las leches UF, el incremento del nivel de proteínas mejora en general las propiedades de coagulación por lo que podría no ser necesaria la adición de calcio (Guinee et al., 2006; Thomann et al., 2008). Por otro lado, con el fin de evitar efectos no deseados en la calidad del queso debido a la mayor capacidad amortiguadora de la leche UF, se ha propuesto reducir el contenido mineral de los retenidos de UF, como por ejemplo mediante la solubilización del fosfato de calcio coloidal mediante la reducción del pH de la leche antes o durante la UF (Bank, 2007).

Con el objetivo de comparar el comportamiento de las leches UF con leche sin concentrar, también se evaluó leche control con estas características (3,29% proteínas, P0) utilizando la dosis normal de coagulante (que corresponde a la dosis Dp y Dv, que para la leche sin concentrar es la misma) y adición de calcio.



**Figura 27.** Diseño experimental de la experiencia con leche ultrafiltrada. Se evaluaron muestras de leche con distintos niveles de proteína: 4,08 (P1), 5,14 (P2) y 6,02 (P3) % p/v, que se ensayaron con tres diferentes dosis de coagulante: Dp- 0,012 µL de coagulante/mg proteína (dosis por unidad de proteína); Di- 0,75 de Dp; y Dv- 0,405 µL de coagulante/mL leche (dosis por volumen de leche) en experiencias con la adición o no de calcio 0,02 % p/v (sí, no). Leche control: leche sin concentrar con 3,29 % p/v de proteína (P0), 0,405 µL de coagulante/mL de leche (que es la misma en este caso que la dosis por proteína) y adición de calcio 0,02 % p/v.

### 3.1.2. Puesta en marcha y optimización del equipo de membrana

El tratamiento de UF fue realizado en un equipo de membranas escala piloto (Figura 28), utilizando una membrana polimérica de 10kDa (HFK-131 Food & Dairy UF-Elements, Koch MembraneSystems) con un área de filtrado de 4,2 m<sup>2</sup>. El sistema consta de un tanque de 120 L de capacidad (100 L de volumen de trabajo), una bomba de alimentación de 2,2 kW con un caudal nominal de 1 m<sup>3</sup>/h, una bomba de recirculación de 1,5 kW y caudal nominal de 8 m<sup>3</sup>/h, una válvula de recolección de concentrado y una de salida del tanque.

Como paso previo a la filtración en el equipo de membranas, la leche cruda fue microfiltrada en frío a través de un filtro bolsa con un tamaño de poro de 1 µm (como fue explicado en el capítulo 1 sección 2.2) para eliminar impurezas de la leche y disminuir el ensuciamiento de la membrana. Luego se colocó en el tanque de alimentación del equipo de membrana y se recirculó por 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se comenzó con el filtrado (temperatura < 20 °C). El volumen de permeado fue monitoreado continuamente para determinar la reducción en el volumen de leche concentrada (retentado) y para establecer la evolución del caudal de permeado con el tiempo. Se estableció el FCV definido como:

$$FCV = \frac{V_i}{V_i - V_p}$$

*Vi*: Volumen inicial de leche en el tanque

*V<sub>p</sub>: Volumen de permeado retirado*

Esta fórmula se utiliza cuando se trabaja en equipos de funcionamiento continuo o cuando el volumen muerto del equipo es despreciable en comparación con el volumen del tanque. Sin embargo, en el equipo de planta piloto disponible en el INLAIN, el volumen muerto del equipo representa un gran porcentaje (~20 %) en comparación con el volumen de leche que permite almacenar el tanque de alimentación. Por este motivo, los volúmenes considerados en el cálculo del FCV están afectados por este volumen muerto. Cuando la leche que se coloca en el tanque de alimentación se recircula en el equipo se mezcla con el volumen muerto (agua desmineralizada), por lo que la leche se diluye y el volumen total aumenta. Asimismo, el retentado final que se obtiene en el equipo está representado tanto por el volumen del tanque de alimentación como por el volumen que queda en el interior del equipo. De esta manera, para que el cálculo del FCV sirva a los fines de determinar el grado de concentración obtenido de la leche, al  $V_p$  obtenido se le debe restar 20 L, ya que este volumen representaría el volumen muerto del equipo.



**Figura 28.** Equipo de filtración por membranas a escala piloto: (1) tanque de alimentación; (2) membrana de ultrafiltración; (3) bomba; (4) concentrado; (5) permeado.

Luego de cada corrida, se realizó un lavado de la membrana con agua desmineralizada y con una solución de hidróxido de sodio (pH = 10-10,5), continuando con cloro (180-200 ppm) por una hora hasta que la variación de cloro fue menor a 5 % durante 15 min para asegurar que no queden restos de materia orgánica. Por último, se recirculó y enjuagó con agua desmineralizada



por 15 min y se midió el caudal de permeado para verificar la recuperación de la permeabilidad hidráulica de la membrana luego del lavado.

### **3.1.3. Preparación de la leche concentrada**

La leche cruda utilizada para todas las experiencias de este capítulo fue provista por una industria láctea cercana (Milkaut, Franck, Santa Fe). Un volumen de 90 litros de leche cruda entera (proteína 3,29 % p/v) fue microfiltrada y posteriormente colocada en el tanque de alimentación del equipo de membrana y se comenzó el proceso de recirculación y filtración. El volumen de permeado retirado fue aproximadamente 63 L. Luego del proceso se obtuvieron aproximadamente 27 L de leche concentrada (~ 6 % p/v de proteína) en el tanque de alimentación, mientras que 20 L más quedan retenidos dentro del equipo (volumen muerto del equipo), que es posteriormente arrastrado por agua durante la limpieza. En el proceso de ultrafiltración de la leche entera, se retienen tanto las proteínas como la materia grasa, por lo que la leche concentrada mantuvo la misma relación materia grasa/proteína (~ 0,9) que la leche sin concentrar.

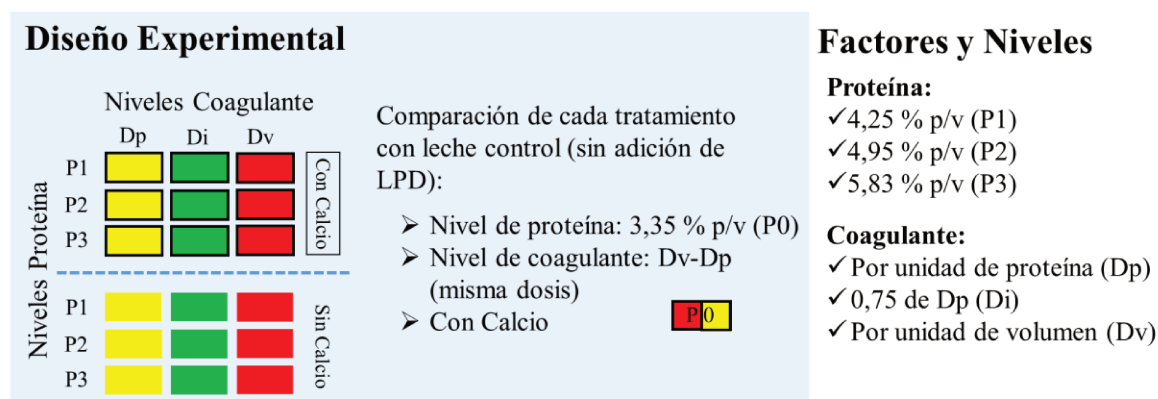
De esta manera, la leche obtenida se concentró hasta un FCV de aproximadamente 1,8. A partir de esta leche concentrada, se hicieron diluciones utilizando el permeado retirado durante el proceso de ultrafiltración para lograr leches concentradas por un factor de 1,5 y de 1,3, como lo llevaron adelante Guinee et al. (1996) y Barrosa et al. (2006). El nivel de las proteínas (NP) de las leches obtenidas fue: 4,08 (P1), 5,14 (P2) y 6,02 (P3) % p/v. Cada una de las leches fueron pasteurizadas a 63 °C durante 30 min y enfriadas inmediatamente, manteniéndose refrigeradas hasta su análisis.

Un volumen de leche cruda microfiltrada por filtro bolsa pero sin concentrar por UF fue reservado para ser usado como control; esta leche también fue pasteurizada en las mismas condiciones que la leche concentrada.

## **3.2. Influencia del agregado de leche en polvo descremada (LPD)**

### **3.2.1. Diseño experimental**

Se evaluó la influencia de la concentración de la leche por el agregado de LPD (a tres niveles) y la dosis de coagulante (a tres niveles) con un diseño factorial completo en dos ensayos independientes en los que se trabajó con y sin adición de calcio. El diseño experimental se encuentra en Figura 29. Los niveles estudiados fueron los mismos que se estudiaron para la experiencia UF.



**Figura 29.** Diseño experimental de la experiencia con leche adicionada de leche en polvo descremada (LPD). Se evaluaron muestras de leche con distintos niveles de proteína: 4,25 (P1), 4,95 (P2) y 5,83 (P3) % p/v, que se ensayaron con tres diferentes dosis de coagulante: Dp- 0,012  $\mu$ L de coagulante/mg proteína (dosis por unidad de proteína); Di- 0,75 de Dp; y Dv- 0,405  $\mu$ L de coagulante/mL leche (dosis por volumen de leche) en experiencias con la adición o no de calcio 0,02 % p/v (sí, no). Leche control: leche sin concentrar con 3,35 % p/v de proteína (P0), 0,405  $\mu$ L de coagulante/mL de leche (que es la misma en este caso que la dosis por proteína) y adición de calcio 0,02 % p/v.

### 3.2.2. Preparación de la leche

Un volumen adecuado de leche fue adicionado con LPD de bajo tratamiento térmico (La Serenísima, Buenos Aires) a tres niveles: 2,9, 4,8 y 7,7 % p/v, con lo que se alcanzaron niveles de proteínas (NP) de 4,25 (P1), 4,95 (P2) y 5,83% (P3) % p/v, respectivamente. En esta experiencia se utilizó LPD de bajo tratamiento térmico para que las propiedades de coagulación no se vean afectadas por la desnaturalización de las proteínas de suero, que se verifica en mayor medida en leches en polvo con tratamientos térmicos más elevados (Lin et al., 2018).

Las distintas variantes de leche enriquecida fueron refrigeradas en la heladera a 4 °C durante 18 horas para lograr una buena hidratación del polvo agregado. Un volumen de leche cruda fue reservado sin adición de polvo para usar como control.

Todas las muestras fueron pasteurizadas a 63 °C durante 30 min y enfriadas inmediatamente, manteniéndose refrigeradas hasta su análisis.

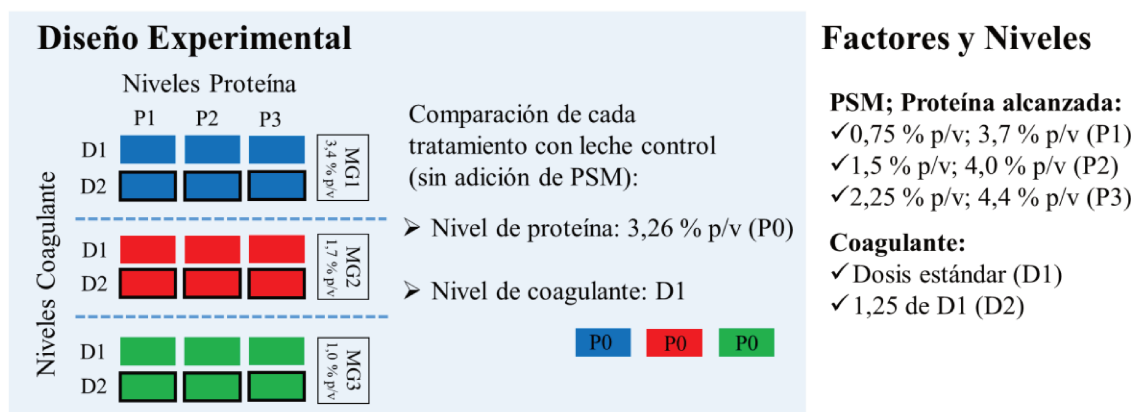
## 3.3. Influencia del agregado de Proteínas de Suero Microparticuladas (PSM)

### 3.3.1. Diseño experimental

Las proteínas de suero microparticuladas (PSM) se obtienen mediante la aplicación de un tratamiento térmico en condiciones de estrés mecánico, de manera que las fuerzas de cizalla evitan la formación de una matriz gelificada y dan lugar a pequeños agregados de proteínas séricas de tamaño de partícula entre 0,5 y 10  $\mu$ m, similar al de los glóbulos grasos (1-10  $\mu$ m). Esto facilita su inclusión en matrices proteicas, en las que pueden actuar como un sustituto de los glóbulos grasos, mejorando la textura y el sabor de los productos lácteos bajos en grasa, como por ejemplo

los quesos (Ipsen, 2017). El agregado de estas proteínas también permite incrementar el rendimiento quesero y aumentar la retención de agua (Masotti et al., 2017; Stankey et al., 2017).

Se evaluó la influencia de la incorporación de PSM a la leche de quesería a tres niveles. Para ello, se utilizó el producto Nutrilact ® CH-4560, que es un ingrediente en polvo constituido por proteínas de suero microparticuladas producidas por Arla Food Ingredients S.A. (Martínez, Buenos Aires, Argentina). Según la información del proveedor, este polvo contiene un 43-47 % de proteínas; 34-40 % de lactosa y 3-5 % de materia grasa. Además, se estudió la dosis de coagulante a dos niveles: D1- 0,405 µL de coagulante/mL leche (dosis estandarizada por volumen de leche), D2- 0,506 µL de coagulante/mL leche (1,25 de la dosis D1). El estudio de esta mayor dosis resultó de interés ya que se ha informado que una desnaturalización severa de las proteínas de suero de la leche destinada a la elaboración puede prolongar el tiempo de coagulación y, como consecuencia, formar cuajadas más débiles y finas, que retienen más agua de lo normal (Huppertz et al., 2005, Singh & Waungana, 2001). De esta forma, al aumentar la dosis se busca que el tiempo de coagulación y la firmeza sean similares al control. Finalmente, debido a que este polvo lácteo habitualmente se utiliza para elaborar quesos reducidos en grasa, este diseño se estudió en leches con tres niveles de contenido de materia grasa: normal y reducido en un 50% y 70%. Se utilizó un diseño factorial completo que se muestra en la Figura 30. Los resultados obtenidos para cada leche adicionada de PSM a cada nivel de MG se contrastaron con los obtenidos para la leche control correspondiente (para cada nivel de MG) con su respectivo nivel de proteína (3,26±0,06 % p/v) utilizando la dosis normal de coagulante (D1) y adición de calcio.



**Figura 30.** Diseño experimental de la experiencia con leche adicionada de proteínas de suero microparticuladas (PSM). Se evaluaron muestra de leche adicionadas de PSM en tres niveles 0,75, 1,5 y 2,25 % p/v, obteniéndose muestras con un nivel de proteína de 3,7 (P1), 4,0 (P2) y 4,4 (P3) % p/v, respectivamente. Para cada leche es estudiaron dos diferentes dosis de coagulante: D1 - 0,405 µL/mL leche (dosis por volumen de leche); D2- 0,506 µL/mL leche (1,25 de D1). El diseño fue aplicado a leches con tres distintos niveles de materia grasa: 3,4% (MG1, azul), 1,7% (MG2, rojo) y 1,0% (MG3, verde). Leche control para cada nivel de MG evaluado: leche con el nivel adecuado de MG, sin adición de PSM (con 3,26 % p/v de proteínas, P0) y dosis D1 de coagulante.

### 3.3.2. Preparación de la leche

La leche cruda fue estandarizada a tres niveles de materia grasa: 3,4 % p/v (MG1), 1,7 % p/v (MG2) y 1,0 % p/v (MG3). Para ello se utilizó una descremadora centrífuga (Alfa Laval Separador Co., Tumba, Suecia) con la cual se separó una cantidad adecuada de la materia grasa de la leche para cada nivel a ensayar. A su vez, cada mezcla fue adicionada con diferentes niveles de PSM: 0,75, 1,5 y 2,25 % p/v, con los cuales se alcanzaron niveles de proteínas (NP) en la leche de: 3,7 (P1), 4,0 (P2) y 4,4 (P3) % p/v. Las mezclas de leche se homogeneizaron correctamente y se almacenaron a 4 °C durante 18 h para lograr una correcta hidratación. Un volumen de leche a cada nivel de MG, sin adición de PSM fue reservado para usar como leche control. Todas las muestras de leche, control y enriquecidas, fueron pasteurizadas a 63 °C durante 30 min y enfriadas inmediatamente, manteniéndose refrigeradas hasta su análisis.

## 3.4. Determinaciones analíticas

### 3.4.1. Composición y pH

La composición (lactosa, proteínas, materia grasa, sólidos totales) de cada una de las preparaciones de leche y de los polvos lácteos se determinó utilizando un analizador por infrarrojo (FT120, Foss Electric, Dinamarca). El pH de cada mezcla se midió, inmediatamente antes de las mediciones de coagulación, a 25 °C con un medidor de pH Orion (Orion Research Incorporated, Estados Unidos), provisto de un electrodo combinado (vidrio y calomel).

En las leches UF se determinó además la concentración de calcio por Espectrometría de Absorción Atómica de Llama.

### 3.4.2. Propiedades de coagulación

#### Puesta en marcha y optimización del equipo Optigraph

El Optigraph®, un instrumento óptico que permite caracterizar la coagulación de la leche en tiempo real mediante medición de infrarrojo cercano, se adquirió en el INLAIN en el año 2018. Este equipo fue desarrollado por Alliance Instruments en colaboración con el INRA (Francia) con el objetivo de lanzar un nuevo analizador para reemplazar a la obsoleta tecnología del Formagraph que, empleando otros principios, permite medir idénticos parámetros tecnológicos (Kübarssepp et al., 2005). El instrumento cuenta con un sistema de hardware y software que permite calcular todos los parámetros requeridos para el proceso de elaboración de un queso como lo son el tiempo de coagulación, la evolución de la firmeza de la cuajada y la velocidad de agregación. Es posible acceder a estos datos a través de descriptores característicos extraídos de la información óptica (Kübarssepp et al., 2005; Pretto et al., 2011).

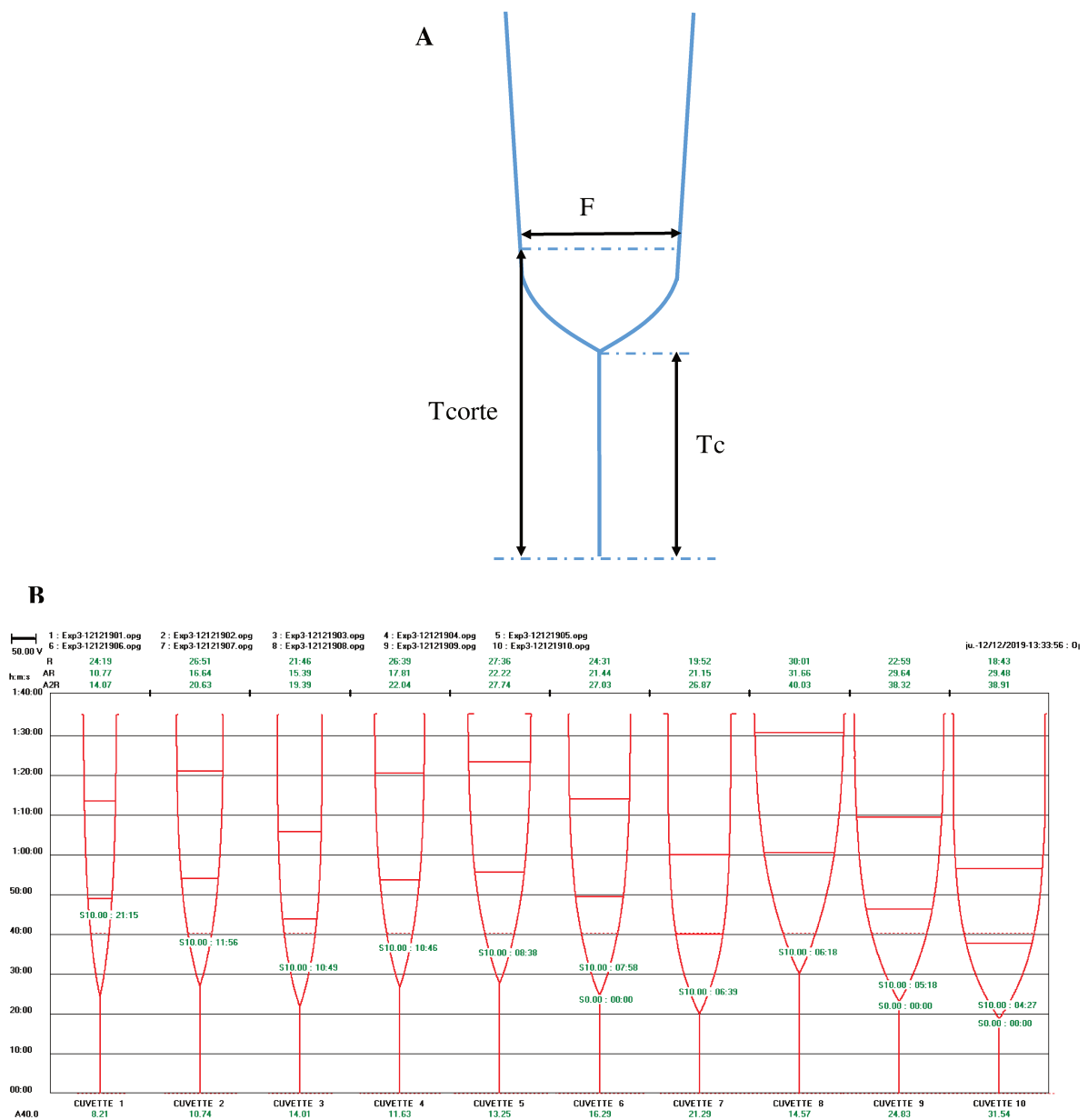
El equipo tiene una pieza de aluminio con 10 cubetas alineadas de 10 mL de capacidad (Figura 32A). Cada cubeta tiene dos ventanas de zafiro enfrentadas que permiten el paso de la radiación

infrarroja. Esta pieza se introduce dentro del equipo (Figura 32B), que contiene un elemento calefactor para lograr una temperatura constante dentro del intervalo entre 25 y 45 °C, donde se localizan los diodos emisores y receptores a cada lado de las cubetas. El receptáculo se comunica con un módulo electrónico que convierte las señales ópticas en eléctricas, el cual, a su vez, está conectado al módulo informático del sistema, dotado del programa específico que permite controlar el funcionamiento y almacenar y procesar los resultados obtenidos. El principio de medición se basa en la atenuación de la señal infrarroja que atraviesa cada una de las muestras colocadas en las cubetas. Esta reducción de la señal se debe a los cambios en la estructura micelar de la caseína durante la coagulación. Antes de cada análisis, la intensidad de la luz emitida para la prueba se ajusta automáticamente, para tener una recepción constante de voltaje de 1 V. El software explora las muestras de manera simultánea y en tiempo real. Además de facilitar los gráficos tipo «copa» tradicionales del Formagraph (Figura 31), el software proporciona una tabla con los valores de cada parámetro para cada una de las cubetas y permite seleccionar tiempos y valores de firmeza de forma manual.

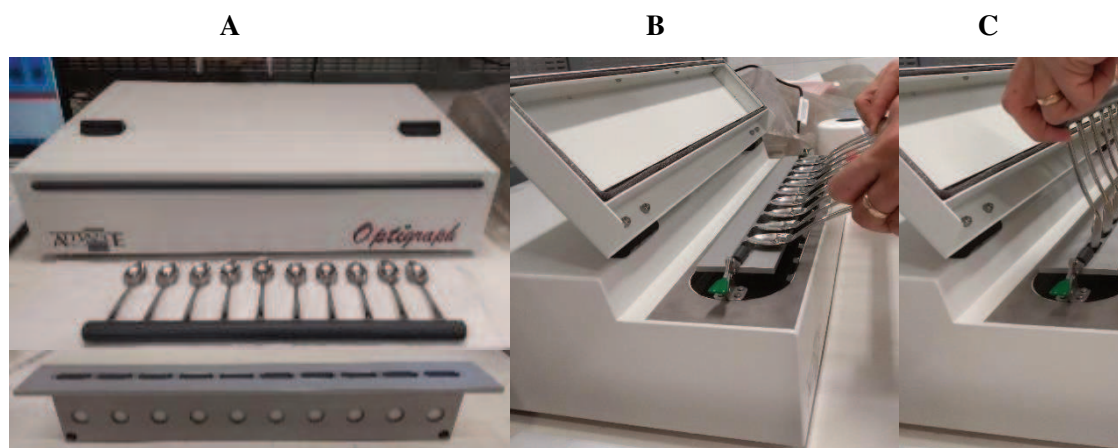
Los parámetros de coagulación de la leche fueron calculados a partir de los datos brindados por el Optigraph. De esta manera se determinó el tiempo de coagulación ( $T_c$ : tiempo en minutos desde la adición del coagulante a la leche hasta el inicio de la coagulación), tiempo de corte ( $T_{corte}$ : tiempo transcurrido desde la adición del coagulante hasta alcanzar la firmeza adecuada), y firmeza de la cuajada ( $F$ : ancho en Volts después de un cierto tiempo).

El protocolo para el análisis de las muestras de leche en el Optigraph fue el siguiente:

1. Precalear las muestras de leche en un baño de agua a 40 °C durante 20 minutos.
2. Colocar 10 mL de leche en cada cubeta, utilizando una micropipeta; colocar calcio cuando sea necesario (Figura 32A).
3. Colocar el rack de 10 cubetas en el equipo; seleccionar la temperatura de proceso (37 °C, temperatura utilizada en la elaboración de quesos Cremoso).
4. Una vez que las cubetas alcanzan la estabilidad, es decir luego del test realizado por el instrumento donde corrobora que cada cubeta reciba una señal de 1 V, agregar el coagulante mediante el uso de las cucharas, en las cuales se agregó previamente el volumen adecuado de coagulante usando micropipetas (Figura 32B). Agitar por 10 segundos con la ayuda de las cucharas (Figura 32C). Cerrar el equipo para mantener la temperatura.



**Figura 31.** A. Optigrama que representa los parámetros obtenidos con el Optigraph. Tc: tiempo de coagulación (min), Tcorte: tiempo de corte (min), F: firmeza de la cuajada (Volt). B. Optigramas obtenidos en una de las corridas realizadas por Optigraph, mostrando algunos de los parámetros anteriormente mencionados como el tiempo de coagulación y firmeza de la cuajada. Se observan los resultados de las 10 cubetas pertenecientes a 10 corridas realizadas con leche UF a distintos niveles de concentración: leche control (1) y leche concentrada por un factor de 1,3 (2, 3 y 4), por un factor de 1,5 (5, 6 y 7) y por un factor de 1,8 (8, 9 y 10). Tres diferentes dosis de coagulante se utilizaron para cada una de las tres corridas de cada leche UF.



**Figura 32.** A. En la parte superior se observa el instrumento Optigraph y en la parte inferior el rack con las 10 cubetas. Las cucharas están unidas para que el agregado del coagulante sea en forma simultánea a todas las cubetas. B. Agregado de coagulante a las cubetas. C. Agitación mediante las cucharas en cada cubeta.

### **Influencia del enfriamiento de la leche pasteurizada en las propiedades de coagulación**

Cuando se realizan experiencias de evaluación de las propiedades de coagulación de leches, las diferentes muestras se pasteurizan en general en el mismo momento, luego de lo cual se analizan mediante Optigraph. Si bien el análisis se puede realizar en forma inmediata luego de la pasteurización, la realización de réplicas conlleva a mantener refrigerado el resto del volumen de leche pasteurizada hasta el momento de su análisis (preferiblemente dentro de las 36 h). Es importante tener en cuenta que el enfriamiento de la leche altera los equilibrios salinos, lo que puede ocasionar cambios en las propiedades de coagulación de la leche. Sin embargo, este efecto se puede revertir, aunque sea parcialmente, mediante una termostatación previa de la leche (Fox, 2017). En esta experiencia se evaluó la influencia del enfriamiento y termostatación de leches pasteurizadas en las propiedades de coagulación (tiempo de coagulación y de corte y firmeza de la cuajada) mediante la utilización del equipo Optigraph a 37 °C. La leche cruda fue pasteurizada durante 30 minutos a 63 °C y posteriormente enfriada hasta 40 °C y distribuida en colectores de 25 mL. Algunos colectores fueron almacenados en heladera hasta su análisis (entre 1-3 horas), mientras que otros fueron analizados sin enfriamiento previo. Para las siguientes determinaciones, y con el objetivo de conocer qué tiempo es el suficiente para reestablecer el equilibrio salino y micelar y obtener propiedades de coagulación similares a la leche sin enfriar, se evaluaron distintos tiempos de termostatación en un baño a 40 °C: 20, 30, 40 y 60 minutos.

A cada cubeta con 10 mL de leche se le adicionó calcio 0,02 % p/v y coagulante (Chymax, Chr. Hansen, Argentina, 74 IMCU/mL) en una dosis de 4,05 µL/10mL de leche. La adición de coagulante y calcio fue la misma para todas las muestras. Este ensayo se realizó por sextuplicado.

### **Determinación de las propiedades de coagulación de las muestras de leche**

En base a los resultados obtenidos en el estudio descrito en el ítem anterior, las muestras de leche de todas las experiencias fueron llevadas a un baño termostático por 20 min a 40 °C inmediatamente antes de la evaluación de las propiedades de coagulación. El coagulante (Chy-Max, Chr. Hansen 74 IMCU/mL) utilizado se diluyó 0,9:10 v/v con agua destilada y luego se añadió la dosis determinada de esa dilución a cada cubeta que contenía 10 mL de leche. La determinación de los parámetros de coagulación se realizó con el instrumento óptico Optigraph (Ysebaert, Frepillon, Francia) a 37 °C.

Luego de la coagulación, en la mayoría de las variedades de queso, se espera un período aproximadamente igual al tiempo de coagulación para que el gel se vuelva lo suficientemente firme antes del corte; es decir el lirado se realiza a un tiempo igual a  $2T_c$  (Fox, 2017). Si el gel es demasiado blando o demasiado rígido cuando se corta, las pérdidas de grasa y caseína pueden ser altas (Bynum & Olson, 1982; Guinee et al., 1994).

Los parámetros que se determinaron fueron:

-Tiempo de coagulación ( $T_c$ , min.).

-Tiempo de corte a una dada firmeza, correspondiente a la obtenida para la leche control a  $2T_c$ .

-Firmeza de la cuajada (Volt) a un dado tiempo, correspondiente a 2 veces el tiempo de coagulación ( $2T_c$ ) obtenido para la leche control correspondiente para cada experiencia.

#### **3.4.3. Rendimiento quesero y análisis del suero**

El rendimiento quesero fue estimado mediante un ensayo en tubos Falcon, utilizando 40 mL de cada una de las leches ensayadas. Las mismas fueron coaguladas con las condiciones mencionadas en el diseño experimental en relación a nivel proteico, dosis de coagulante, adición o no de calcio, nivel de materia grasa, según corresponda, en un baño termostático a 37 °C. El tiempo de corte se determinó en función de los resultados obtenidos previamente en el instrumento Optigraph de modo de realizar el lirado cuando la cuajada alcanzó una firmeza similar a la que alcanzó la leche control a un tiempo de  $2T_c$ . El lirado se realizó utilizando espátulas que simulaban ser liras, con dos cortes paralelos en una dirección y otro perpendicular a éstos. Luego del corte, los tubos se centrifugaron a 10000 g durante 15 minutos. Se calculó el rendimiento de la cuajada (%) como la razón entre el peso de la leche y de la cuajada centrifugada, mientras que el rendimiento ajustado fue calculado teniendo en cuenta el contenido de proteína y grasa de la leche control y de la experimental (Guinee et al., 2006). El uso de esta fórmula elimina los efectos de las diferencias de la composición de la leche en el rendimiento, por lo que permite comparar el rendimiento quesero a partir de leche de diferentes composiciones y, por lo tanto,



facilita una comparación significativa cuando el contenido de proteína de la leche aumenta, por ejemplo, mediante la adición de leche ultrafiltrada o polvos lácteos (Fox, 2017). Esta experiencia se realizó por triplicado.

$$R (\%) = \frac{\text{Peso leche (g)}}{\text{Peso cuajada (g)}} \times 100$$

$$R \text{ ajustado} (\%) = R (\%) \frac{MG + P (\text{leche control})}{MG + P (\text{leche P1, P2, P3})}$$

A su vez, se analizó la composición del suero obtenido de cada tubo Falcon mediante un equipo infrarrojo (FT120, Foss Electric, Dinamarca).

### 3.5. Análisis estadístico

En el estudio de la influencia del enfriamiento de la leche en las propiedades de coagulación se llevó adelante un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía.

Por otro lado, un análisis de ANOVA de dos vías fue utilizado para estudiar la influencia del nivel de proteínas y dosis de coagulante sobre los parámetros determinados; este análisis se aplicó por separado para la experiencia con o sin calcio (experiencia con leche UF o adicionada de LPD) o con distintos niveles de materia grasa (experiencia con PSM) en las experiencias según corresponda. Finalmente, se realizó un análisis de regresión lineal, por el método de cuadrados mínimos (Massart et al., 1988) del rendimiento en función del nivel de proteínas de las leches enriquecidas y control y se determinó el coeficiente de correlación.

En todos los casos, cuando las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ), las medias se compararon mediante la prueba de Tukey.

Todos estos análisis se realizaron mediante el software Minitab 18 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

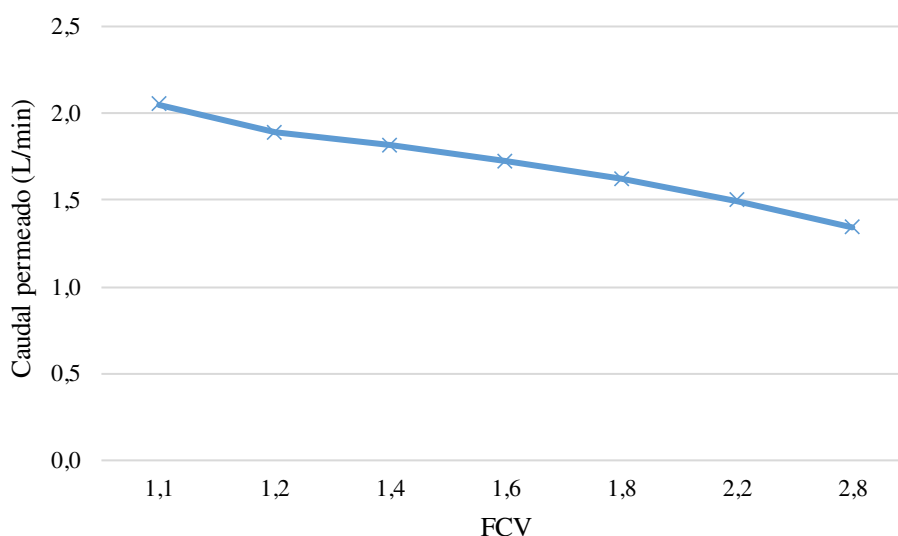
## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Puesta en marcha y optimización del equipo de membrana

En la Figura 33 se muestra la variación del caudal de permeado en función del FCV, donde se observa una leve disminución lineal, lo que concuerda con resultados previos de otros autores (Catarino et al., 2013; Méthot-Hains et al., 2016). Méthot-Hains et al. (2016) encontraron que al filtrar leche descremada, el flujo de permeado disminuyó continuamente independientemente de la temperatura de filtración (10 y 50 °C) y la presión transmembrana aplicada; a 10 °C, la disminución del flujo de permeado relativo fue similar para todas las condiciones de presión

transmembrana trabajadas, mientras que a 50 °C se produjeron marcadas diferencias en los cambios en el flujo de permeado relativo según el modo de operación de presiones.

El equipo disponible en el INLAIN no cuenta con sistema de calentamiento o enfriamiento. En las primeras experiencias realizadas, se trabajó con leche descremada para disminuir el ensuciamiento de la membrana. Para ello, se tuvo que calentar la leche a 40 °C, descremarla, pasarla por el filtro bolsa y luego filtrarla, con lo cual la temperatura de filtración era alrededor de 30 °C. Sin embargo, el hecho de tener la leche a temperaturas entre 30-40 °C un período de tiempo prolongado condujo a una mayor proliferación de microorganismos adventicios. De esta manera, se optó por filtrar directamente la leche entera fría (previo pasaje por el filtro bolsa) que, a pesar de ensuciar un poco más la membrana, permitía mantener la leche a temperaturas bajas durante el proceso. La temperatura de filtración estuvo de esta manera por debajo de los 20 °C; durante el proceso se produjo un leve incremento de la temperatura de la leche.

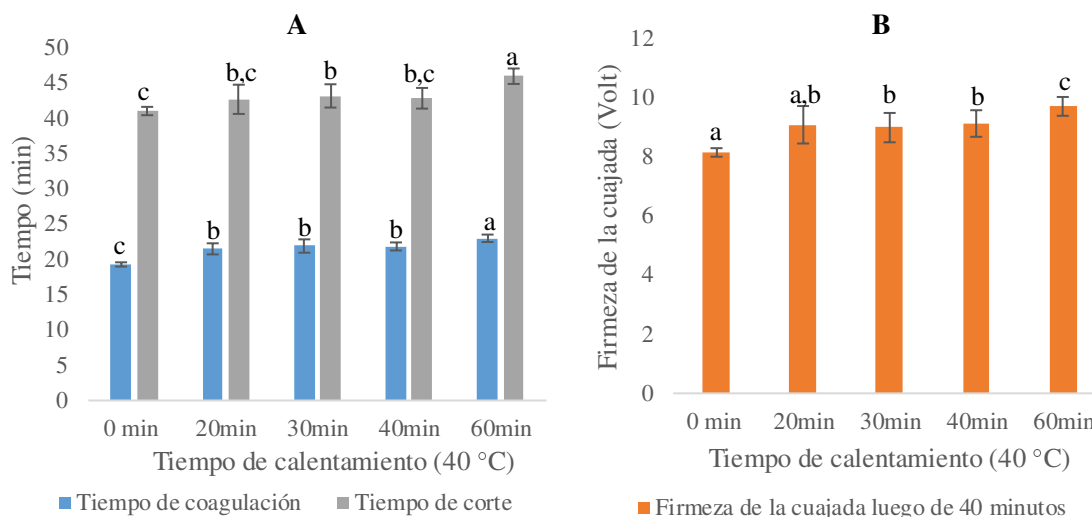


**Figura 33.** Variación del caudal de permeado (L/min) en función del factor de concentración volumétrico (FCV).

#### **4.2. Influencia del enfriamiento de la leche pasteurizada en las propiedades de coagulación**

En la Figura 34 se muestran los resultados de los parámetros de coagulación estudiados en leches pasteurizadas y enfriadas. Estas leches, independientemente del tiempo de termostatización, presentaron una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el tiempo de coagulación con respecto a la leche sin refrigerar (control, 0 min), mientras que para el tiempo de corte, sólo hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para los tiempos 30 y 60 minutos. Con respecto a los resultados de firmeza alcanzados a los 40 minutos desde la adición del coagulante, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en todas las muestras enfriadas con respecto al control, salvo en aquella que se termostató durante 20 min. Teniendo en cuenta estos resultados, se determinó

la aplicación de una etapa de termostatación a 40 °C durante 20 minutos como etapa previa al estudio de las propiedades de coagulación de leches pasteurizadas que han sido enfriadas.



**Figura 34.** Influencia de la aplicación de una etapa de termostatación a 40 °C durante diversos períodos de tiempo antes de la evaluación de las propiedades de coagulación de muestras de leche pasteurizada y enfriada. A. Influencia en el tiempo de coagulación y de corte. B. Influencia en la firmeza de la cuajada. Los resultados son promedios y desviaciones estándar del sextuplicado de experiencia.

<sup>a,b,c</sup> Las barras para el mismo parámetro con diferentes letras difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Influencia del uso de leche ultrafiltrada en las propiedades de coagulación y en el rendimiento quesero

#### 4.3.1. Composición y pH

La composición global, el pH y el nivel de calcio de las muestras de leche utilizadas en esta experiencia se muestran en la Tabla 13.

El proceso de UF modifica la composición de la leche: aumenta el contenido de sólidos totales, disminuye el nitrógeno no proteico (NPN), el calcio soluble y la lactosa, ya que estos últimos componentes atraviesan la membrana de UF, y enriquece las fracciones de grasa y proteína, que son retenidas (Ong et al., 2013).

En nuestra experiencia, verificamos que la relación materia grasa:proteína se mantuvo similar en la leche ultrafiltrada y en la leche sin concentrar, debido a que ambos sólidos se retuvieron proporcionalmente durante el tratamiento. Los niveles de calcio aumentaron con la concentración por UF, pero este cambio no fue proporcional al incremento del FCV, lo que puede ser atribuido a pérdidas de calcio iónico en el permeado. Catarino et al. (2013) observaron que para leche descremada de oveja concentrada por UF, la concentración de proteína y calcio también aumentaron al aumentar el FCV. Estos autores informaron que los coeficientes de rechazo de la membrana para estos componentes no variaron con el factor de concentración, siendo los porcentajes relativos a las proteínas y a los iones Ca y Mg de 97%, 86% y 63%, respectivamente;

la pérdida de proteína se atribuyó al nitrógeno no proteico, mientras que las de calcio y magnesio correspondieron a las formas solubles de los mismos. Por otro lado, On-Nom et al. (2010) informaron que la pérdida de calcio en el permeado durante la UF de la leche depende de la temperatura utilizada, disminuyendo entre un 50 y un 60 % en el rango de 20 a 80 °C. Estos resultados son interesantes ya que suponen una mayor retención del calcio en las micelas de caseína y por consiguiente en la leche cuando la UF se realiza a mayor temperatura. En nuestro caso, la UF se llevó a cabo a baja temperatura (menos de 20 °C) con el fin de evitar el desarrollo de la biota adventicia.

El pH es otro de los factores que tiene una influencia significativa en la coagulación debido a su efecto sobre las propiedades de la micela de caseína y sobre la acción enzimática del coagulante (Alves et al., 2004; Matia-Merino & Singh, 2007). En nuestro caso, las diferencias de pH entre las leches fueron mínimas (menores a 0,1 unidades) por lo que no eran esperables modificaciones de la coagulación de las leches analizadas debido a este factor.

En cuanto a la lactosa, se encontraron menores niveles en la leche UF en comparación a la leche control, lo que también fue observado por otros investigadores (Govindasamy-Lucey et al., 2005; Moynihan et al., 2016).

**Tabla 13.** Composición global, pH y niveles de calcio de las leches utilizadas en la experiencia con leche UF.

Parámetro	Leche			
	P0	P1	P2	P3
pH	6,70±0,03 <sup>b</sup>	6,77±0,03 <sup>a</sup>	6,79±0,02 <sup>a</sup>	6,79±0,02 <sup>a</sup>
Grasa (% p/v)	3,03±0,01 <sup>d</sup>	3,65±0,03 <sup>c</sup>	4,42±0,02 <sup>b</sup>	5,14±0,02 <sup>a</sup>
Proteína (% p/v)	3,29±0,02 <sup>d</sup>	4,08±0,01 <sup>c</sup>	5,14±0,02 <sup>b</sup>	6,02±0,02 <sup>a</sup>
Lactosa (% p/v)	4,72±0,01 <sup>a</sup>	3,82±0,01 <sup>c</sup>	4,20±0,03 <sup>b</sup>	4,22±0,01 <sup>b</sup>
Sólidos Totales no grasos (% p/v)	8,78±0,04 <sup>d</sup>	8,54±0,03 <sup>c</sup>	9,74±0,04 <sup>b</sup>	10,60±0,03 <sup>a</sup>
Sólidos Totales (% p/v)	11,76±0,05 <sup>d</sup>	12,48±0,04 <sup>c</sup>	16,84±0,04 <sup>b</sup>	18,34±0,03 <sup>a</sup>
Calcio (ppm)	1060±50 <sup>d</sup>	1260±45 <sup>c</sup>	1350±47 <sup>b</sup>	1660±63 <sup>a</sup>

Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

P0: leche entera sin concentrar; P1, P2 y P3: leche entera concentrada por UF a un FCV de ~ 1,3, 1,5 y 1,8, respectivamente.

<sup>a,b,c,d</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2. Propiedades de coagulación

Según el ANOVA de dos vías aplicado por separado a la experiencia con y sin calcio, todos los parámetros de coagulación fueron afectados por los factores individuales (excepto Tc en la experiencia con calcio por el NP) y la interacción entre ellos (Tabla 14). De esta manera, la influencia del NP y dosis de coagulante dependió del nivel del otro factor.

**Tabla 14.** Tiempo de coagulación, tiempo de corte y firmeza de la cuajada para las leches UF con distintas concentraciones y dosis de coagulante, en la experiencia con y sin calcio. Significancia del ANOVA de dos vías de los factores estudiados: F1- nivel proteico (NP) y F2- dosis de coagulante.

		<b>Tiempo de coagulación (min)</b>	<b>Tiempo de corte (min)</b>	<b>Firmeza (Volt)</b>
Con calcio	P1-Dp	20,9±1,5 <sup>F,G,H</sup>	33,2±1,4 <sup>E</sup>	16,0±0,3 <sup>G</sup>
	P1-Di	26,3±1,7 <sup>C,D,E</sup>	37,9±1,9 <sup>C,D</sup>	15,2±0,8 <sup>G</sup>
	P1-Dv	26,5±1,7 <sup>C,D</sup>	39,3±1,4 <sup>C</sup>	14,1±0,4 <sup>G</sup>
	P2-Dp	19,6±0,7 <sup>F,G,H</sup>	27,3±0,6 <sup>F</sup>	23,5±0,2 <sup>E</sup>
	P2-Di	24,0±0,9 <sup>D,E,F</sup>	33,2±0,6 <sup>E</sup>	19,9±0,3 <sup>F</sup>
	P2-Dv	26,5±1,5 <sup>C,D</sup>	35,8±1,4 <sup>D,E</sup>	18,7±0,7 <sup>F</sup>
	P3-Dp	18,5±0,4 <sup>F,G,H</sup>	23,8±0,2 <sup>G</sup>	34,6±1,6 <sup>C</sup>
	P3-Di	22,8±0,5 <sup>E,F,G</sup>	28,9±0,2 <sup>F</sup>	29,5±0,8 <sup>D</sup>
	P3-Dv	29,8±1,3 <sup>C</sup>	36,5±1,2 <sup>C,D</sup>	22,3±1,0 <sup>E</sup>
Significancia	F1 NP	NS	*	*
	F2 Dosis	*	*	*
	F1*F2	*	*	*
Sin calcio	P1-Dp	27,6±1,1 <sup>E,F</sup>	42,2±2,1 <sup>D,E</sup>	12,2±0,9 <sup>F,G</sup>
	P1-Di	34,8±0,4 <sup>C,D</sup>	49,4±1,0 <sup>C</sup>	9,1±0,4 <sup>G</sup>
	P1-Dv	33,9±1,8 <sup>C,D</sup>	48,1±1,8 <sup>C</sup>	9,4±1,4 <sup>G</sup>
	P2-Dp	24,9±0,3 <sup>F,G</sup>	34,2±0,9 <sup>G,H</sup>	18,7±0,9 <sup>D,E</sup>
	P2-Di	31,3±1,2 <sup>D,E</sup>	42,5±1,9 <sup>D,E</sup>	13,3±1,2 <sup>F</sup>
	P2-Dv	36,2±1,8 <sup>C</sup>	47,7±2,3 <sup>C,D,E</sup>	10,0±1,6 <sup>F,G</sup>
	P3-Dp	22,3±0,4 <sup>G</sup>	28,3±0,5 <sup>H</sup>	29,5±0,0 <sup>C</sup>
	P3-Di	28,7±0,6 <sup>E,F</sup>	35,9±0,8 <sup>F,G</sup>	21,4±0,7 <sup>D</sup>
	P3-Dv	34,7±1,9 <sup>C,D</sup>	41,5±1,9 <sup>E,F</sup>	17,9±0,8 <sup>E</sup>
Significancia	F1 NP	*	*	*
	F2 Dosis	*	*	*
	F1*F2	*	*	*

NS: No significativo; \* p < 0,05.

Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

Nivel proteico: P1: 4,08 % p/v, P2: 5,14 % p/v y P3: 6,02 % p/v. Dosis de coagulante: Dp- 0,012 µL de coagulante/mg proteína (dosis por unidad de proteína); Di- 0,75 de Dp; y Dv- 0,405 µL de coagulante/mL leche (dosis por volumen de leche).

<sup>C,D,E,F,G,H</sup> Los valores de cada columna (para cada experiencia) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) cuando F1 x F2 es significativo.

Se observaron valores mayores de Tc para las dosis de coagulante por unidad de volumen (Dv), mientras que los menores Tc fueron para la dosis por unidad de proteína (Dp). En general, el Tc fue similar para una misma dosis de coagulante con una tendencia a disminuir a mayor NP, salvo para la Dv para la cual la tendencia del Tc fue a un aumento con el NP.

A diferencia de lo observado para el tiempo de coagulación, el tiempo de corte y la firmeza mostraron mayores diferencias según el NP a cada nivel de coagulante. En este sentido, el tiempo de corte a cada una de las mayores dosis de coagulante (Di y Dp) fue diferente para cada NP, mientras que para la menor dosis (Dv), los valores estuvieron más cercanos entre sí. Estos resultados, que mostraron la misma tendencia para la experiencia con y sin calcio, indican que el

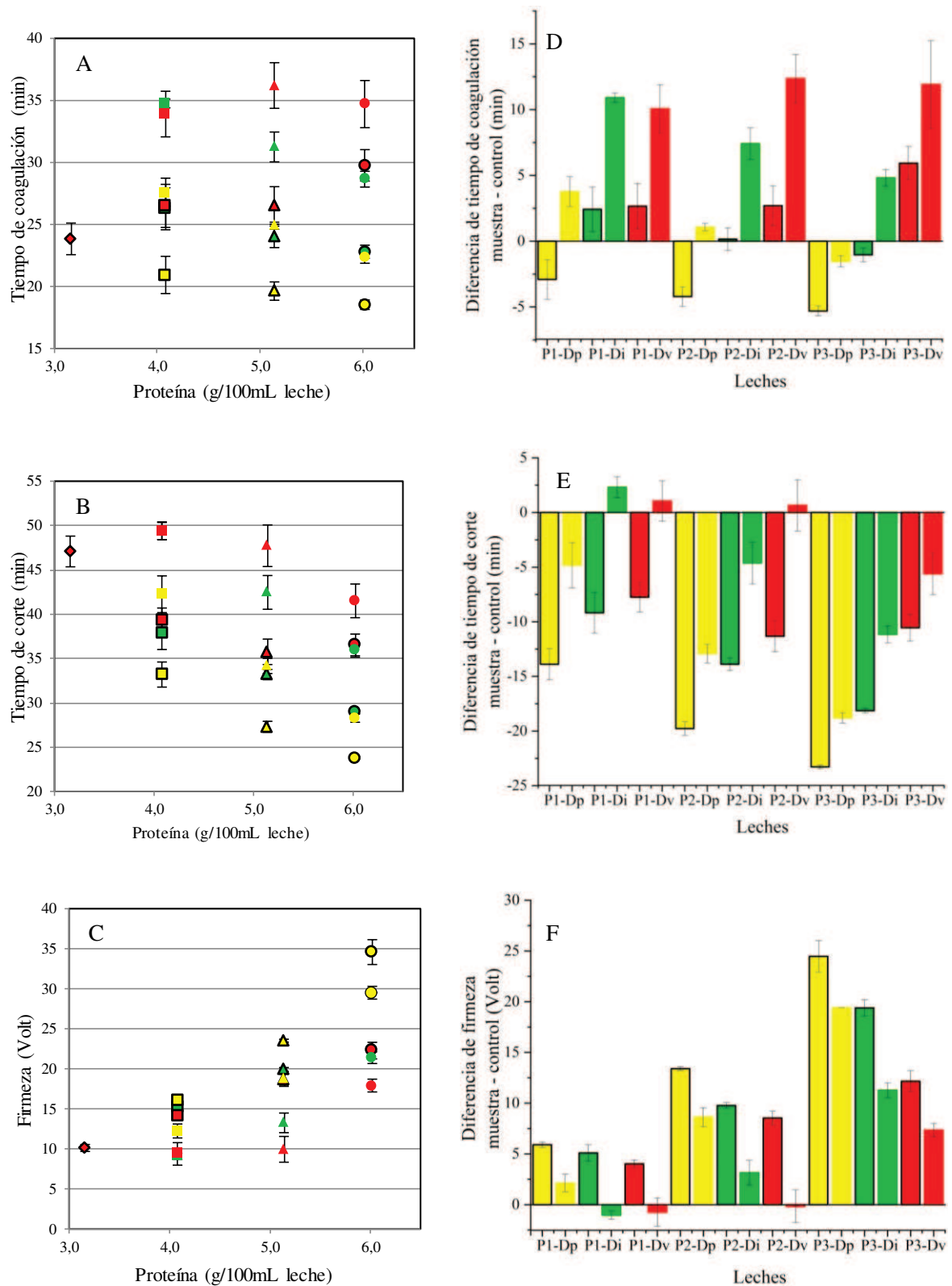
uso de una dosis por unidad de volumen permite que los tiempos de corte estén en un rango más acotado para leche con distintas concentraciones.

En cuanto a la firmeza, se observó en general a cada nivel de coagulante un aumento a mayor NP. Por otro lado, el uso de diferentes dosis de coagulante condujo a diferentes valores de firmeza en leches más concentradas, mientras que en leches menos concentradas, el efecto fue menos marcado. Además, los valores de firmeza siempre fueron menores para la experiencia sin calcio en comparación a sus correspondientes en la experiencia con calcio.

Los resultados obtenidos muestran que los mayores cambios en el tiempo de coagulación fueron debido principalmente al uso de diferente dosis de coagulante, mientras que los mayores cambios en la firmeza y el tiempo de corte se dieron en función de NP aunque la dosis también fue importante sobre todo a mayor NP.

Catarino et al. (2013) informaron resultados similares en leche de oveja con adición de coagulante por unidad de volumen; los autores encontraron un aumento del Tc con el aumento del NP. A su vez, estos autores hallaron una correlación lineal entre la firmeza de la cuajada y el contenido de proteína, lo que se asoció a un incremento más rápido de la firmeza cuando la concentración de las caseínas era mayor. Además, la leche UF puede alcanzar una mayor firmeza al mismo tiempo, lo que resulta ventajoso al momento del corte y de la sinéresis. En la misma línea, Karlson et al. (2007) investigaron las diferencias entre la coagulación de leche de vaca altamente concentrada (~ 19 % de caseína) y leche sin concentrar a pH 5,8 y encontraron que, al agregar la misma cantidad de coagulante, la leche concentrada mediante UF tiene un mayor tiempo de coagulación y mayor tasa de endurecimiento del gel que la leche no concentrada.

Los resultados obtenidos de los tratamientos experimentales también se presentan en la Figura 35, en la que se incluyó además el control; a su vez, con el objetivo de evaluar el comportamiento de cada tratamiento en relación al control, se presentan las diferencias entre ellos para cada uno de los parámetros estudiados. En general, el Tc y Tcorte disminuyeron, y la firmeza aumentó a medida que aumentaba el nivel de proteína, excepto para la dosis Dv donde la influencia fue más variable (Figura 35A, B y C). La influencia del NP en el Tc con respecto al control dependió de la dosis de coagulante, siendo más marcadas las diferencias cuando se utilizó las dosis Dv (rojo) y Di (verde) para las cuales los Tc fueron mayores al control (Figura 35D), sobre todo cuando no se adicionó calcio.



**Figura 35.** Tiempo de coagulación (A), tiempo de corte (B) y firmeza de la cuajada (C) y sus diferencias con el control (D, E, F, respectivamente) en función del nivel de proteínas (◆, 3,29 % p/v; ■, 4,08 % p/v (P1); ▲, 5,14 % p/v (P2); ●, 6,02 % p/v (P3)), dosis de coagulante (amarillo: Dp - 0,012  $\mu$ L de coagulante/mg proteína, verde: Di 0,75 de Dp; rojo: Dv- 0,405  $\mu$ L de coagulante/mL leche) y adición de calcio (sí: contorno, no: sin contorno). Se informa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

El uso de una dosis por unidad de volumen disminuye la proporción coagulante:caseína, lo que conduce a un aumento en el tiempo para generar suficiente hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína e inducir la agregación de las micelas de paracaseína; esto explica nuestros resultados. En trabajos previos, también se ha observado un ligero aumento en el tiempo de gelificación de leches concentradas por UF en comparación con leches sin concentrar cuando el coagulante se agregó por volumen, en lugar de por proteína (Daygleish, 1980; Guinee et al., 1996). En contraste, se puede observar que cuando se utilizó la mayor dosis de coagulante (Dp, amarillo) y calcio, los Tc fueron menores que el control. De esta manera, el uso de una dosis de coagulante por unidad de proteína en leches UF acelera la coagulación, lo que se puede contrarrestar mediante la no adición de calcio (Figura 35D). Por otro lado, si bien el uso de una dosis por volumen hace más lenta la coagulación de leche concentrada en relación a leche control, en este caso la adición de calcio permite que las diferencias no sean tan marcadas (Figura 35D).

En cuanto al Tcorte y firmeza (Figura 35E y F), las diferencias (menor Tcorte y mayor firmeza) con el control se incrementaron a medida que incrementaba el NP y la dosis de coagulante. En particular, los resultados de estos parámetros para los niveles P2 y P3 presentaron diferencias similares cuando se utilizó Dp sin calcio (amarillo sin contorno) y Di con calcio (verde con contorno). La adición de calcio en todas las combinaciones estudiadas arrojó mayores diferencias en relación al control.

Upreti et al. (2011) estudiaron los parámetros de coagulación (mediante Formagraph y viscosímetro) de leches UF o condensada al vacío (4,5 y 6 g% en proteína) comparadas con leche control (3,2 g%). El Tc fue más bajo y la firmeza de la cuajada fue mayor para leche con mayor contenido de proteína, mientras que un aumento en la dosis de coagulante condujo a una disminución del tiempo en el cual comenzó a incrementarse la viscosidad y del tiempo en el que alcanzó la máxima viscosidad. Algunos investigadores propusieron el uso de una menor temperatura de coagulación para disminuir la elevada velocidad de coagulación y endurecimiento de la cuajada que ocurre en leches UF y, de esta manera, facilitar el manejo de la cuajada en tina (Govindasamy-Lucey et al., 2011). Nuestros resultados indican que la no adición de calcio (a cualquier dosis de coagulante) en las leches UF sería otra estrategia para alcanzar el mismo objetivo, ya que permite obtener tiempos de corte y firmeza más similares al control. Asimismo, el uso de una dosis por volumen para elaboraciones de quesos con leches UF a todos los niveles de proteína sería adecuado si se quieren tener similares tiempos de corte que el control. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, el uso de una dosis por volumen, si bien permite un mejor manejo de la cuajada y ahorrar coagulante, disminuye la relación coagulante:caseína, lo que puede disminuir su actividad durante la maduración en relación a un queso control y tener implicancias negativas como bajos niveles de proteólisis (Cunha et al., 2006; Neocleous et al., 2002; Thoman et al., 2008). Por otro lado, el uso de una dosis por proteína dificulta el trabajo de la cuajada en



tina, pero asegura mayores niveles de coagulante durante la maduración lo que puede eliminar defectos de baja proteólisis reportados en quesos UF (Guinee et al., 2006a,b; Osturk et al., 2015); esta menor proteólisis fue atribuida a distintas causas, entre ellas una inhibición de la actividad de quimosina por las proteínas de suero de alto peso molecular retenidas (Benfeldt, 2006). La conveniencia de usar una dosis por volumen o por proteína debería ser evaluada en cada tipo de queso en particular, ya que la influencia puede ser diferente dependiendo el tiempo de maduración; en el próximo capítulo se estudiará en queso Cremoso.

### 4.3.3. Rendimiento quesero y composición del suero

Según el ANOVA de dos vías, en la experiencia con adición de calcio (Tabla 15), el rendimiento y el rendimiento ajustado sólo fueron afectados por el NP, observando mayores valores con el incremento del mismo. En la experiencia sin calcio, tanto el nivel proteico como la dosis de coagulante fueron significativos para el rendimiento y el rendimiento ajustado. En este caso el rendimiento también fue mayor a mayor concentración de la leche, excepto en el rendimiento ajustado que se observaron menores niveles para el nivel proteico P2, aunque los valores fueron muy cercanos. En relación a la dosis de coagulante, los valores del rendimiento y rendimiento ajustado fueron mayores para la dosis intermedia (Di) y menores para la mayor dosis (Dp), pero las diferencias numéricas fueron muy bajas.

Como se puede observar en la Figura 36A, el rendimiento se incrementó proporcionalmente al nivel de proteínas de la leche de partida ( $R^2=0,963$ ) (Figura 36A), mientras que los valores de rendimiento ajustado estuvieron en un rango estrecho (entre 14,7 y 16,5 %), aunque se observaron algunas diferencias según el NP. Guinee et al. (2006) obtuvieron resultados similares: observaron un aumento significativo del rendimiento a medida que la proteína de la leche aumentaba de 3,3 a 4,0 % p/p por UF, este incremento fue proporcional al contenido de proteína y grasa de la leche UF. El aumento informado fue de ~0,32 kg por 100 kg de leche por cada 0,1 % p/p de aumento de la proteína de la leche, coincidiendo esta tasa de aumento con la informada en trabajos previos (0,33 kg por 0,1%, p/p de proteína de leche).

En comparación con el control, se observó que hubo mayor diferencia en el rendimiento al aumentar el NP, mientras que se hallaron diferencias menores, de rango similar, para las diferentes dosis de coagulante y calcio. En cuanto al rendimiento ajustado se obtuvieron en general menores valores que el control para P1 y P2, aunque la diferencia fue <0,7 %, y mayores valores (~1%) para P3. Govindasamy-Lucey et al. (2011) informaron que los rendimientos queseros y ajustados por humedad fueron más altos en los quesos elaborados con leche UF que en los quesos controles, debido a los contenidos más altos de caseína y grasa en la leche UF. Estos autores también estudiaron la influencia de la temperatura de coagulación en el rendimiento quesero y ajustado y encontraron que fue menor cuando se utilizó una menor temperatura (28,3 °C vs 32,2 °C). Esta

disminución la asociaron a un aumento de pérdida de grasa atribuido a la menor velocidad de agregación de las micelas coaguladas y a la mayor debilidad de la cuajada en el momento del corte.

Podemos concluir que la concentración de la leche fue el factor que más influyó en el rendimiento quesero, mientras que la adición de calcio como la dosis de coagulante tuvieron un impacto menor.

**Tabla 15.** Rendimiento y rendimiento ajustado para las leches UF con distintas concentraciones y dosis de coagulante, en la experiencia con y sin calcio. Significancia del ANOVA de dos vías de los factores estudiados: F1- nivel proteico (NP) y F2- dosis de coagulante.

		<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Rendimiento ajustado (%)</b>
Con calcio	P1-Dp	18,5±0,3 <sup>c</sup>	15,1±0,3 <sup>b</sup>
	P1-Di	18,8±0,3 <sup>c</sup>	15,4±0,2 <sup>b</sup>
	P1-Dv	18,8±0,2 <sup>c</sup>	15,4±0,1 <sup>b</sup>
	P2-Dp	22,5±0,4 <sup>b</sup>	14,9±0,3 <sup>b</sup>
	P2-Di	23,1±1,0 <sup>b</sup>	15,0±0,3 <sup>b</sup>
	P2-Dv	23,3±1,7 <sup>b</sup>	14,7±0,2 <sup>b</sup>
	P3-Dp	27,9±1,2 <sup>a</sup>	15,6±0,4 <sup>a</sup>
	P3-Di	28,2±0,1 <sup>a</sup>	16,0±0,0 <sup>a</sup>
	P3-Dv	29,1±0,6 <sup>a</sup>	16,5±0,3 <sup>a</sup>
Significancia	F1 NP	*	*
	F2 Dosis	NS	NS
	F1*F2	NS	NS
Sin calcio	P1-Dp	18,1±0,1 <sup>B,c</sup>	14,8±0,1 <sup>B,b</sup>
	P1-Di	18,5±0,1 <sup>A,c</sup>	15,1±0,0 <sup>A,b</sup>
	P1-Dv	18,4±0,1 <sup>A,B,c</sup>	15,0±0,0 <sup>A,B,b</sup>
	P2-Dp	22,2±0,2 <sup>B,b</sup>	14,7±0,1 <sup>B,c</sup>
	P2-Di	22,3±0,2 <sup>A,b</sup>	14,8±0,1 <sup>A,c</sup>
	P2-Dv	22,4±0,3 <sup>A,B,b</sup>	14,8±0,2 <sup>A,B,c</sup>
	P3-Dp	28,2±0,1 <sup>B,a</sup>	16,0±0,1 <sup>B,a</sup>
	P3-Di	28,7±0,4 <sup>A,a</sup>	16,2±0,2 <sup>A,a</sup>
	P3-Dv	28,5±0,1 <sup>A,B,a</sup>	16,1±0,1 <sup>A,B,a</sup>
Significancia	F1 NP	*	*
	F2 Dosis	*	*
	F1*F2	NS	NS

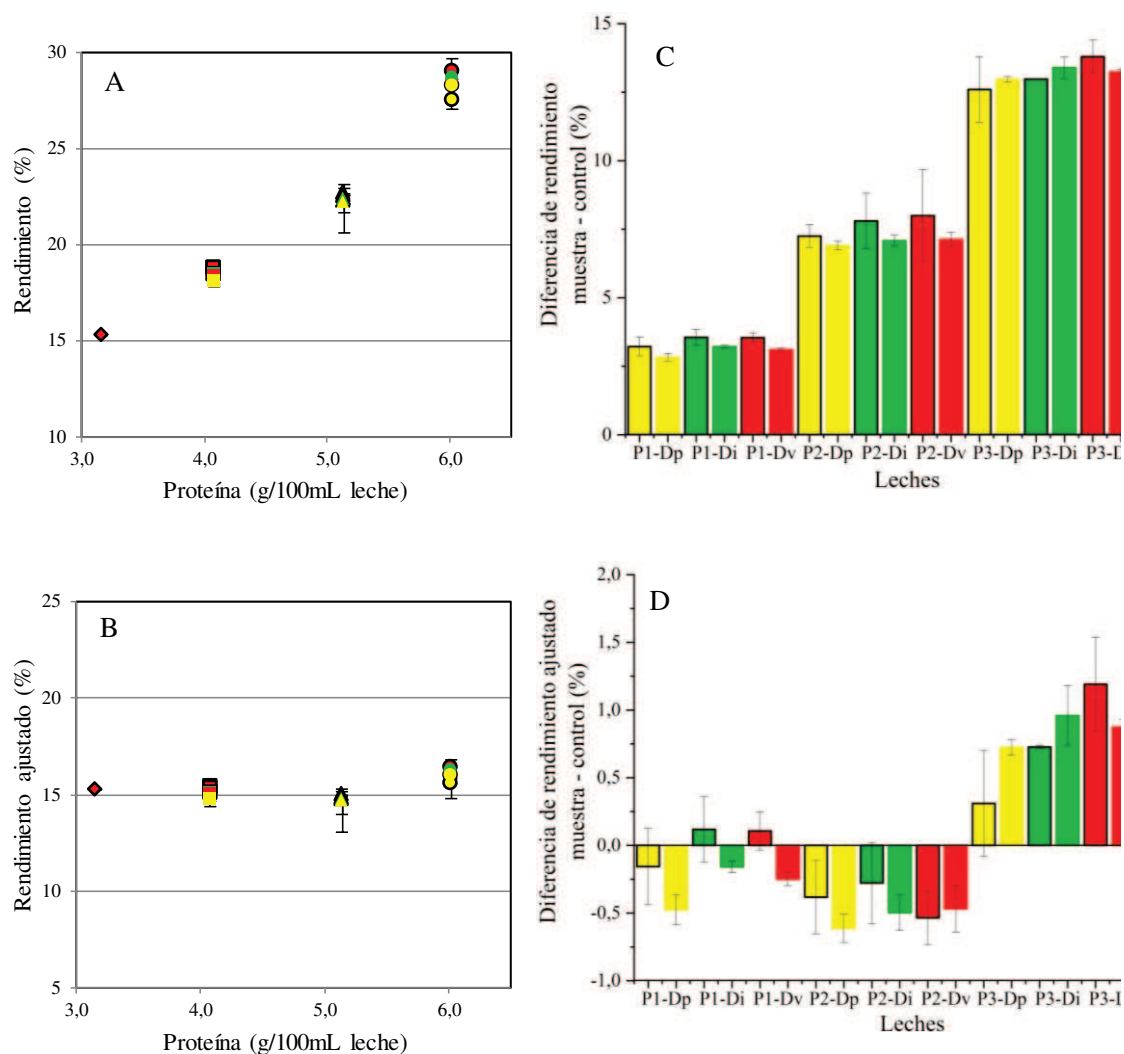
NS: No significativo; \* p < 0,05.

Se informa el promedio±desviación estándar del triplicado de la experiencia.

Nivel proteico: P1: 4,08 % p/v, P2: 5,14 % p/v y P3: 6,02 % p/v. Dosis de coagulante: Dp- 0,012 µL de coagulante/mg proteína (dosis por unidad de proteína); Di- 0,75 de Dp; y Dv- 0,405 µL de coagulante/mL leche (dosis por volumen de leche).

<sup>a,b,c</sup> Los valores de cada columna (para cada experiencia) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) para F1.

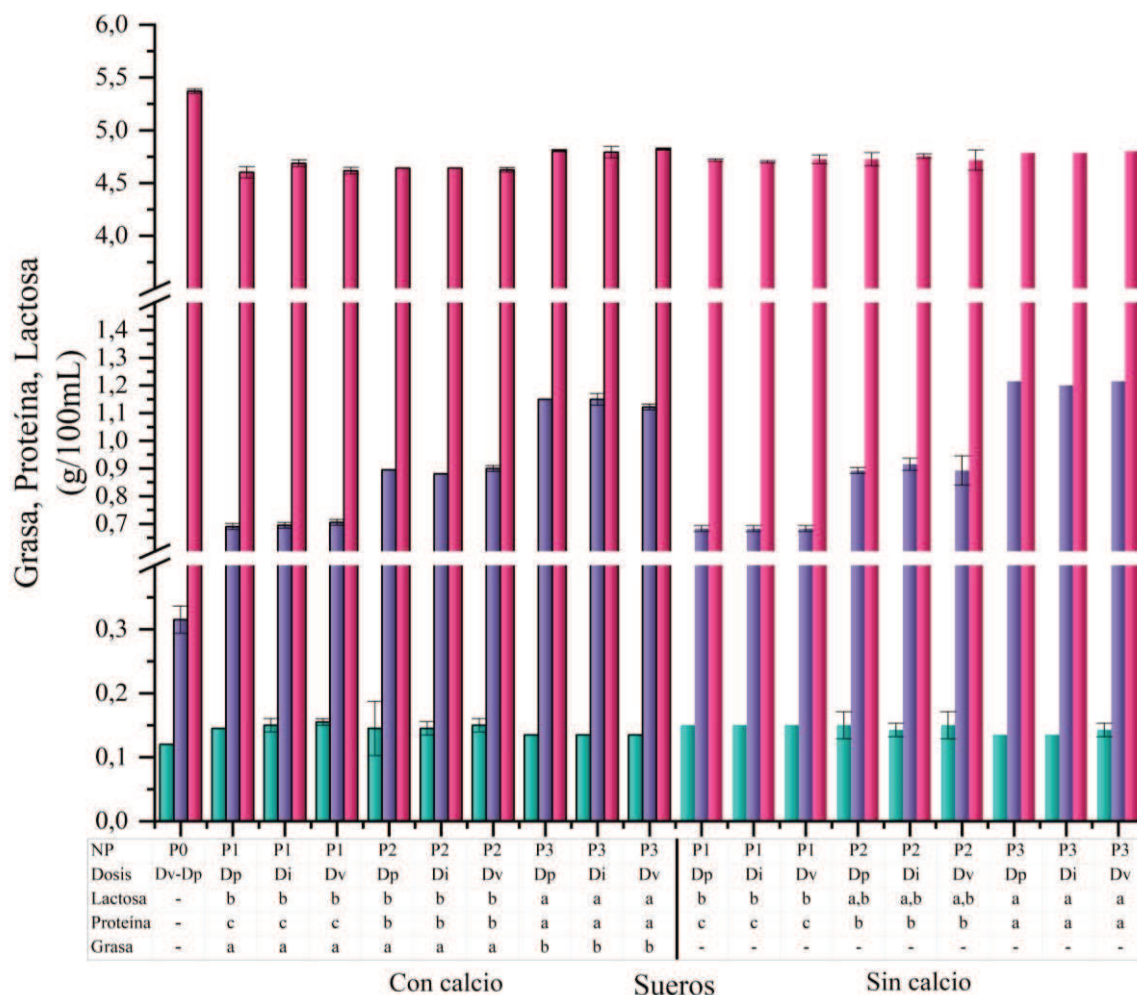
<sup>A,B</sup> Los valores de cada columna (para cada experiencia) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) para F2.



**Figura 36.** Rendimiento (A) y rendimiento ajustado (%) (B) y sus diferencias con el control (C, D, y E) en función del nivel de proteínas (◆, 3,29 % p/v (P0); ■, 4,08 % p/v (P1); ▲, 5,14 % p/v (P2); ●, 6,02 % p/v (P3)), dosis de coagulante (amarillo: Dp - 0,012  $\mu$ L de coagulante/mg proteína, verde: Di 0,75 de Dp; rojo: Dv- 0,405  $\mu$ L de coagulante/mL leche) y adición de calcio (sí: contorno, no: sin contorno). Se informa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

En la Figura 37 se presenta la composición de los sueros correspondiente a cada combinación estudiada. En general, la materia grasa queda incluida mayoritariamente en la cuajada mientras que, de la fracción proteica, las caseínas conforman la cuajada y solamente una fracción de las proteínas de suero queda retenida, solubilizada en la fracción acuosa. La mayor parte de las proteínas de suero se separa en esta fracción (Janhøj & Qvist, 2010). La UF concentra tanto las caseínas como las proteínas de suero; por ende, a mayores niveles de concentración de la leche por UF, se tendrá mayor nivel de proteínas de suero (Mistry & Maubois, 2017). En relación a esto, en el ANOVA de dos vías, se observó que el NP tuvo una influencia significativa en el nivel de proteínas en el suero. Se encontraron mayores niveles en el suero proveniente de la leche más concentrada, tanto para la experiencia con y sin calcio, lo que está de acuerdo con lo mencionado anteriormente. En relación a la materia grasa, se presentaron diferencias según el NP solamente

en la experiencia con calcio: el nivel de grasa fue menor para el suero proveniente de las leches más concentradas. Esto concuerda con lo mencionado anteriormente, se retuvo la mayor parte de la materia grasa, independientemente del nivel que había en la leche; incluso hubo una retención levemente mayor para la leche con el mayor NP, lo que puede atribuirse a una mejor inclusión de la grasa en el coágulo.



**Figura 37.** Contenido de ■,grasa, ■, proteína y ■,lactosa de los sueros obtenidos en la experiencia de rendimiento queso con leche UF. En la tabla inferior se muestran los grupos de medias homogéneas según el test de Tukey. <sup>a,b</sup>Resultados con diferente letra (para cada experiencia: con y sin calcio) para un mismo compuesto difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Los valores (g/100mL de suero) se presentan como el promedio±desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

En cuanto a la lactosa, se encontraron algunas diferencias según la concentración de la leche, pero las diferencias numéricas fueron pequeñas. En comparación con el control, el suero de leche UF presentó mayores niveles de proteína y grasa y menos lactosa, como consecuencia de las diferencias de la leche de partida.

Govindasamy-Lucey et al. (2011) observaron resultados similares: el contenido de proteína y grasa fueron significativamente más altos en el suero obtenido a partir de leche UF con respecto

al obtenido de elaboraciones con la leche sin concentrar, mientras que los niveles de lactosa fueron más bajos. A su vez, para los valores ensayados por estos autores, la temperatura de coagulación y el tiempo de corte no tuvieron efecto sobre la composición del suero.

#### 4.4. Influencia del agregado de leche en polvo descremada en las propiedades de coagulación de la leche y en el rendimiento quesero

##### 4.4.1. Composición y pH

La composición de la LPD utilizada para el enriquecimiento proteico se muestra en la Tabla 16, y los valores del pH y de la composición final de la leche control (P0) y las muestras experimentales (P1, P2 y P3) se presentan en la Tabla 17.

**Tabla 16.** Composición global de la LPD de bajo tratamiento térmico utilizada para fortificar la leche en la experiencia de Optigraph.

Producto	Grasa (%p/p)	Proteína (%p/p)	Lactosa (%p/p)
LPD	1,06±0,03	33,74±0,05	53,96±0,08

Como se puede observar en la Tabla 16, la LPD aporta proteínas pero también lactosa, que es el compuesto mayoritario de este polvo; por este motivo los niveles de proteína, lactosa y sólidos totales aumentaron en las leches adicionadas de LPD (Tabla 17). Por el contrario, la LPD no aporta cantidades significativas de grasa y por tal motivo su concentración no se modificó en las leches adicionadas de LPD. Una diferencia importante entre la composición de la leche concentrada por UF y por agregado de LPD es el nivel de lactosa, que disminuye en el caso de UF ya que pasa libremente por la membrana de filtración, pero aumenta cuando se adiciona LPD, ya que predomina en su composición (~54 % p/p).

El agregado de LPD disminuyó el pH de la leche, lo que está relacionado al aumento de los componentes iónicos y posiblemente a la precipitación parcial de fosfato de calcio. Anema (2009) mostró que el pH final de las leches con incremento de sólidos totales de 9,6 a 38,4 % variaba desde pH 6,7 a pH 5,9.

**Tabla 17.** Composición global y pH de las leches utilizadas en la experiencia con LPD.

Parámetro	Leche			
	P0	P1	P2	P3
pH	6,60±0,05 <sup>a</sup>	6,44±0,03 <sup>b</sup>	6,38±0,04 <sup>c</sup>	6,38±0,03 <sup>c</sup>
Grasa (% p/v)	3,07±0,02	3,09±0,03	3,06±0,02	3,02±0,01
Proteína (% p/v)	3,35±0,02 <sup>d</sup>	4,17±0,03 <sup>c</sup>	4,86±0,02 <sup>b</sup>	5,62±0,02 <sup>a</sup>
Lactosa (% p/v)	4,94±0,03 <sup>d</sup>	6,28±0,01 <sup>c</sup>	7,34±0,02 <sup>b</sup>	8,60±0,02 <sup>a</sup>
Sólidos Totales no grasos (% p/v)	9,07±0,03 <sup>d</sup>	11,54±0,02 <sup>c</sup>	13,10±0,02 <sup>b</sup>	15,38±0,02 <sup>a</sup>
Sólidos Totales (% p/v)	11,97±0,02 <sup>d</sup>	13,63±0,03 <sup>c</sup>	17,24±0,03 <sup>b</sup>	18,74±0,02 <sup>a</sup>

Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

P0: leche entera sin adición de LPD; P1, P2 y P3: leche entera adicionadas de LPD en un nivel de 2,9, 4,8 y 7,7 % p/v, respectivamente.

<sup>a,b,c,d</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2. Propiedades de coagulación

Según el ANOVA de dos vías realizado para la experiencia con y sin adición de calcio (Tabla 18), los tres parámetros analizados: tiempo de coagulación, tiempo de corte y la firmeza de la cuajada, fueron afectados significativamente por los dos factores estudiados y la interacción entre ellos. En cada experiencia, mayores valores de tiempo de coagulación y de corte fueron detectados para las dosis de coagulante por unidad de volumen (Dv) y para Di en el menor NP. A su vez, para una misma dosis de coagulante, para los niveles Di y Dp, el tiempo de coagulación disminuyó progresivamente ( $p < 0,05$ ) con el aumento del NP, lo que puede estar relacionado tanto a la mayor concentración de proteínas como al pH más bajo de las leches enriquecidas. El menor pH puede incrementar la velocidad de la reacción enzimática y, por lo tanto, conducir a un menor tiempo de coagulación y de corte (Daviau et al., 2000). Por el contrario, para la dosis por volumen (Dv), el tiempo de coagulación fue similar para los distintos NP. Si bien el incremento proteico conduce a una mejora en general de las propiedades de coagulación, en este caso el uso de una dosis por volumen (que representa un menor nivel de coagulante:caseína) enmascara el efecto del NP. Por otro lado, para un mismo NP, en general, los tiempos de coagulación y corte disminuyeron progresivamente ( $p < 0,05$ ) con el aumento de la dosis de coagulante. En este caso también se observó que el calcio contribuyó a disminuir los tiempos de coagulación y corte como se encontró en la experiencia de UF.

Con respecto a la firmeza de la cuajada se observó que fue mayor a mayores dosis de coagulante y mayor NP. Los valores de firmeza para las muestras sin calcio fueron siempre menores que para sus correspondientes con calcio.

Hoyjecki et al. (2022) obtuvieron resultados similares a los nuestros. Estos investigadores estudiaron la influencia de la dosis de coagulante, el pH y la temperatura de coagulación en leche de cabra cruda y pasteurizada y observaron que, al disminuir la dosis de coagulante, aumentaba el tiempo de coagulación y que esto también impactaba en la firmeza de la cuajada (mayor dosis de coagulante, mayor firmeza).

**Tabla 18.** Tiempo de coagulación, tiempo de corte y firmeza de la cuajada para la leche adicionada de distintos niveles de LPD y dosis de coagulante, en la experiencia con y sin calcio. Significancia del ANOVA de dos vías de los factores estudiados: F1 - nivel proteico (NP) y F2- dosis de coagulante.

		Tiempo de coagulación (min)	Tiempo de corte (min)	Firmeza (Volt)
Con calcio	P1-Dp	21,9±1,4 <sup>E</sup>	36,9±1,3 <sup>F</sup>	17,1±0,2 <sup>E</sup>
	P1-Di	29,3±0,4 <sup>C</sup>	48,0±0,6 <sup>C,D</sup>	13,0±0,3 <sup>H</sup>
	P1-Dv	28,9±0,6 <sup>C</sup>	48,7±1,3 <sup>C</sup>	12,5±0,5 <sup>H</sup>
	P2-Dp	19,4±0,2 <sup>F</sup>	33,5±1,1 <sup>G</sup>	18,3±0,1 <sup>D</sup>
	P2-Di	25,3±1,2 <sup>D</sup>	41,4±0,4 <sup>E</sup>	15,9±0,2 <sup>F</sup>
	P2-Dv	27,7±0,2 <sup>C</sup>	42,6±0,3 <sup>E</sup>	16,3±0,2 <sup>E,F</sup>
	P3-Dp	17,9±0,4 <sup>F</sup>	29,4±0,1 <sup>H</sup>	22,5±0,5 <sup>C</sup>
	P3-Di	23,0±0,3 <sup>E</sup>	36,6±0,3 <sup>F</sup>	19,2±0,1 <sup>D</sup>
	P3-Dv	29,7±0,6 <sup>C</sup>	45,6±0,9 <sup>D</sup>	15,0±0,5 <sup>G</sup>
Significancia	F1 NP	*	*	*
	F2 Dosis	*	*	*
	F1*F2	*	*	*
Sin calcio	P1-Dp	25,4±0,6 <sup>F</sup>	41,6±0,6 <sup>F</sup>	15,4±0,5 <sup>D,E</sup>
	P1-Di	33,9±0,8 <sup>C,D</sup>	55,3±1,2 <sup>C</sup>	10,3±0,4 <sup>G</sup>
	P1-Dv	32,9±1,0 <sup>C</sup>	54,5±3,0 <sup>C</sup>	10,6±1,0 <sup>G</sup>
	P2-Dp	21,9±0,7 <sup>G</sup>	37,7±0,4 <sup>G</sup>	16,7±0,2 <sup>D</sup>
	P2-Di	28,1±0,9 <sup>E</sup>	45,7±1,2 <sup>E</sup>	14,0±0,5 <sup>E</sup>
	P2-Dv	31,8±0,6 <sup>D</sup>	49,6±0,9 <sup>D</sup>	13,2±0,9 <sup>E</sup>
	P3-Dp	19,5±0,3 <sup>H</sup>	31,9±0,6 <sup>H</sup>	21,3±0,3 <sup>C</sup>
	P3-Di	24,9±0,4 <sup>F</sup>	39,7±0,6 <sup>F,G</sup>	17,3±0,4 <sup>D</sup>
	P3-Dv	32,6±0,8 <sup>C,D</sup>	50,1±0,7 <sup>D</sup>	12,7±0,3 <sup>E,F</sup>
Significancia	F1 NP	*	*	*
	F2 Dosis	*	*	*
	F1*F2	*	*	*

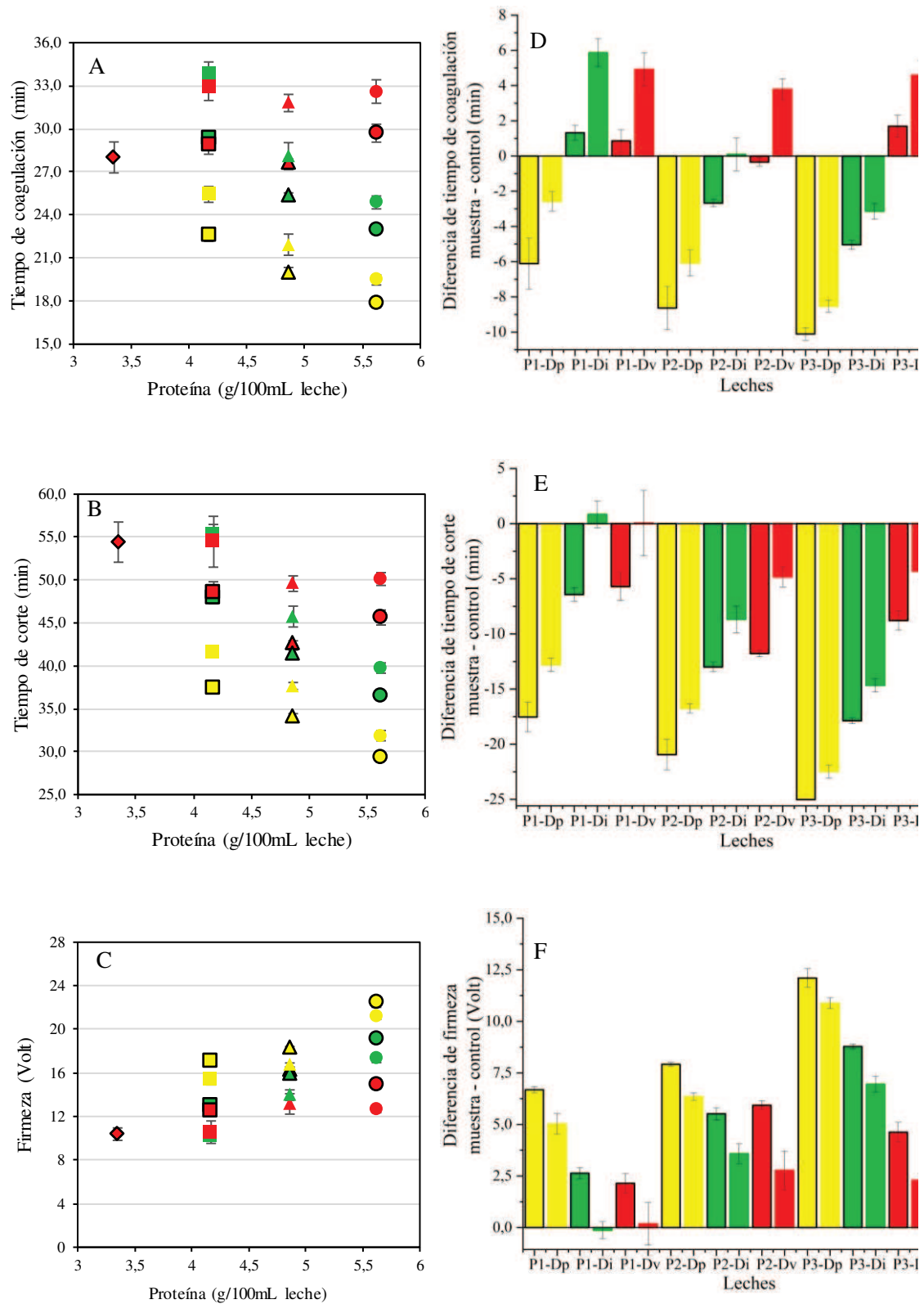
NS: No significativo; \* p < 0,05.

Se informa el promedio ± desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

Nivel proteico: P1: 4,17 % p/v, P2: 4,86 % p/v y P3: 5,62 % p/v. Dosis de coagulante: Dp- 0,012 µL de coagulante/mg proteína (dosis por unidad de proteína); Di- 0,75 de Dp; y Dv- 0,405 µL de coagulante/mL leche (dosis por volumen de leche).

<sup>C,D,E,F,G,H</sup> Los valores de cada columna (para cada experiencia) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) cuando F1 x F2 es significativo.

En la Figura 38 se muestran en forma gráfica los valores de los parámetros de coagulación para todas las condiciones experimentales y para el control, como también los resultados de la diferencia de los valores de los parámetros de coagulación para cada condición experimental y el control.



**Figura 38.** Tiempo de coagulación (A), tiempo de corte (B) y firmeza de la cuajada (C) y sus diferencias con el control (D-F) en función del nivel de proteínas (◆, 3,35 % p/v; ■, 4,17 % p/v (P1); ▲, 4,86 % p/v (P2); ●, 5,62 % p/v (P3)), dosis de coagulante (amarillo: Dp - 0,012  $\mu$ L de coagulante/mg proteína, verde: Di 0,75 de Dp; rojo: Dv- 0,405  $\mu$ L de coagulante/mL leche) y adición de calcio (sí: contorno, no: sin contorno). Se informa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.



Se observaron valores por encima y por debajo del tiempo de coagulación del control, según las condiciones evaluadas (Figura 38D). Todos los niveles proteicos con la dosis mayor (Dp, amarillo) y los dos mayores niveles proteicos (P2 y P3) con la dosis intermedia (Di, verde) disminuyeron el tiempo de coagulación en relación al control. El resto de las condiciones aumentó el Tc, aunque en general en un nivel bajo; los incrementos fueron mayores cuando no se adicionó calcio y se usó la dosis menor (Dv, rojo) para todos los niveles proteicos, y cuando se usó la dosis intermedia (Di) en el menor nivel proteico (P1). Por otro lado, todas las condiciones evaluadas en las leches adicionadas con LPD (tanto en la experiencia con y sin calcio) condujeron a menores tiempos de corte (Figura 38E) y mayor firmeza (Figura 38F) que el control, encontrando mayores diferencias en los niveles proteicos más altos y mayores dosis de coagulante. La única excepción a esto fue para la leche con P1 y dosis Dv y Di en la experiencia sin calcio, que mostraron resultados muy similares al control. El agregado de calcio disminuyó el tiempo de corte y aumentó la firmeza en todas las condiciones ensayadas.

A todos los niveles proteicos, la dosis Dv sin adición de calcio mostró mayores tiempos de coagulación que el control (Figura 38D) pero condujo a tiempos de corte y firmeza de la cuajada (Figura 38E y F) más similares a los de la leche control, lo que permite, al igual que lo mencionado en la experiencia con leche UF, un mejor manejo de la cuajada en tina y ahorrar coagulante y calcio. Sin embargo, como ya fue resaltado anteriormente, el coagulante residual también tiene importancia en la proteólisis durante la maduración, por lo que hay que evaluar en cada tipo de queso la conveniencia de usar una dosis por volumen o por proteína.

Las modificaciones en los parámetros de coagulación de esta experiencia mostraron la misma tendencia que la observada en la experiencia con leche UF. Sin embargo, la diferencia entre la adición o no de calcio fue menor en esta experiencia que en la de UF. La LPD aporta también minerales, entre ellos calcio, en la misma proporción en comparación con los otros componentes de la leche. En el caso de la leche UF, observamos que el nivel de calcio no se incrementó en la misma proporción que las proteínas. De esta manera, es probable que la leche enriquecida con LPD tenga más calcio que la leche UF y por ello las diferencias no sean tan marcadas entre la adición o no de calcio; sin embargo, en la presente experiencia no se determinó el calcio.

#### **4.4.3. Rendimiento quesero y composición del suero**

El ANOVA de dos vías (Tabla 19) mostró que el rendimiento quesero y el rendimiento ajustado fue afectado significativamente por el NP: a mayor nivel de proteína, mayor rendimiento, mientras que la dosis de coagulante no tuvo un efecto significativo. Los valores del rendimiento quesero y del rendimiento ajustado están en el mismo rango que los obtenidos en la experiencia de leche UF.

**Tabla 19.** Rendimiento y rendimiento ajustado para leche adicionada con distintos niveles de LPD y dosis de coagulante, en la experiencia con y sin calcio. Significancia del ANOVA de dos vías de los factores estudiados: F1- nivel proteico (NP) y F2- dosis de coagulante.

		<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Rendimiento ajustado (%)</b>
Con calcio	P1-Dp	20,1±0,1 <sup>c</sup>	17,8±0,1 <sup>b</sup>
	P1-Di	19,8±0,7 <sup>c</sup>	17,9±0,1 <sup>b</sup>
	P1-Dv	20,4±0,3 <sup>c</sup>	18,0±0,3 <sup>b</sup>
	P2-Dp	23,5±0,7 <sup>b</sup>	19,0±0,6 <sup>b</sup>
	P2-Di	22,4±1,0 <sup>b</sup>	17,7±0,2 <sup>b</sup>
	P2-Dv	23,0±1,1 <sup>b</sup>	18,6±0,9 <sup>b</sup>
	P3-Dp	27,9±0,6 <sup>a</sup>	20,7±0,4 <sup>a</sup>
	P3-Di	28,0±0,7 <sup>a</sup>	20,8±0,5 <sup>a</sup>
	P3-Dv	27,4±0,5 <sup>a</sup>	20,1±0,0 <sup>a</sup>
Significancia	F1 NP	*	*
	F2 Dosis	NS	NS
	F1*F2	NS	NS
Sin calcio	P1-Dp	19,6±0,2 <sup>c</sup>	17,3±0,2 <sup>c</sup>
	P1-Di	19,9±0,2 <sup>c</sup>	17,6±0,2 <sup>c</sup>
	P1-Dv	20,0±0,1 <sup>c</sup>	17,7±0,1 <sup>c</sup>
	P2-Dp	22,8±0,3 <sup>b</sup>	18,5±0,2 <sup>b</sup>
	P2-Di	21,9±0,9 <sup>b</sup>	17,8±0,8 <sup>b</sup>
	P2-Dv	22,2±0,4 <sup>b</sup>	18,0±0,3 <sup>b</sup>
	P3-Dp	27,9±0,1 <sup>a</sup>	20,7±0,1 <sup>a</sup>
	P3-Di	27,8±0,5 <sup>a</sup>	20,7±0,3 <sup>a</sup>
	P3-Dv	27,3±0,1 <sup>a</sup>	20,3±0,1 <sup>a</sup>
Significancia	F1 NP	*	*
	F2 Dosis	NS	NS
	F1*F2	NS	NS

NS: No significativo; \* p < 0,05

Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

Nivel proteico: P1: 4,17 % p/v, P2: 4,86 % p/v y P3: 5,62 % p/v. Dosis de coagulante: Dp- 0,012 µL de coagulante/mg proteína (dosis por unidad de proteína); Di- 0,75 de Dp; y Dv- 0,405 µL de coagulante/mL leche (dosis por volumen de leche).

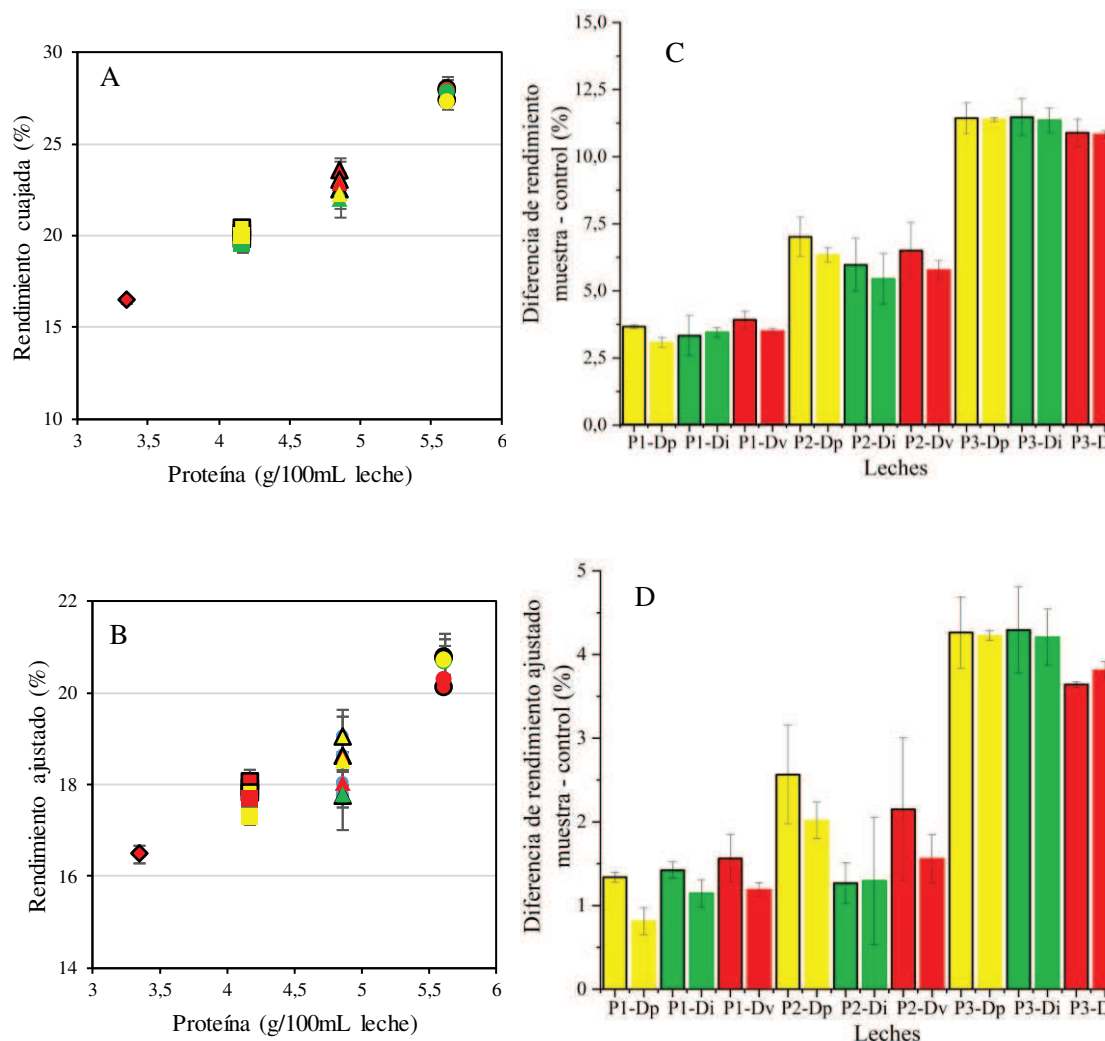
<sup>a,b,c</sup> Los valores de cada columna con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) para F1.

Al igual que lo observado para la experiencia con leche UF, el rendimiento quesero (Figura 39A) se incrementó proporcionalmente al nivel de proteínas de la leche de partida ( $R^2=0,968$ ). En este caso el rendimiento ajustado (Figura 39B) mostró niveles en ascenso al aumentar el NP pero las diferencias fueron menores a 3 %.

En relación a las diferencias encontradas con el control, se observó que hubo mayor diferencia en el rendimiento quesero y rendimiento ajustado al aumentar el NP, mientras que los valores fueron similares entre las diferentes dosis de coagulante y calcio, tal cual como ocurrió en la experiencia UF.

Otros autores también informaron un aumento en el rendimiento proporcional a los sólidos totales cuando se utilizó leche enriquecida con LPD o concentrado de proteína de leche (Brito et al., 2000; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2003a,b). Moynihan (2015) reportó una relación lineal entre

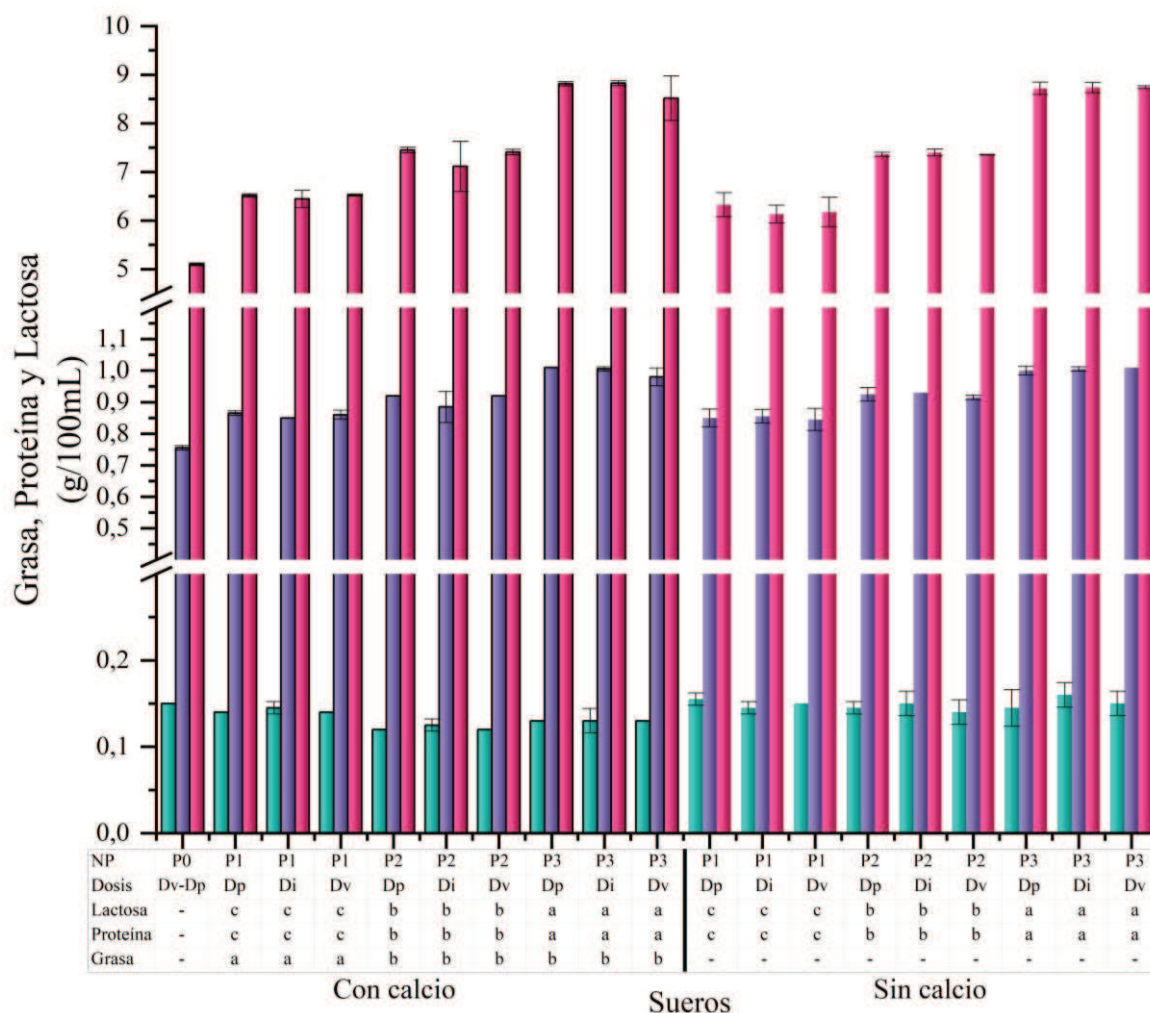
los sólidos totales de la leche y el rendimiento ajustado por humedad; para la leche sin agregado de LPD (12,3 % sólidos totales) el rendimiento ajustado fue ~ 10%, mientras en el máximo nivel de adición de LPD (17,5 % sólidos totales) el rendimiento ajustado fue de 15 %. Las diferencias con el control son similares a las de nuestro estudio.



**Figura 39.** Rendimiento (A) y rendimiento ajustado (B) y sus diferencias con el control (C-D) en función del nivel de proteínas (◆, 3,35 % p/v; ■, 4,17 % p/v (P1); ▲, 4,86 % p/v (P2); ●, 5,62 % p/v (P3)), dosis de coagulante (amarillo: Dp - 0,012  $\mu$ L de coagulante/mg proteína, verde: Di 0,75 de Dp; rojo: Dv- 0,405  $\mu$ L de coagulante/mL leche) y adición de calcio (sí: contorno, no: sin contorno). Se informa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

La composición de los sueros correspondiente a cada condición estudiada se puede observar en la Figura 40. Según el ANOVA de dos vías, se encontraron niveles significativamente mayores de proteína y lactosa en el suero proveniente de la leche con mayores niveles de concentración, tanto para la experiencia con y sin calcio, mientras que el nivel de grasa fue significativamente mayor para el suero de la leche P1 (valores similares al de la leche control) que para las restantes, en la experiencia con calcio. Como ya fue mencionado en la experiencia anterior, una fracción de

las proteínas (proteínas de suero) y de la lactosa se pierde en el suero; estos compuestos se incrementan en la leche por la adición de LPD, por lo que también aumentan en el suero, siendo mayores los cambios a mayores niveles de adición. En esta experiencia los niveles de lactosa encontrados fueron entre 2 y 4 % mayores que en la experiencia de UF y esto se debe a que en el tratamiento por membrana, la lactosa se pierde en el permeado. Estas diferencias también fueron encontradas en la leche de partida. Los valores de grasa fueron bajos y, en su mayoría, independientes del nivel de adición de LPD, ya que este polvo no aporta materia grasa. La dosis de coagulante no influyó en la composición del suero.



**Figura 40.** Contenido de ■,grasa, ■, proteína y ■,lactosa de los sueros obtenidos en la experiencia de rendimiento queso con leche LPD y leche control. En la tabla inferior se muestran los grupos de medias homogéneas según el test de Tukey. <sup>a,b,c</sup> Resultados con diferente letra (para cada experiencia: con y sin calcio) para un mismo compuesto difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Los valores (g/100mL de suero) se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

#### 4.5. Influencia del agregado de Proteínas de Suero Microparticuladas (PSM) en las propiedades de coagulación de la leche y en el rendimiento quesero

##### 4.5.1. Composición y pH

En la Tabla 20 se presenta la composición del polvo agregado para enriquecer la leche de la experiencia con PSM. Como se puede observar, este polvo contiene un alto nivel de proteínas (>50 %), mayor al de la LPD, como también de lactosa, aunque en este caso es menor que el que aporta la LPD.

**Tabla 20.** Composición del producto comercial de PSM utilizado para fortificar la leche de elaboración.

Producto	Grasa (%p/p)	Proteína (%p/p)	Lactosa (%p/p)
PSM	3,64±0,03	51,94±0,05	42,28±0,08

El análisis de composición y el pH de cada leche utilizada en esta experiencia se muestra en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Composición global y pH de las leches utilizadas en la experiencia con leche adicionada de PSM.

Leche	pH	Grasa (%p/v)	Proteína (%p/v)	Lactosa (%p/v)	Sólidos Totales nG (%p/v)	Sólidos Totales (%p/v)
MG1 P0	6,65±0,02 <sup>a</sup>	3,44±0,02 <sup>a</sup>	3,20±0,00 <sup>d</sup>	4,82±0,00 <sup>d</sup>	8,76±0,01 <sup>d</sup>	12,13±0,02 <sup>d</sup>
MG1 P1	6,45±0,00 <sup>b</sup>	3,12±0,03 <sup>b</sup>	3,62±0,01 <sup>c</sup>	5,14±0,02 <sup>c</sup>	9,60±0,02 <sup>c</sup>	12,50±0,01 <sup>c</sup>
MG1 P2	6,42±0,03 <sup>b,c</sup>	3,08±0,03 <sup>b</sup>	4,00±0,02 <sup>b</sup>	5,36±0,01 <sup>b</sup>	10,25±0,02 <sup>b</sup>	12,89±0,02 <sup>b</sup>
MG1 P3	6,38±0,03 <sup>c</sup>	3,09±0,02 <sup>b</sup>	4,42±0,01 <sup>a</sup>	5,56±0,01 <sup>a</sup>	10,92±0,02 <sup>a</sup>	13,35±0,03 <sup>a</sup>
MG2 P0	6,60±0,03 <sup>a</sup>	1,79±0,01 <sup>a</sup>	3,27±0,02 <sup>d</sup>	4,92±0,02 <sup>d</sup>	8,88±0,03 <sup>d</sup>	10,47±0,02 <sup>d</sup>
MG2 P1	6,45±0,00 <sup>b</sup>	1,74±0,04 <sup>b</sup>	3,69±0,00 <sup>c</sup>	5,22±0,02 <sup>c</sup>	9,75±0,02 <sup>c</sup>	11,27±0,02 <sup>c</sup>
MG2 P2	6,40±0,00 <sup>c</sup>	1,62±0,02 <sup>c</sup>	4,06±0,01 <sup>b</sup>	6,66±0,00 <sup>b</sup>	10,88±0,01 <sup>b</sup>	15,24±0,02 <sup>b</sup>
MG2 P3	6,38±0,04 <sup>c</sup>	1,68±0,02 <sup>d</sup>	4,44±0,02 <sup>a</sup>	6,84±0,01 <sup>a</sup>	11,52±0,02 <sup>a</sup>	15,74±0,02 <sup>a</sup>
MG3 P0	6,64±0,03 <sup>a</sup>	1,07±0,01 <sup>b</sup>	3,32±0,01 <sup>d</sup>	4,97±0,01 <sup>d</sup>	8,95±0,01 <sup>d</sup>	9,75±0,02 <sup>d</sup>
MG3 P1	6,45±0,00 <sup>b</sup>	0,96±0,03 <sup>c</sup>	3,71±0,01 <sup>c</sup>	5,23±0,01 <sup>c</sup>	9,76±0,02 <sup>c</sup>	10,49±0,01 <sup>c</sup>
MG3 P2	6,45±0,06 <sup>b</sup>	1,18±0,02 <sup>a</sup>	3,96±0,02 <sup>b</sup>	6,58±0,02 <sup>b</sup>	10,70±0,02 <sup>b</sup>	14,68±0,02 <sup>b</sup>
MG3 P3	6,43±0,04 <sup>b</sup>	1,18±0,01 <sup>a</sup>	4,34±0,01 <sup>a</sup>	6,82±0,01	11,38±0,01 <sup>a</sup>	15,14±0,01 <sup>a</sup>

Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

MG1, MG2 y MG3 leche con niveles de materia grasa 3,4; 1,7 y 1,0 % p/v, respectivamente.

P0: leche sin adición de PSM, P1, P2 y P3: leche adicionadas de PSM en un nivel de 0,75, 1,5 y 2,25 % p/v, respectivamente.

<sup>a,b,c,d</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Se observó la misma tendencia en el pH que con la incorporación de LPD; este parámetro disminuyó con el agregado del polvo lácteo por el aumento de los sólidos totales de la mezcla; la disminución fue entre 0,15 a 0,27 unidades. Los niveles de proteína, lactosa y sólidos totales aumentaron por el agregado del polvo, aunque los niveles de proteína y lactosa fueron inferiores

a los alcanzados con LPD. Si bien el polvo adicionado de PSM (~52 % p/p de proteína y ~42 % p/p de lactosa) contiene un mayor nivel proteico y menor nivel de lactosa que la LPD (~34 % p/p de proteína y ~54 % p/p de lactosa), el mayor nivel adicionado en esta experiencia (2,25 % p/v) fue mucho menor que el mayor nivel de LPD (7,7 % p/v). No se observaron grandes cambios en el nivel de materia grasa por la incorporación de PSM dentro de cada experiencia a un dado nivel de MG, aunque las diferencias fueron significativas con respecto al control.

#### 4.5.2. Propiedades de coagulación

En el ANOVA de dos vías (Tabla 22), se observó que el tiempo de coagulación se vio afectado por la dosis de coagulante y el NP en cada uno de los niveles de materia grasa; se observó una disminución significativa en el tiempo de coagulación con el incremento del nivel de PSM adicionado y la dosis de coagulante. La dosis de coagulante y el NP también afectaron significativamente el tiempo de corte en MG1, conduciendo a una disminución de este parámetro a mayor nivel de los factores. En la experiencia con MG2 y MG3, hubo una interacción significativa de los dos factores estudiados para el tiempo de corte, destacándose en MG2 un menor valor en la muestra P3-D2 y en MG3 un mayor valor en la muestra P1-D1. La firmeza de la cuajada en los niveles MG1 y MG2 sólo se vio afectada significativamente por la dosis de coagulante: a mayor dosis, mayor firmeza. En MG3 la interacción resultó significativa para la firmeza de la cuajada, diferenciándose (al igual que para el tiempo de corte), la muestra P1-D1 por una menor firmeza que el resto.

Analizando visualmente las Figuras 41 (A, B y C), se puede ver que las propiedades de coagulación fueron en general negativamente afectadas por la disminución del contenido de MG de la leche y afectadas positivamente por la incorporación de PSM. Las diferencias del tiempo de coagulación entre los distintos niveles de MG para cada nivel de adición de PSM y dosis de coagulante fueron bajas, mientras que una variación mayor se presentó en el tiempo de corte y firmeza (Figuras 41 B y C). Se observó un mayor tiempo de corte y menor firmeza para el menor nivel de MG (MG3), principalmente para las muestras con el menor nivel de adición de PSM y menor dosis de coagulante. En todas las situaciones, el uso de una dosis de coagulante por volumen fue suficiente para un buen manejo de la cuajada adicionada de PSM.

Por otro lado, la mayoría de las muestras resultaron diferentes en comparación con cada control, presentando menores tiempos de coagulación y corte y mayor firmeza que los controles correspondientes (Figura 41D, E y F). El incremento del nivel de PSM condujo a una disminución del tiempo de coagulación y de corte, y un aumento de la firmeza con respecto a cada leche control, lo que fue más marcado, en general, para la mayor dosis de coagulante (D2). La incorporación de PSM en los niveles P2 y P3 en las leches con el menor nivel de MG (MG3, verde) permitió obtener tiempos de corte similares a los que se obtienen con las leches control

(P0) con contenido alto (MG1, celeste) e intermedio (MG2, rojo) de MG (Figura 41B). Estos resultados indican que el protocolo de elaboración de quesos reducidos en MG puede asemejarse al de quesos con contenido normal de MG, mediante la incorporación de PSM a niveles mayores a 1,5%. Asimismo, cuando se usó un nivel bajo de PSM (P1) en leche con bajo contenido de MG (MG3 verde), el uso de una dosis mayor de coagulante (D2) permitió asemejar el tiempo de corte y firmeza al de la leche control con contenido normal de MG.

**Tabla 22.** Tiempo de coagulación, tiempo de corte y firmeza de la cuajada para leche con distintos niveles de adición de PSM y dosis de coagulante, en la experiencia con distintos niveles de MG. Significancia (p) del ANOVA de dos vías de los factores estudiados: F1 - nivel proteico (NP) y F2- dosis de coagulante.

		<b>Tiempo de coagulación (min)</b>	<b>Tiempo de corte (min)</b>	<b>Firmeza (Volt)</b>
MG1	P1-D1	17,8±0,4 <sup>A,a</sup>	35,1±1,3 <sup>A,a</sup>	10,2±0,5 <sup>B</sup>
	P1-D2	14,9±0,5 <sup>B,a</sup>	31,7±0,8 <sup>B,a</sup>	11,1±0,3 <sup>A</sup>
	P2-D1	17,2±0,1 <sup>A,a,b</sup>	35,0±0,4 <sup>A,a,b</sup>	10,3±0,2 <sup>B</sup>
	P2-D2	14,0±0,8 <sup>B,a,b</sup>	31,4±1,7 <sup>B,a,b</sup>	11,0±0,5 <sup>A</sup>
	P3-D1	16,2±0,5 <sup>A,b</sup>	33,4±0,9 <sup>A,b</sup>	10,8±0,6 <sup>B</sup>
	P3-D2	13,0±0,4 <sup>B,b</sup>	30,3±0,8 <sup>B,b</sup>	11,2±0,2 <sup>A</sup>
Significancia	F1 NP	*	*	NS
	F2 Dosis	*	*	*
	F1*F2	NS	NS	NS
MG2	P1-D1	17,9±0,6 <sup>A,a</sup>	36,4±0,7 <sup>C,D</sup>	9,7±0,2 <sup>B</sup>
	P1-D2	15,0±0,6 <sup>B,a</sup>	33,1±1,5 <sup>D</sup>	10,5±0,4 <sup>A</sup>
	P2-D1	16,5±0,6 <sup>A,a,b</sup>	33,7±1,4 <sup>C,D,E</sup>	10,6±0,9 <sup>B</sup>
	P2-D2	15,0±0,6 <sup>B,a,b</sup>	34,7±1,7 <sup>C,D,E</sup>	10,2±0,5 <sup>A</sup>
	P3-D1	16,1±0,6 <sup>A,b</sup>	37,2±1,8 <sup>C</sup>	9,5±0,4 <sup>B</sup>
	P3-D2	13,4±0,3 <sup>B,b</sup>	32,5±0,7 <sup>E</sup>	10,6±0,2 <sup>A</sup>
Significancia	F1 NP	*	NS	NS
	F2 Dosis	*	*	*
	F1*F2	NS	*	NS
MG3	P1-D1	18,7±0,7 <sup>A,a</sup>	43,5±2,0 <sup>C</sup>	8,1±0,4 <sup>D</sup>
	P1-D2	15,9±0,6 <sup>B,a</sup>	37,4±0,4 <sup>D</sup>	9,4±0,1 <sup>C</sup>
	P2-D1	17,1±0,8 <sup>A,b</sup>	37,3±1,6 <sup>D</sup>	9,5±0,4 <sup>C</sup>
	P2-D2	15,2±0,3 <sup>B,b</sup>	38,5±2,6 <sup>D</sup>	9,2±0,5 <sup>C</sup>
	P3-D1	16,8±0,5 <sup>A,b</sup>	38,7±0,6 <sup>D</sup>	9,1±0,3 <sup>C</sup>
	P3-D2	14,8±0,6 <sup>B,b</sup>	36,2±1,0 <sup>D</sup>	9,6±0,2 <sup>C</sup>
Significancia	F1 NP	*	*	*
	F2 Dosis	*	*	*
	F1*F2	NS	*	*

NS: No significativo; \* p < 0,05

Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

Nivel proteico: P1: 3,7 % p/v, P2: 4,0 % p/v y P3: 4,4 % p/v. Dosis de coagulante: D1- 0,405 µL/mL leche (dosis por volumen de leche); D2- 0,506 µL/mL leche (1,25 de D1). Materia grasa: MG1: 3,4 % p/v; MG2: 1,7 % p/v y MG3: 1,0 % p/v.

<sup>a,b</sup> Los valores de cada columna (para cada nivel de MG) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) para F1.

<sup>A,B</sup> Los valores de cada columna (para cada nivel de MG) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) para F2.

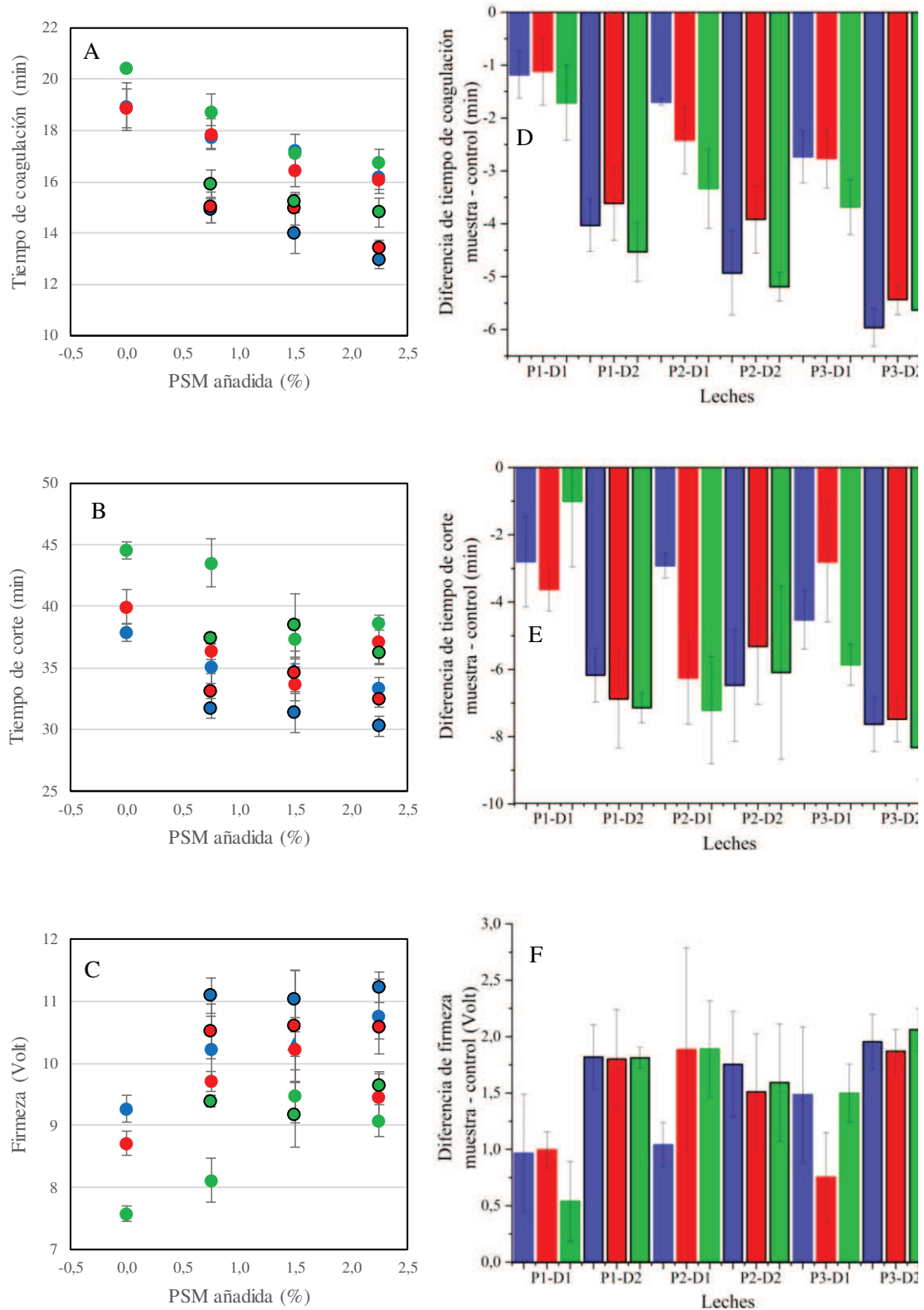
<sup>C,D,E</sup> Los valores de cada columna (para cada nivel de MG) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) cuando F1 x F2 es significativo.

En esta experiencia, a diferencia de lo observado en las anteriores, el Tc fue más bajo en relación al control respectivo en todas las condiciones evaluadas (Figura 41D); esto podría estar relacionado a que el polvo adicionado solamente incorpora proteínas de suero y no caseínas. De este modo, aún cuando se usa la dosis por volumen, se mantiene la relación coagulante:caseína y por ello, ninguna situación aumentó el Tc.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Sturaro et al. (2014), quienes informaron que a medida que aumentaba el nivel de PSM adicionado, aumentaba también el tiempo de coagulación y corte (medido con Formagraph). Por su parte, Ismail et al. (2011) demostraron que la adición de proteína de suero mediante ricota a la leche de búfala acortó el tiempo de coagulación y lo atribuyeron al contenido de acidez de las proteínas incorporadas que disminuyeron el pH de la leche. Guinee et al. (1997) estudiaron el efecto de la incorporación de Dairy-Lo® (producto comercial de proteínas de suero) a la leche (1 % p/p) tratada térmicamente e informaron que el mismo perjudicó notablemente las propiedades de coagulación. Estos autores también informaron que el aumento del contenido de grasa en el rango de 0,1–10 %, p/p, al mantener constante el nivel de proteína (3,3 % p/p) mejoró las propiedades de coagulación (menor tiempo de coagulación y tiempo de corte y mayor firmeza de la cuajada). Sin embargo, los efectos positivos son mucho menores que los obtenidos al aumentar el contenido de proteína en el mismo rango. El efecto observado por el aumento del nivel de materia grasa en la leche, manteniendo constante el nivel de proteína, probablemente se deba al aumento concomitante de la viscosidad (Fox et al., 2017).

Las discrepancias entre los estudios pueden reflejar diferencias en las características de las PSM utilizadas (dispersión y conformación de agregados, composición), nivel y condiciones de adición, como también el impacto que tiene su incorporación al pH de la leche, parámetros que influyen directamente en las propiedades de coagulación.





**Figura 41.** Tiempo de coagulación (A), tiempo de corte (B) y firmeza de la cuajada (C) y sus diferencias con el control (D, E y F) en función del nivel de PSM añadidas (0,75 (P1); 1,5 (P2) y 2,25 (P3) % p/v), dosis de coagulante (D1: sin contorno, D2: contorno), y nivel de MG (Azul: MG1; Rojo: MG2; Verde: MG3). Se informa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

### 4.5.3. Rendimiento quesero y composición del suero

En el ANOVA de dos vías (Tabla 23) se observó que el nivel de proteínas afectó significativamente los rendimientos calculados en cada nivel de MG: en general, los niveles fueron mayores a mayor nivel de adición de PSM. Por otro lado, la dosis de coagulante sólo fue significativa para MG2 y MG3, para los cuales se observaron mayores y menores valores para D2, respectivamente; sin embargo las diferencias numéricas fueron muy bajas.

**Tabla 23.** Rendimiento y rendimiento ajustado para las leches con distintos niveles de adición de PSM y dosis de coagulante, en la experiencia con distinto nivel de MG. Significancia del ANOVA de dos vías de los factores estudiados: F1- nivel proteico (NP) y F2- dosis de coagulante.

		Rendimiento (%)	Rendimiento ajustado (%)
MG1	P1-D1	17,3±0,2 <sup>c</sup>	17,1±0,2 <sup>a,b</sup>
	P1-D2	17,4±0,1 <sup>c</sup>	17,1±0,1 <sup>a,b</sup>
	P2-D1	18,5±0,1 <sup>b</sup>	17,4±0,1 <sup>a</sup>
	P2-D2	18,5±0,2 <sup>b</sup>	17,3±0,2 <sup>a</sup>
	P3-D1	19,3±0,1 <sup>a</sup>	17,1±0,1 <sup>b</sup>
	P3-D2	19,3±0,1 <sup>a</sup>	17,1±0,1 <sup>b</sup>
Significancia	F1 NP	*	*
	F2 Dosis	NS	NS
	F1*F2	NS	NS
MG2	P1-D1	13,0±0,0 <sup>B,c</sup>	12,2±0,1 <sup>B,b</sup>
	P1-D2	13,3±0,1 <sup>A,c</sup>	12,4±0,1 <sup>A,b</sup>
	P2-D1	13,9±0,1 <sup>B,b</sup>	12,4±0,1 <sup>B,a</sup>
	P2-D2	14,3±0,1 <sup>A,b</sup>	12,7±0,1 <sup>A,a</sup>
	P3-D1	14,8±0,1 <sup>B,a</sup>	12,3±0,1 <sup>B,a,b</sup>
	P3-D2	15,3±0,2 <sup>A,a</sup>	12,7±0,2 <sup>A,a,b</sup>
Significancia	F1 NP	*	*
	F2 Dosis	*	*
	F1*F2	NS	NS
MG3	P1-D1	11,8±0,1 <sup>A,c</sup>	11,0±0,1 <sup>C,D</sup>
	P1-D2	11,7±0,2 <sup>B,c</sup>	11,0±0,2 <sup>C,D</sup>
	P2-D1	13,0±0,1 <sup>A,b</sup>	11,1±0,1 <sup>C,D</sup>
	P2-D2	12,5±0,2 <sup>B,b</sup>	10,6±0,2 <sup>E</sup>
	P3-D1	14,1±0,1 <sup>A,a</sup>	11,2±0,1 <sup>C</sup>
	P3-D2	13,6±0,2 <sup>B,a</sup>	10,8±0,2 <sup>D,E</sup>
Significancia	F1 NP	*	*
	F2 Dosis	*	*
	F1*F2	NS	*

NS: No significativo; \* p < 0,05

Se informa el promedio±desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

Nivel proteico: P1: 3,7 % p/v, P2: 4,0 % p/v y P3: 4,4 % p/v. Dosis de coagulante: D1- 0,405 µL/mL leche (dosis por volumen de leche); D2- 0,506 µL/mL leche (1,25 de D1). Materia grasa: MG1: 3,4 % p/v; MG2: 1,7 % p/v y MG3: 1,0 % p/v.

<sup>a,b,c</sup> Los valores de cada columna (para cada nivel de MG) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) para F1.

<sup>A,B</sup> Los valores de cada columna (para cada nivel de MG) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) para F2.

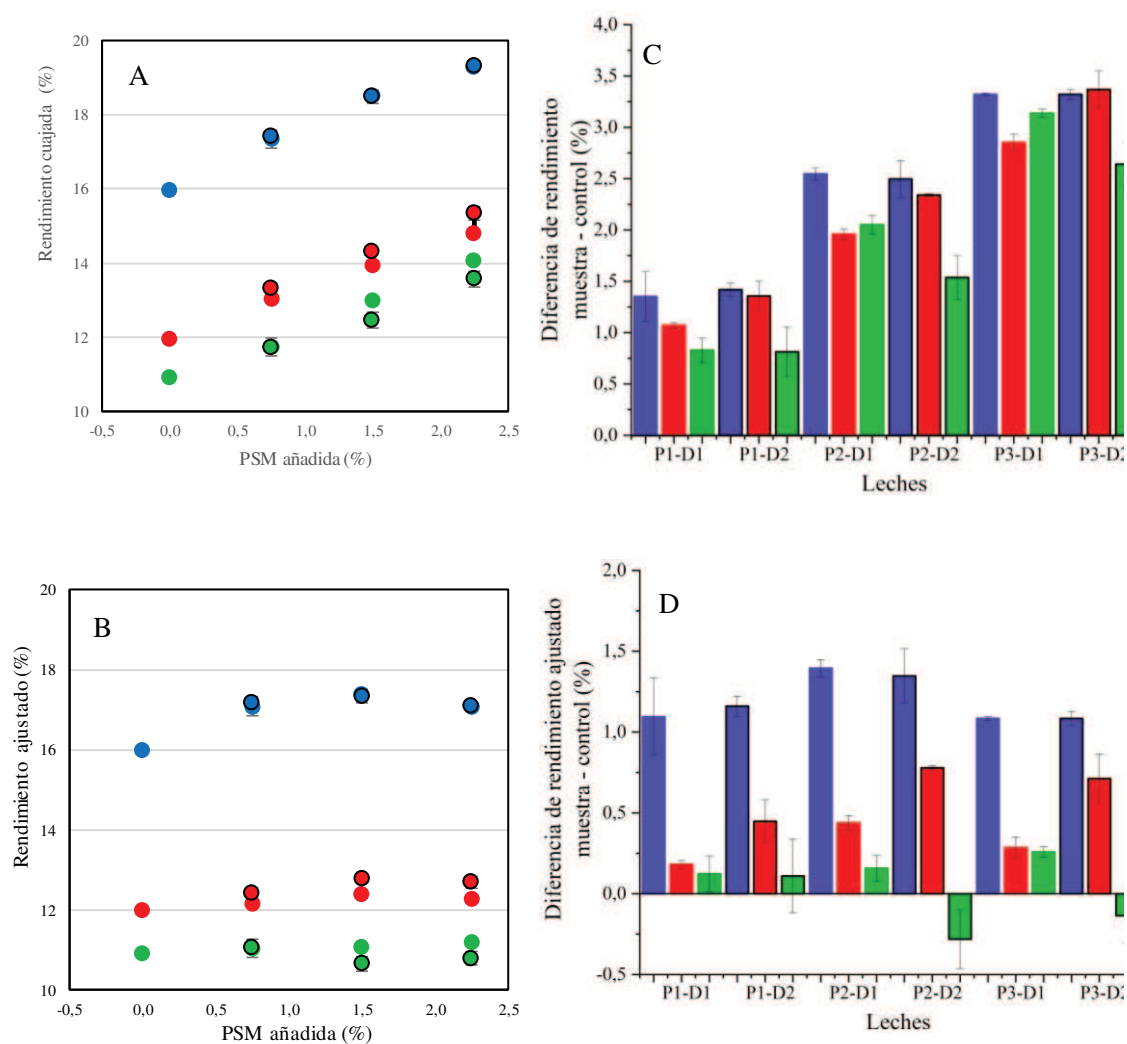
<sup>C,D,E</sup> Los valores de cada columna (para cada nivel de MG) con diferente superíndice difieren significativamente (p < 0,05) cuando F1 x F2 es significativo.

Las tendencias encontradas para el rendimiento quesero y el rendimiento ajustado se pueden ver en la Figura 42 A y B, respectivamente. Se observaron mayores valores de rendimiento para las muestras con el mayor nivel de MG (MG1, azul), mientras que los valores fueron menores pero más similares entre sí para MG2 (rojo) y MG3 (verde). Por otro lado, al igual que lo observado en la experiencia con leche UF y con agregado de LPD, el rendimiento de la cuajada se incrementó proporcionalmente al nivel de proteínas de la leche de partida para cada uno de los niveles de MG evaluados (MG1:  $R^2= 0,9835$ ; MG2:  $R^2 = 0,9643$ ; MG3:  $R^2 = 0,9616$ ) (Figura 42A), mientras que el rendimiento ajustado (Figura 42B) estuvo en un rango acotado de valores entre las distintas concentraciones de proteínas para cada uno de los niveles de materia grasa, observándose un leve aumento en general con el incremento de PSM adicionadas. A diferencia de la experiencia con leche UF y adicionada de LPD, donde se incrementaron las caseínas y las proteínas de suero en la misma proporción, en este caso el incremento de proteínas fue solamente por el aporte de proteínas de suero. El alto tratamiento térmico aplicado en la obtención de las PSM da como resultado la desnaturalización de las proteínas de suero que, aunque no coagulan como las caseínas, permanecen con las micelas de caseína después de la hidrólisis por parte de la enzima coagulante, en una mayor proporción que las proteínas de suero provenientes de la leche cruda (Ipsen, 2017). Al quedar atrapadas, aumenta la concentración proteica y por ende el rendimiento, además de impedir la sinéresis de la cuajada como resultado de los efectos combinados de una mayor retención de agua por parte de las proteínas del suero *per se* y la impedancia a la contracción de la red de caseína hidrolizada por parte de la PSM ocluidas.

Sturaro et al. (2015) observaron, al igual que en nuestra experiencia, una disminución en el rendimiento quesero cuando se disminuyeron las relaciones materia grasa/proteína (1,25, 1,11 y 1,0) en quesos tipo Cacciota. Sin embargo, en contraste con nuestros resultados, la adición de PSM (3 y 4 %) no influyó en el rendimiento en los quesos con contenido alto y normal de materia grasa, aunque sí observaron un mayor rendimiento en los quesos bajos en grasa con 4% PSM en comparación con el de 3% de PSM.

En comparación con los controles respectivos, el rendimiento fue entre 0,8 y 3,3% mayor en los distintos tratamientos, presentándose las mayores diferencias para los mayores niveles de PSM añadidas. El rendimiento ajustado fue similar al control en MG3 (con diferencias <0,25 %), mientras que en MG1 el rendimiento ajustado se incrementó (~ 1%) en relación al control respectivo debido a la adición de PSM. En el nivel intermedio de MG, el rendimiento ajustado fue mayor que el control aunque las diferencias fueron menores a 0,75%; las mayores diferencias fueron para la mayor dosis de coagulante. De esta forma, la incorporación de PSM permitió incrementar el rendimiento tanto en leches con contenido normal o reducido en materia grasa generando una mejora en su perfil nutricional debido a la incorporación de las proteínas de suero.

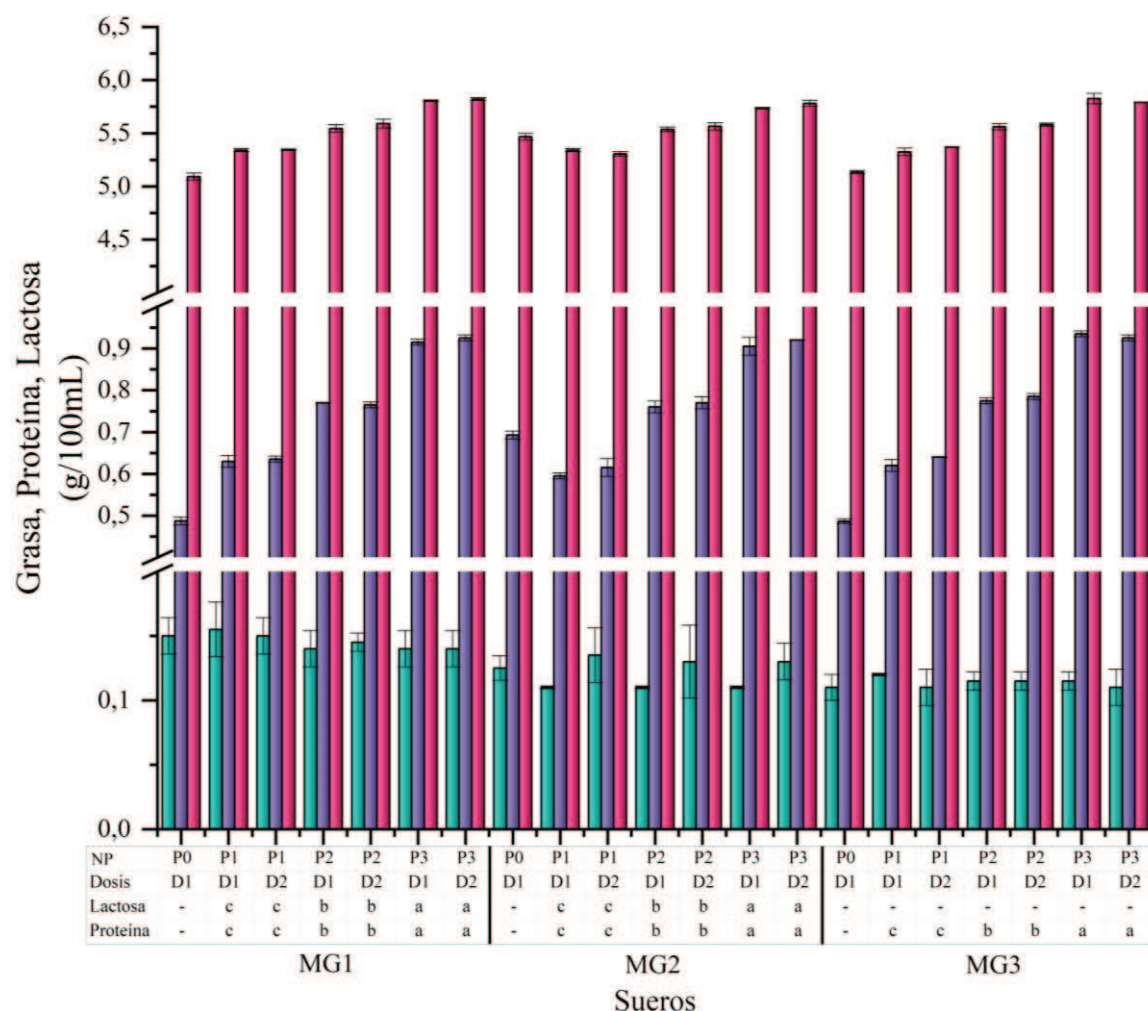
Si se comparan los controles con diferente nivel de MG, se puede observar que el rendimiento disminuyó a menores niveles de materia grasa, lo que coincide con lo informado por otros investigadores (Di Cagno et al., 2014; Sahan et al., 2008).



**Figura 42.** Rendimiento (A) y rendimiento ajustado (B) y sus diferencias con el control (C-D) en función del nivel de PSM añadidas (0,75 (P1); 1,5 (P2) y 2,25 (P3) % p/v), dosis de coagulante (D1: sin contorno, D2: contorno, y nivel de MG (Azul: MG1; Rojo: MG2; Verde: MG3). Se informa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

La composición del suero correspondiente a cada leche estudiada se puede observar en la Figura 43. Según el ANOVA de dos vías realizado, la concentración de grasa en los sueros fue similar a cada nivel de MG, mientras que la concentración proteica se vio influenciada por la adición de PSM, encontrando concentraciones más elevadas con el incremento del polvo adicionado. La lactosa tuvo un comportamiento similar a la proteína, siendo significativas las diferencias para MG1 y MG2. Al igual que lo mencionado para la experiencia anterior, el incremento de los niveles de proteína y lactosa en el suero a mayores niveles de adición de las PSM consecuencia del mayor aporte de estos compuestos por el polvo. Si bien las PSM,

debido al tratamiento de microparticulación, son retenidas en la cuajada en mayor proporción que las proteínas nativas (Banks et al., 1994; Sturaro et al., 2015), el mayor nivel de proteínas en el suero a mayor nivel de adición de las PSM indica que la retención de las mismas no fue total. Sturaro et al. (2014) encontraron que, en el suero, las fracciones de proteínas como  $\beta$ -lactoglobulina A y B y  $\alpha$ -lactoalbúmina tendieron a disminuir con el aumento de las concentraciones de PSM adicionadas en la leche, sin observar una significancia estadística. La eficiencia de recuperación de las PSM depende del grado de desnaturalización de las proteínas de suero en el proceso de obtención del polvo, por este motivo pueden encontrarse resultados diferentes en los niveles proteicos en los sueros de nuestras experiencias con la de otros autores.



**Figura 43.** Contenido de ■,grasa, ■, proteína y ■,lactosa de los sueros obtenidos en la experiencia de rendimiento quesero con leche adicionada de PSM y leche control. En la tabla inferior se muestran los grupos de medias homogéneas según el test de Tukey. <sup>a,b,c</sup> Resultados con diferente letra (para cada experiencia) para un mismo compuesto difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Los valores (g/100mL de suero) se presentan como el promedio $\pm$ desviación estándar de tres réplicas de la experiencia.

## 5. Conclusiones

En el presente capítulo se pudo comprobar la influencia significativa de distintos parámetros: el nivel de proteínas, la dosis de coagulante, el calcio añadido y el nivel de materia grasa de la leche, y sus interacciones en las propiedades de coagulación de la leche. El aumento del nivel proteico de la leche por ultrafiltración o por agregado de polvos lácteos condujo en casi todos los casos a un menor tiempo de corte y mayor firmeza, mientras que el impacto en el tiempo de coagulación fue diferente según la dosis de coagulante y la adición o no de calcio.

La mejora de las propiedades de coagulación por enriquecimiento proteico sugiere que el agregado de calcio podría evitarse en las elaboraciones de queso. Aún cuando su uso impacta en la coagulación en todos los casos, esta etapa puede no ser necesaria cuando hay aumento de los sólidos proteicos. Por otro lado, de acuerdo con nuestros resultados, resulta evidente que la elaboración de quesos con leche concentrada requerirá una adaptación de la dosis de coagulante para obtener parámetros de coagulación similares a los de elaboraciones tradicionales y lograr que el trabajo de la cuajada en la tina sea comparable. En efecto, el uso de una dosis de coagulante mayor a la estandarizada por volumen conduce a una mayor velocidad de coagulación y altos valores de firmeza, lo que apareja cambios en los protocolos de elaboración y puede conducir a dificultades en el trabajo en tina o en la composición del producto final. De esta manera, podemos afirmar que si se elaboran quesos con leche enriquecida en proteína, se podría disminuir los costos asociados a coagulante y calcio sin alterar las características de una elaboración tradicional. Asimismo, el uso de leches enriquecidas, incrementa el rendimiento, lo que permitiría aumentar la capacidad operativa de la planta.

La principal función del coagulante es tecnológica, y consiste en desestabilizar la suspensión proteica y lograr la coagulación de la leche y formación de la cuajada. En este capítulo hemos proporcionado información novedosa sobre su dosificación y actividad real en matrices de leche enriquecida mediante los métodos más comunes usados en la industria. La aplicación de una metodología óptica simple y de pequeña escala nos permitió arribar a resultados útiles para adaptar los protocolos de elaboración quesera y seleccionar las mejores condiciones para obtener quesos con leche UF o con agregado de polvos lácteos, con características similares a los quesos tradicionales de leche sin concentrar. Sin embargo, no se debe pasar por alto que el coagulante cumple también un rol bioquímico durante la maduración, y por este motivo son necesarios estudios que cubran esta etapa de la tecnología quesera como se abordará en el capítulo siguiente.

---

Influencia del nivel proteico de la leche de quesería en la  
elaboración y la maduración de queso Cremoso

## 1. Introducción

El enriquecimiento de la leche destinada a quesería ya sea para aumentar los sólidos lácteos totales, o específicamente las proteínas, es una estrategia que se ha desarrollado fuertemente desde las últimas décadas del siglo XX, con diversos propósitos (Acharya & Mistry, 2004; Guinee et al., 1997; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2003a,b). El uso de tecnologías de membrana, como UF y MF, y el agregado de polvos, retentados o concentrados como leche en polvo descremada, leche condensada, concentrado de proteína de leche u otros, se ha propuesto para estandarizar la composición de la materia prima a lo largo del año (Francolino et al., 2010; Chen et al., 2019), aumentar el rendimiento quesero y con ello la capacidad operativa de la planta (Rattray & Jelen, 1996), o directamente para desarrollar nuevas variedades de queso o versiones nuevas de variedades conocidas (Mortensen, 1985). Asimismo, las fluctuaciones de precios en el mercado internacional de los polvos lácteos pueden motivar su inclusión en la línea de elaboración quesera para valorizarlos.

El agregado de ingredientes lácteos para enriquecer la leche de elaboración es una alternativa sencilla, que se encuentra al alcance de las queserías pequeñas y medianas (Pellegrino et al., 2010). Por el contrario, los procesos de membrana como la UF y MF se han adoptado principalmente en grandes industrias, donde a menudo se han incorporado a procesos continuos o semicontinuos, con grandes volúmenes de producción (Mistry & Maubois, 2017; Tamime et al., 2006).

Cualquiera sea el método elegido para aumentar el tenor proteico de la leche, es importante considerar que estas prácticas modifican la aptitud tecnológica de la leche de quesería. Por ejemplo, es bien conocido que el nivel de proteína afecta las propiedades de coagulación (Guinee et al., 1997), lo que debe tenerse en cuenta para ajustar el protocolo de elaboración del queso. Además, el agregado de polvos lácteos y el enriquecimiento en caseínas o proteínas totales mediante tecnologías de membrana afecta la concentración de otros compuestos. En efecto, además de la materia grasa y proteínas, cambia el contenido de los azúcares disponibles, lo que a su vez puede tener un impacto en la actividad del starter o de las NSLAB (Cunha et al., 2006; Neocleous et al., 2002; Oh et al., 2014). La presencia de cantidades significativas de proteínas de suero en la cuajada, por otro lado, se ha señalado como el origen de cambios, algunas veces negativos, en el desarrollo de textura y flavour del queso (Creamer et al., 1987; Masotti et al., 2017). Por otro lado, no es fácil establecer la dosis adecuada de coagulante a utilizar en quesos elaborados con leche concentrada, sobre todo teniendo en cuenta que esta enzima participa tanto en la coagulación como en la maduración (Cunha et al., 2006; Govindasamy-Lucey et al., 2011; Guinee et al., 2006; Ozturk et al., 2015). En este sentido, se debe determinar la dosis correcta que facilite el manejo en tina de la cuajada de leche concentrada, pero que también permita un nivel suficiente de actividad residual para que la proteólisis se desarrolle adecuadamente. El uso de



dosis incorrectas puede conducir a un retardo de la proteólisis con consecuencias en la textura y sabor (Agrawal & Hassan, 2007; Neocleous et al., 2002). De esta manera, el uso de leches concentradas puede tener un impacto negativo al introducir cambios tanto en la cantidad de sustratos fermentables disponibles para la microbiota del queso, en la cantidad de proteínas de suero incluidas en la cuajada, como en la evolución de la proteólisis. Esto podría derivar en cambios indeseables en los perfiles de maduración como el desarrollo de defectos de textura, o sabor, y de fermentaciones indeseables, entre otros.

Una revisión de la literatura existente sobre elaboración y maduración de quesos de leche enriquecida en proteínas da cuenta de investigaciones en quesos Cheddar, Mozzarella, Gouda, Cottage, entre otros.

En nuestro Instituto, existen algunos antecedentes en queso Cremoso: enriquecimiento proteico por agregado de ricota a la leche de elaboración (Hynes et al., 1998) y mediante la aplicación de tratamientos térmicos de alta temperatura con desnaturalización de las proteínas de suero (Meinardi et al., 2004). Un proyecto destinado a la mejora de la calidad de quesos Cremoso reducidos en grasa contempló la adición de un producto comercial de proteínas de suero microparticuladas (Zalazar et al., 1999; 2002). En otro estudio se ha utilizado un queso fresco elaborado con leche UF al 40% de sólidos como matriz para evaluar la viabilidad de distintos probióticos (Vinderola et al., 2000).

El interés del tema y su gran potencial para aplicarse en quesos blandos argentinos como el Cremoso, el Port Salut y otros, demanda una aproximación novedosa, que contemple aspectos contemporáneos como la definición correcta de la dosis de coagulante. Asimismo, es necesario profundizar el estudio de su impacto en los perfiles de proteólisis, la composición de hidratos de carbono fermentables inicial y a lo largo de la maduración, y la influencia en los perfiles sensoriales y propiedades físicas.

## **2. Objetivo**

- Determinar el impacto del uso de leche concentrada por UF y agregado de polvos lácteos en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso a escala laboratorio.

## **3. Materiales y Métodos**

### **3.1. Influencia del uso de leche ultrafiltrada en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso**

#### **3.1.1. Preparación de la leche de quesería**

La leche cruda obtenida de una industria láctea cercana (Milkaut, Franck, Santa Fe) se microfiltró a través del filtro bolsa de 1  $\mu\text{m}$  de poro. Luego se separó un volumen para la

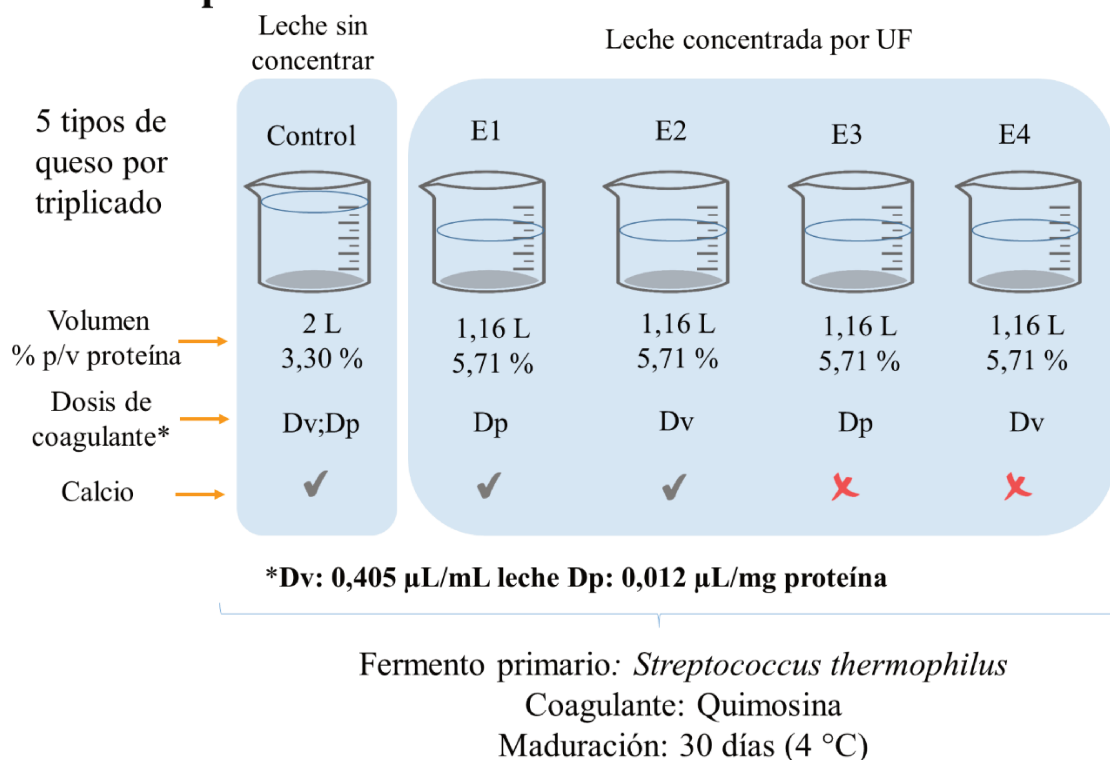
elaboración de quesos control, mientras que la leche destinada a la elaboración de los quesos experimentales se concentró mediante el equipo de membrana escala piloto descrito en el capítulo 3 sección 3.1.2. hasta un nivel de proteínas de 5,7 % p/v aproximadamente. La relación materia grasa:proteína de la leche, tanto control como UF, fue de ~1,1.

### **3.1.2. Diseño experimental y elaboración de quesos Cremoso miniatura a partir de leche UF**

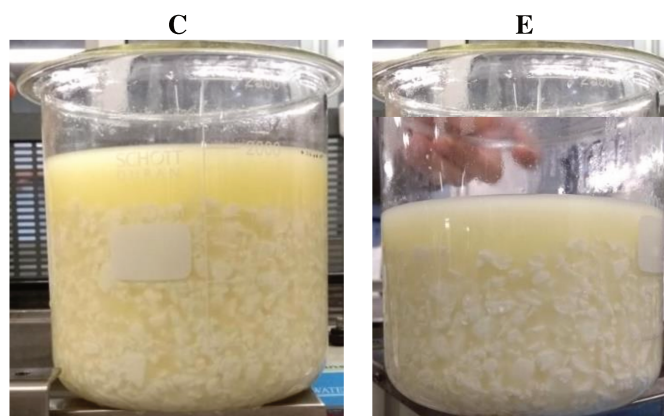
En la Figura 44 se presenta el diseño experimental llevado a cabo en esta experiencia. Se elaboraron los siguientes quesos: un control (C) con leche sin concentrar (2 L, 3,30 % p/v de proteínas), y cuatro experimentales (E) con leche UF (1,16 L, 5,71 % p/v de proteínas). Para las tinas experimentales se empleó un volumen tal (1,16 L) que iguale la cantidad de proteína total contenida en la tina del control (2L), como proponen Ong et al. (2013). En la Figura 45 se pueden observar dos tinas de elaboración (control y experimental) con distinto volumen de cuajada y suero. En los quesos experimentales se evaluaron diferentes dosis de coagulante: Dp- 0,012  $\mu\text{L}/\text{mg}$  proteína (dosis estandarizada por proteína), Dv- 0,405  $\mu\text{L}/\text{mL}$  leche (dosis estandarizada por volumen) y dos niveles de calcio: adición o no; los quesos se rotularon como E1 y E2 aquellos con adición de calcio, y con la dosis Dp y Dv, respectivamente, y como E3 y E4, aquellos sin calcio y con la dosis Dp y Dv, respectivamente. Los quesos control fueron elaborados de manera tradicional, con la dosis normal de coagulante, que en este caso es igual a Dv y Dp, y con la adición de calcio.

La leche control y ultrafiltrada se pasteurizó a 63 °C durante 30 min, luego se enfrió a 37 °C, y se colocó en las tinas correspondientes. Las elaboraciones se realizaron de acuerdo con lo descrito en la sección 3.1.3 del capítulo 2, con algunas modificaciones. El fermento iniciador de *S. thermophilus* (Chr. Hansen, Quilmes, Argentina) fue inoculado en un nivel estandarizado por proteína, como ha sido sugerido en trabajos previos (Govindasamy-Lucey et al., 2011); para ello, un mismo volumen (1 mL) de una suspensión del fermento ( $3,4 \times 10^9$  UFC/mL) fue agregado a cada tina. El corte de la cuajada fue realizado cuando alcanzó el mismo nivel de firmeza en cada tina; para ello, se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo anterior que se verificaron el día de la elaboración mediante el análisis de los parámetros de coagulación de las leches en el Optigraph. A los 5 días de la elaboración los quesos fueron envasados al vacío y madurados durante 30 días a 4 °C. Las elaboraciones se realizaron por triplicado.

## Diseño Experimental



**Figura 44.** Diseño experimental de las elaboraciones de quesos Cremoso miniatura a partir de leche UF y leche sin concentrar.



**Figura 45.** Tinas de elaboración de queso control (C, 2 L de leche) y experimental (E, 1,16 L).

### 3.2. Influencia del agregado de LPD en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso

#### 3.2.1. Preparación de la leche de quesería

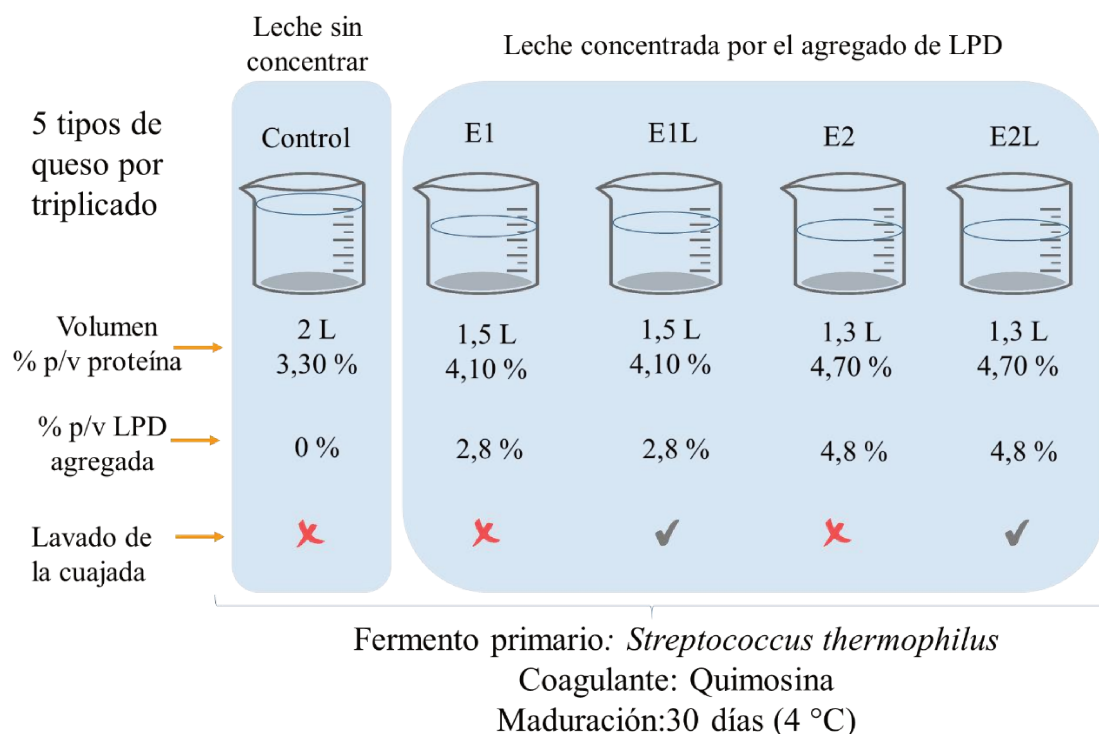
La leche cruda (relación materia grasa:proteína 1,1) se obtuvo de una industria láctea cercana (Milkaut, Franck, Santa Fe). Un volumen de leche se separó para la elaboración de los quesos control, mientras que la leche para los quesos experimentales fue enriquecida con LPD de bajo tratamiento térmico (La Serenísima, Buenos Aires) a dos niveles: 2,8 y 4,8 % p/v. La leche

enriquecida fue refrigerada en la heladera a 4 °C durante 18 horas antes de la elaboración, con el objetivo de que se hidraten los polvos agregados. La relación materia grasa:proteína fue estandarizada para todas las muestras; para ello, una cantidad adecuada de crema (~65 % de materia grasa) fue añadida a la leche con LPD antes de la pasteurización de manera de alcanzar el mismo tenor que en el control (1,1).

### 3.2.2. Diseño experimental y elaboración de quesos Cremoso miniatura a partir de leche adicionada de LPD

El diseño experimental se muestra en la Figura 46. Se elaboraron los siguientes quesos: un control con leche sin modificar y procedimiento estándar (C) (2 L, 3,30 % p/v de proteína), y cuatro experimentales (E) con leche adicionada de LPD a dos niveles (E1:1,5 L, 4,1 % p/v de proteína y E2: 1,3L, 4,7 % p/v de proteína), con la inclusión (E1L y E2L) o no (E1 y E2) de un lavado de la cuajada luego de la etapa de corte. El objetivo de la etapa de lavado fue disminuir la concentración de lactosa, que se incrementa por la adición del polvo. El volumen de cada tina experimental (1,5 L para E1 y E1L, y 1,3 L para E2 y E2L) se calculó para que la cantidad de proteínas sea la misma que en la tina de la leche control (2L).

## Diseño Experimental



**Figura 46.** Diseño experimental de las elaboraciones de quesos Cremoso miniatura a partir de leche adicionada o no de LPD.

En todos los casos, se pasteurizó a 63 °C durante 30 min y se enfrió inmediatamente cumplido ese tiempo. Las elaboraciones se llevaron adelante como se explicó en la sección anterior (3.1.2.),

con algunas modificaciones. El coagulante se dosificó por unidad de volumen y se agregó calcio a todas las tinas; al igual que en la experiencia de UF el starter fue adicionado por unidad de proteína. En los quesos E1L y E2L, luego de la etapa de lirado, se reemplazó un volumen de suero (equivalente al 20 % del volumen de leche inicial) por agua estéril a 37 °C. Las elaboraciones se realizaron por triplicado.

### 3.3. Influencia del agregado de PSM en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso

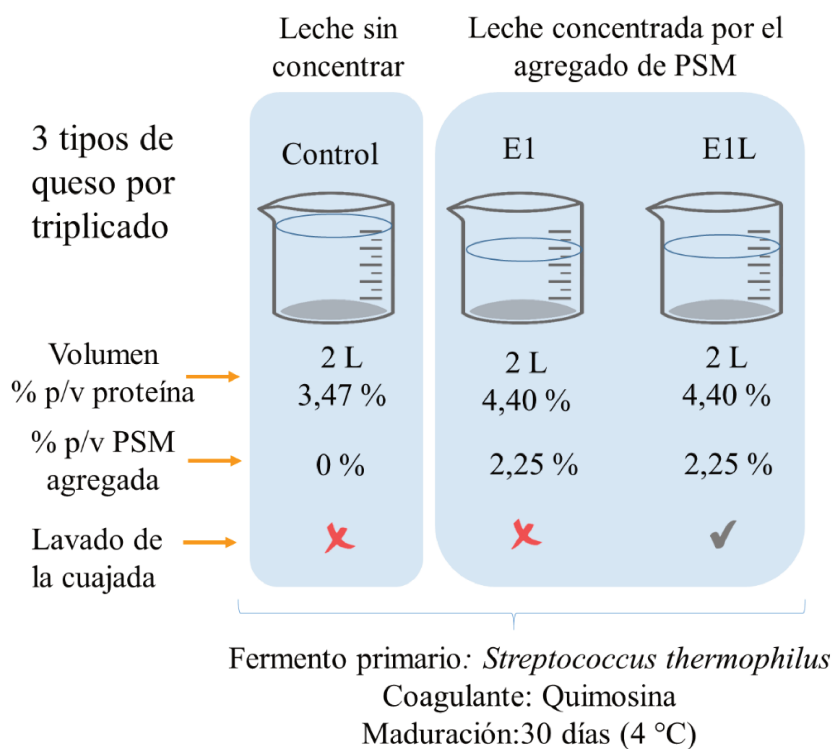
#### 3.3.1. Preparación de la leche de quesería

La leche cruda fue provista por una industria láctea cercana (Milkaut, Franck, Santa Fe). Un volumen se separó para la elaboración de los quesos control, mientras que la leche para los quesos experimentales fue adicionada con 2,25 % p/v de PSM- Nutrilac® CH-4560 (43-47 % p/p proteína; Arla Foods Ingredients S.A) y almacenada a 4 °C durante 18 h para permitir que la proteína se hidrate.

#### 3.3.2. Diseño experimental y elaboración de quesos Cremoso miniatura a partir de leche adicionada de PSM

El diseño experimental se puede observar en la Figura 47.

### Diseño Experimental



**Figura 47.** Diseño experimental de las elaboraciones de quesos Cremoso miniatura a partir de leche adicionada o no de PSM.

Se elaboraron tres tipos de queso: un queso control (C) con leche sin adición de PSM (2L, 3,47 % p/v de proteína) y dos experimentales empleando leche adicionada de PSM (2 L, 4,4 % p/v de proteína) con (EL) y sin (E) lavado de la cuajada. En este caso el volumen de las tinas experimentales fue el mismo que el de la leche control (2 L). La leche se pasteurizó durante 30 min a 63°C y se enfrió hasta la temperatura de coagulación. La elaboración se llevó adelante como se explicó en la sección anterior (3.2.2), en este caso también se incorporó la etapa de lavado de la cuajada (20 %) mediante sustitución del suero por agua en el queso EL, ya que el polvo adicionado aporta también lactosa. Las elaboraciones se realizaron por triplicado.

### **3.4. Determinaciones analíticas**

#### **3.4.1. Composición global, pH y rendimiento queso y composición de los sueros**

La composición global y el pH de los quesos se analizó al final de la maduración (30 d) mediante los métodos estándar descriptos en el Capítulo 1 (secciones 3.4.2. y 3.4.3.). La leche utilizada en cada elaboración y el suero obtenido fueron analizados mediante un equipo infrarrojo (FT120, Foss Electric, Dinamarca). A su vez, se midió el volumen de suero de cada tina de elaboración. El rendimiento queso se calculó determinando el peso de la cuajada después del salado y se expresó como la relación porcentual entre el peso total de la cuajada y el volumen de leche utilizado (Guinee et al., 2006). La recuperación de proteína y sólidos totales se cuantificó por la relación entre el peso (en gramos) de los componentes de la cuajada (proteína y sólidos totales, respectivamente) y el mismo componente de la leche de elaboración (en gramos) multiplicado por 100 (Pazzola et al., 2019). La recuperación de los componentes de la leche en la cuajada es un parámetro interesante que permite evaluar la eficiencia general de la elaboración de los quesos.

#### **3.4.2. Calcio**

El análisis de calcio se llevó adelante mediante Espectrometría de Absorción Atómica de Llama sólo para los quesos elaborados en la experiencia con leche UF.

#### **3.4.3. Recuentos microbiológicos**

En todos los quesos se determinó el nivel de las bacterias lácticas totales y las NSLAB al final de la maduración según lo descripto en el Capítulo 2, sección 3.3.2. En los quesos UF, también se determinaron los niveles de coliformes y hongos y levaduras a 30 días de maduración (como se mencionó en el Capítulo 2 sección 3.3.2) considerando que podría haber una contaminación mayor durante el proceso de filtración y preparación de la leche.

### 3.4.4. Perfiles de carbohidratos y ácidos orgánicos

Los niveles de carbohidratos (lactosa y galactosa) y ácidos orgánicos (ácido cítrico, láctico, pirúvico, orótico e hipúrico) se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como se describió en el Capítulo 1 sección 3.4.4.

### 3.4.5. Estudio de la proteólisis de los quesos

El estudio de la proteólisis primaria se llevó a cabo mediante la determinación de la fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 a los 30 días de maduración como se explicó en la sección 2.4.5. del Capítulo 1. Además, se analizó la fracción insoluble a pH 4,6 mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con agregado de urea. Esta técnica permite la separación de las caseínas intactas y de los grandes péptidos generados por la actividad proteolítica del coagulante y de la plasmina (Ardö, 1999).

La electroforesis se realizó en una cuba vertical Mini-Protean II (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos), con una fuente de poder modelo 1000/500 (BioRad Laboratories, California, Estados Unidos) utilizando un sistema de gel discontinuo (Andrews, 1983). Se empleó una concentración de acrilamida de 4 % para el gel de apilamiento, y de 7,5 % para el gel de separación. Los geles de apilamiento y de separación se prepararon a partir de una solución madre de acrilamida-bisacrilamida 30,8 %, a la que se le adicionó buffer Tris-HCl 0,5 M de pH 6,8 en el caso del primero, y buffer Tris-HCl de pH 8,8 y urea (concentración en el gel: 7,5 M), en el caso del segundo. Se utilizó una solución de persulfato de amonio al 10 % p/v, preparada inmediatamente antes de su uso, y de N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina (TEMED) como iniciador y catalizador, respectivamente, de la reacción de polimerización del gel de acrilamida-bisacrilamida. Para la preparación de las muestras y del patrón se disolvieron 10 mg de la fracción insoluble a pH 4,6 en 1 mL de buffer de muestra, compuesto por buffer Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, urea (concentración final en el buffer: 7,5 M),  $\beta$ -mercaptoetanol 0,5% v/v, y una punta de espátula de azul de bromofenol. Se sembraron 15  $\mu$ L de muestra; las corridas se realizaron en medio alcalino utilizando Tris-glicina pH 8,3 como buffer de corrida, bajo las siguientes condiciones: voltaje constante de 150 V, intensidad máxima de 45 mA y potencia de 6,75 W. La finalización de la corrida se determinó por la llegada del frente de avance hacia el final de la placa, lo que se evidenció por el colorante adicionado a la muestra. Los geles se colorearon con solución de Coomassie Blue R-250 al 0,2 % p/v en ácido acético, etanol y agua destilada (1,6:4:4) durante 1 h (Blakesley & Boezi, 1977), y luego se decoloraron mediante repetidos lavados con solución decolorante, compuesta por ácido acético, etanol y agua destilada (1:2,5:6,5).

En los quesos elaborados con leche UF y con adición de PSM, se analizaron los perfiles peptídicos mediante HPLC como se menciona en el Capítulo 2, sección 3.3.5.

### 3.4.6. Capacidad de fusión

La capacidad de fusión se determinó utilizando una modificación del test de Schreiber (Muthukumarappan et al., 1999). En este ensayo, se emplearon cilindros de queso de 28 mm de diámetro y 16 mm de altura obtenidos mediante un sacabocados. Cada muestra fue pesada y se descartaron aquellas que presentaron una variación de la masa mayor al 5 %. Los discos de queso se mantuvieron refrigerados a 4 °C hasta su análisis. Como superficie de ensayo se adoptó un vidrio de 15x15 cm y 3 mm de espesor, donde se colocaron las muestras para su análisis. Las muestras sobre el vidrio se calentaron en una estufa con convección natural de aire a 130 °C durante 15 minutos. Este par tiempo:temperatura fue utilizado en estudios previos en nuestro instituto para queso Cremoso; se determinó que permite el ablandamiento y escurrimiento del queso sin quemado de bordes o pardeamiento de la superficie (Mercanti et al., 2004). Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron retiradas de la estufa y enfriadas a 4 °C. Para cuantificar la capacidad de fusión de los quesos en estudio, se procedió a la determinación de las áreas de las muestras (inicial y final); mediante un escáner se obtuvo una imagen de la superficie inferior de cada una de ellas y el cálculo de las áreas se llevó a cabo utilizando un el software de dominio público Image J.

### 3.4.7. Análisis de textura

El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó de acuerdo con Zheng et al. (2016) con algunas modificaciones. Los ensayos de compresión uniaxial y relajación de tensiones se realizaron con una máquina universal de ensayos (modelo 3344, INSTRON Corp., Norwood, EE. UU.).

Se realizó un ciclo de doble compresión con un período de descanso de 5 s entre cada una. Las muestras, discos de queso (diámetro 28 mm y altura 16 mm) previamente estabilizados a 4 °C, fueron comprimidos al 30 % de su altura original a una velocidad de 1 mm/s. A partir de la curva fuerza-tiempo se obtuvieron los siguientes parámetros de textura: dureza (fuerza máxima en la primera compresión), índice de recuperación elástica instantánea (IREI, distancia recuperada por la muestra durante la descompresión del primer ciclo/distancia comprimida), índice de recuperación elástica retardada (IRER, distancia recuperada por la muestra entre el final de la compresión del primer ciclo y el inicio de la compresión del segundo ciclo/área positiva del primer ciclo), adhesividad (área negativa en la curva después de la primera compresión), cohesividad (área positiva después de la segunda compresión/área positiva después de la primera compresión), masticabilidad (dureza\*cohesividad\*IRER). Cada muestra se evaluó por triplicado.

### 3.4.8. Análisis estadístico

Todos los resultados se analizaron mediante ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas y se tomó como criterio una probabilidad  $p < 0,05$  como diferencia significativa y



las diferencias entre medias se determinaron mediante el test de Tukey. El análisis estadístico de los resultados fue realizado con el software Minitab 18 (Minitab Inc., PA, Estados Unidos).

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.1. Influencia del uso de leche ultrafiltrada en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso

###### 4.1.1. Composición y pH de la leche de elaboración

Como era de esperar, los contenidos de sólidos totales, grasa y proteína fueron más altos ( $p < 0,05$ ) en las leches concentradas mediante UF que en las leches control (Tabla 24), mientras que, por el contrario, el contenido de lactosa fue mayor en las leches control ( $p < 0,05$ ). Esto se debe a que la membrana de UF rechaza totalmente a la materia grasa y la proteína, mientras que la lactosa la atraviesa libremente por lo que está presente en ambas corrientes (permeado y concentrado).

**Tabla 24.** Composición global y pH de la leche control y ultrafiltrada utilizada en la elaboración de los quesos Cremoso miniatura. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Leche	pH	Grasa (%p/v)	Proteína (%p/v)	Lactosa (%p/v)	Sólidos totales no grasos (%p/v)	Sólidos totales (%p/v)
Control	6,65 $\pm$ 0,03	3,67 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	3,30 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	4,75 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	8,73 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	12,43 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>
Ultrafiltrada	6,50 $\pm$ 0,05	5,97 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	5,71 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	4,22 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	10,35 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	18,35 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Los valores con diferentes superíndices de una misma columna difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

###### 4.1.2. Composición global y pH de los quesos y sueros, y rendimiento quesero

La composición global y el pH de los quesos Cremoso miniatura se puede observar en la Tabla 25. Los mismos estuvieron dentro del rango esperado para queso Cremoso. Se observaron diferencias significativas en cuanto al pH, humedad y nivel proteico, mientras que el nivel de materia grasa fue similar en todos los quesos. Los quesos tipo E1 mostraron mayor pH y contenido de proteínas, y menos humedad que los quesos control ( $p < 0,05$ ). Los quesos tipo E3 también mostraron diferencias significativas con el control, aunque únicamente por un menor nivel de humedad. Guinee et al. (2006) encontraron una menor humedad y mayor contenido de grasa en quesos Cheddar elaborados con UF en comparación con el control. Estos autores atribuyeron la relación inversa entre el nivel de proteína de la leche y la humedad del queso al aumento conjunto en la proporción de caseína y sales solubles, que favorecería una agregación más rápida de las micelas de para-caseína y la formación de una red más gruesa y más porosa y por lo tanto más

propensa a la sinéresis en el corte y la agitación. Govindasamy-Lucey et al. (2005) elaboraron quesos para pizza con leche control y UF con dos niveles de sólidos totales (13,5 y 15,2 %) e informaron un menor contenido de humedad y mayor nivel de grasa en los quesos con 13,5 % de sólidos en comparación con los demás tratamientos.

Como se ha mencionado anteriormente, la disminución del pH en la elaboración y maduración de los quesos está direccionada por las BAL que fermentan la lactosa produciendo ácido láctico. Cuando se utilizan leches UF, la mayor capacidad amortiguadora de la cuajada, generada por las mayores concentraciones de caseína y fosfato de calcio, podría afectar la curva de disminución de pH. El uso de bajos niveles del starter podría profundizar este efecto; en leches UF se han utilizado diferentes dosis del starter, por unidad de volumen y menores, y por unidad de proteína (Mehaia, 2002, Govindasamy-Lucey et al., 2005, 2011). Mehaia (2002) observó un pH más elevado en quesos tipo Domiati elaborados con leche UF. Asimismo, Govindasamy-Lucey et al. (2005) encontraron que los quesos elaborados con leche concentrada mediante UF hasta 15,2 % de sólidos totales tuvieron un pH más alto durante la maduración que el queso control, lo que fue atribuido a la mayor capacidad amortiguadora de la leche UF. Teniendo en cuenta esto, en esta experiencia se estandarizó la concentración de starter en base al nivel proteico de la leche con el objetivo de que sea similar a la leche control, tal como fue sugerido y aplicado por otros autores (Govindasamy-Lucey et al., 2011; Guinee et al., 1996; Ong et al., 2013). Esta estrategia permitió mantener niveles de pH comparables entre quesos control y experimentales, más allá de la diferencia significativa que se observó entre el queso C y E1.

Por otro lado, la temperatura puede afectar el nivel de calcio coloidal de una leche, y por lo tanto el nivel retenido durante el proceso de UF. En efecto, los retentados de UF obtenidos a mayor o menor temperatura conducen a mayor y menor nivel de calcio coloidal, respectivamente, en la leche y por lo tanto en los quesos. Esto podría ser la razón de la variación que se ha observado en investigaciones anteriores en los niveles de retención de calcio en los quesos elaborados con leche UF en comparación con los elaborados con leche sin concentrar. Acharya & Mistry (2004) informaron que quesos Cheddar elaborados con leche ultrafiltrada a 55 °C tuvieron un mayor contenido de calcio que los quesos control. Sin embargo, el uso de retentados obtenidos por UF en frío (< 7 °C) condujo a niveles de calcio menores en quesos UF en comparación a queso control (Govindasamy-Lucey et al., 2011). En los quesos Cremoso elaborados en el presente capítulo no se encontraron diferencias significativas en la concentración de calcio entre los quesos control y experimentales, probablemente debido a la temperatura utilizada durante la UF. Si bien se observó una tendencia hacia mayores valores de calcio en los quesos con adición de este mineral, la diferencia no fue significativa.

Li & Corredig (2014) encontraron que la ultrafiltración y la diafiltración tienen un efecto significativo sobre la estructura de las micelas de caseína, provocando pérdidas de calcio coloidal

que pueden verse reflejadas en una mayor liberación de caseínas solubles al pH normal de la leche. Además, la capacidad amortiguadora y la liberación de calcio durante la acidificación de la leche concentrada dependieron de la concentración de proteína, pero no en forma proporcional. A su vez, la solubilización del fosfato de calcio micelar condujo a un incremento del pH en los quesos por inactivación de los iones hidrógeno con los aniones fosfato atrapados en la red de la paracaseína (Lee et al., 2010; Upreti & Metzger, 2007).

**Tabla 25.** Composición, pH y rendimiento de los quesos Cremosos miniatura elaborados a partir de leche control y UF a los 30 días de maduración, y composición, pH y volumen de los sueros de cada elaboración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Queso	Control	E1	E2	E3	E4
pH	5,47 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	5,64 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	5,54 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>	5,58 $\pm$ 0,04 <sup>a,b</sup>	5,56 $\pm$ 0,06 <sup>a,b</sup>
Humedad (% p/p)	53,76 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	48,13 $\pm$ 1,44 <sup>c</sup>	51,94 $\pm$ 1,08 <sup>a,b</sup>	50,95 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	51,87 $\pm$ 1,00 <sup>a,b</sup>
Proteína (% p/p)	18,05 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	20,94 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	19,58 $\pm$ 1,00 <sup>a,b</sup>	19,90 $\pm$ 0,42 <sup>a,b</sup>	19,22 $\pm$ 0,37 <sup>a,b</sup>
Grasa (% p/p)	25,51 $\pm$ 0,11	29,51 $\pm$ 1,61	27,91 $\pm$ 0,12	28,88 $\pm$ 0,44	27,21 $\pm$ 0,72
Calcio (% p/p)	0,48 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,01
Peso (g)	288 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	241 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	256 $\pm$ 12 <sup>a,b</sup>	254 $\pm$ 6 <sup>b</sup>	264 $\pm$ 6 <sup>a,b</sup>
Rendimiento (%) <sup>†</sup>	14,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	20,8 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	22,1 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	21,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	22,8 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
Recuperación proteína (%)	78,6 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	76,1 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	75,4 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	76,2 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	76,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
Recuperación sólidos totales (%)	53,4 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	58,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	58,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	58,5 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	59,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
<b>Suero</b>					
pH	6,38 $\pm$ 0,11	6,35 $\pm$ 0,07	6,35 $\pm$ 0,07	6,35 $\pm$ 0,11	6,38 $\pm$ 0,04
Grasa (% p/v)	0,50 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	0,63 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>	0,64 $\pm$ 0,00 <sup>a,b</sup>	0,64 $\pm$ 0,03 <sup>a,b</sup>	0,69 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
Proteína (% p/v)	0,57 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,27 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,25 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,29 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	1,30 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
Lactosa (% p/v)	4,83 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	3,89 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	3,89 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	3,88 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	3,87 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
Sólidos totales no grasos (% p/v)	6,30 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	5,82 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	5,80 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	5,83 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	5,83 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
Sólidos totales (% p/v)	7,18 $\pm$ 0,17	7,14 $\pm$ 0,11	7,15 $\pm$ 0,02	7,17 $\pm$ 0,04	7,21 $\pm$ 0,01
Volumen (mL)	1690 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	920 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	920 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	920 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	920 $\pm$ 21 <sup>b</sup>

<sup>†</sup>Valores expresados como kg/100 L de leche.

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E3: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de proteína, con y sin adición de calcio, respectivamente. E2 y E4: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de volumen, con y sin adición de calcio, respectivamente.

<sup>a,b,c</sup> Los valores con diferentes superíndices de una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

El rendimiento quesero calculado por el volumen de leche utilizada (Tabla 25) mostró diferencias significativas, observando mayores niveles para los quesos elaborados con la leche UF. Sin embargo, los valores fueron menores a los obtenidos en las experiencias *in vitro* en el capítulo anterior; esto puede estar relacionado a una mayor eficiencia del corte y secado del grano

en la elaboración *in situ* que su imitación por medio de corte con espátula y centrifugado *in vitro*, lo que condujo a una mayor pérdida de agua por la cuajada en una elaboración real en comparación a la experiencia *in vitro*. El rendimiento fue en promedio un 50% mayor en los quesos UF, lo que se correlaciona con el incremento de sólidos totales en la leche UF en relación a la leche control. El peso de los quesos E1 y E3 fue menor que el control, lo que probablemente esté asociado al menor contenido de humedad de los mismos. Por otro lado, se obtuvo una mayor recuperación de proteínas en el queso control, lo que puede deberse a un mejor manejo de la cuajada en el momento del corte y agitación respecto a los quesos experimentales UF. El menor volumen de suero en estos últimos (Tabla 25) dificulta el trabajo en la tina, por lo que pueden haberse formado y perdido más finos durante la elaboración. Johnson et al. (2001) evidenciaron que el porcentaje de nitrógeno recuperado en el queso Cheddar tendió a disminuir con el aumento de la firmeza del coágulo en el corte. Si bien en nuestra experiencia el corte de la cuajada se realizó cuando se alcanzó una firmeza similar, durante los pasos siguientes de agitación y corte, la cuajada se sigue endureciendo, con una velocidad mayor cuando la leche tiene mayor nivel de sólidos y cuando se usa mayor dosis de coagulante. Sin embargo, la recuperación de sólidos totales fue mayor para los quesos experimentales, lo que podría ser consecuencia de una mayor retención de lactosa y grasa. Los valores de recuperación de proteínas y sólidos están dentro del rango que han informado otros investigadores para distintos tipos de queso (Guinee et al., 2006; Heino et al., 2010).

En la Tabla 25 se muestra la composición global, el pH y el volumen del suero obtenido de las elaboraciones de cada tipo de queso. No se encontraron diferencias significativas en el pH, mientras que si hubo diferencias en la composición: se encontró un mayor contenido de proteína ( $p < 0,05$ ) en el suero de los quesos experimentales con respecto al control, mientras que la lactosa se comportó de manera inversa ( $p < 0,05$ ); esto refleja las diferencias de composición de la leche de partida (Soodam et al., 2018). En relación a la materia grasa, queda incluida en la cuajada; sin embargo, una mayor firmeza del gel puede originar mayores pérdidas de grasa en el suero durante el corte y agitación, sobre todo si los parámetros de elaboración no se ajustan adecuadamente (Govindasamy-Lucey et al., 2011). En nuestra experiencia, se observaron niveles levemente mayores de grasa en el suero de los quesos experimentales, siendo significativa la diferencia únicamente entre los quesos C y E4; esto indica que el manejo de la cuajada fue en general adecuado. El volumen de suero obtenido de cada tina experimental de elaboración fue similar ( $p \geq 0,05$ ), mientras que el volumen obtenido del control fue casi el doble de los experimentales; estos resultados muestran la significativa reducción de volumen de suero a procesar cuando se elaboran quesos con leche UF. Esta reducción del volumen de suero también fue informada por Govindasamy-Lucey et al. (2004) cuando usaron leche UF para elaborar queso Parmesano. De esta manera, el uso de leche UF en quesería permite optimizar la capacidad operativa de la planta

y disminuir la cantidad de suero producido por kg de queso. El-Alfy et al. (2008) y Govindasamy-Lucey et al. (2005) hallaron valores similares de la composición y volumen del suero de elaboración.

#### 4.1.3. Recuentos microbiológicos

En la Tabla 26 se muestran los resultados de los recuentos microbiológicos de los quesos elaborados con leche UF. El recuento de las bacterias lácticas totales se encontró dentro del orden esperado ( $\sim 9,5$  log UFC/g de queso), representando principalmente al cultivo iniciador *S. thermophilus* y no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos. El nivel de las bacterias no pertenecientes al fermento (NSLAB) fue mayor numéricamente para los quesos elaborados con leche UF sin encontrar diferencias significativas con respecto al control. Esta tendencia puede deberse a la mayor manipulación de la leche UF que debió ser primero microfiltrada a través del filtro bolsa y luego ultrafiltrada mediante la membrana polimérica que pudo acarrear una mayor contaminación microbiana. Los niveles de bacterias coliformes y de hongos y levaduras estuvieron por debajo de 3 log UFC/g y 2 log UFC/g respectivamente, niveles que son inferiores a los máximos establecidos por la legislación alimentaria nacional vigente (CAA, 2006).

**Tabla 26.** Recuentos de bacterias lácticas totales, NSLAB, coliformes y hongos y levaduras (HyL) (log UFC/g) en los quesos Cremoso miniatura elaborados a partir de leche control y UF a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

	Quesos				
	Control	E1	E2	E3	E4
Bacterias lácticas totales (log UFC/g)	9,48 $\pm$ 0,02	9,47 $\pm$ 0,08	9,39 $\pm$ 0,13	9,50 $\pm$ 0,04	9,49 $\pm$ 0,04
NSLAB (log UFC/g)	3,95 $\pm$ 0,59	4,87 $\pm$ 0,62	4,29 $\pm$ 0,52	4,77 $\pm$ 0,18	4,33 $\pm$ 0,89
Coliformes (log UFC/g)	<1	<1	<1	2,52 $\pm$ 0,31	<1
HyL (log UFC/g)	<1	<1	1,52 $\pm$ 0,62	<1	<1

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E3: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de proteína, con y sin adición de calcio, respectivamente. E2 y E4: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de volumen, con y sin adición de calcio, respectivamente.

#### 4.1.4. Carbohidratos y ácidos orgánicos

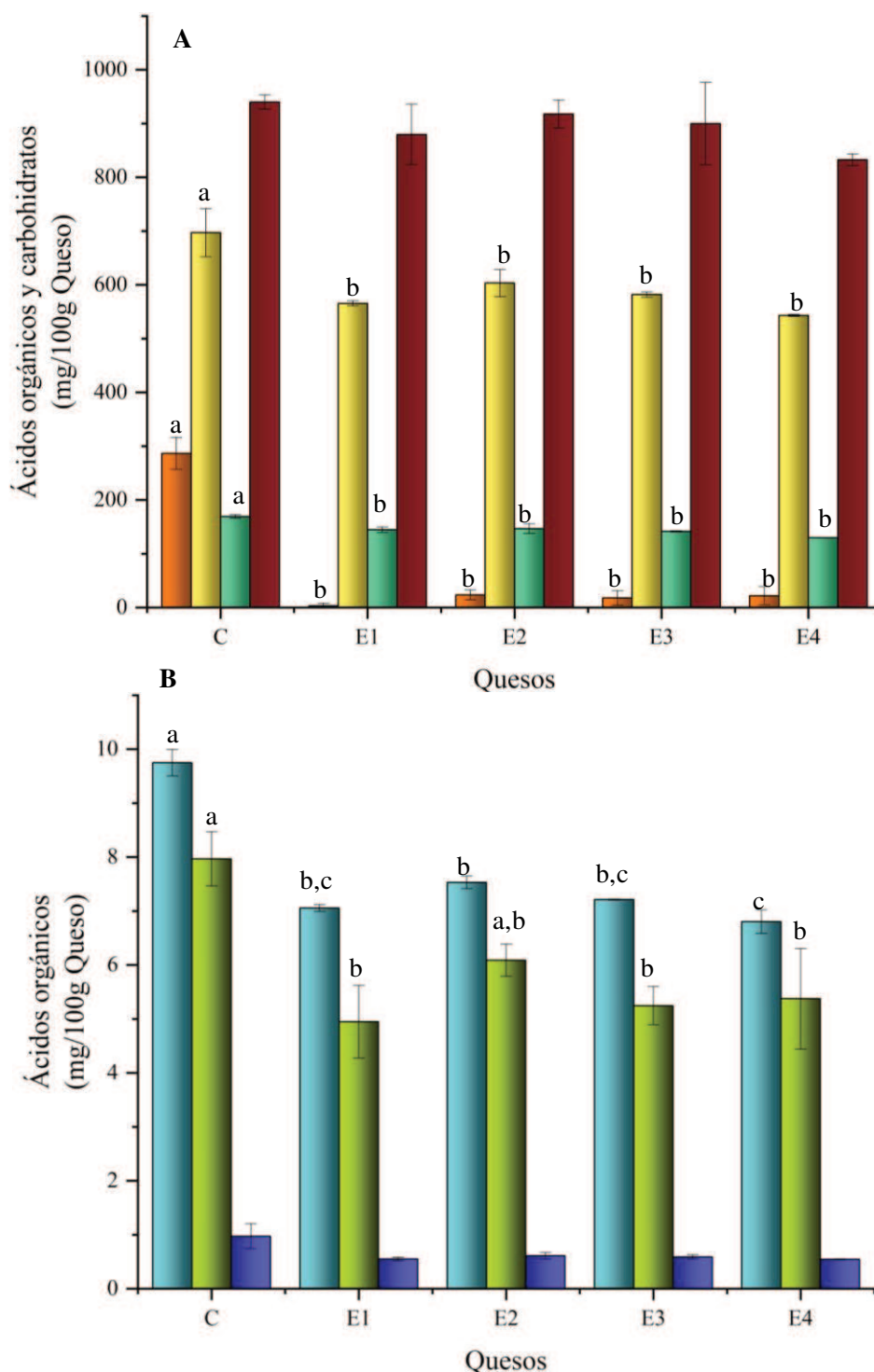
La concentración de lactosa y galactosa al finalizar la maduración fue significativamente diferente entre los quesos experimentales y el control (Figura 48). Los quesos elaborados con leche UF mostraron niveles muy bajos de lactosa ( $< 30$  mg/100 g de queso), mientras que el queso control contenía casi un orden de magnitud más (287 mg/100 g de queso), en coincidencia con la concentración informada previamente para este tipo de queso a los 30 días de maduración. El contenido de galactosa también fue significativamente mayor en el queso control que en los experimentales. Como ya fue mencionado en otros capítulos, la galactosa se acumula en este tipo

de queso dada la incapacidad del starter utilizado para fermentar este azúcar (Johnson & Olson, 1985). Los resultados obtenidos indican que el menor contenido de lactosa en la leche de partida de los quesos E repercutió en los niveles residuales de lactosa y galactosa en el queso. Sin embargo, estas diferencias no tuvieron un impacto en la producción de ácido láctico, ya que su concentración, al finalizar la maduración, fue similar en todos los quesos ( $p < 0,05$ ), lo que se correlaciona también con el valor similar de pH y de los recuentos microbianos. Govindasamy-Lucey et al. (2005) tampoco encontraron diferencias significativas en el nivel de ácido láctico en los quesos elaborados con leche UF con respecto a los controles.

Los niveles de ácido cítrico, pirúvico, orótico e hipúrico (Figura 48) fueron mayores en los quesos control con respecto a los experimentales, aunque sólo fue significativa la diferencia en los primeros tres. Los ácidos cítrico, orótico e hipúrico se encuentran naturalmente en la leche, siendo el ácido cítrico el mayoritario en la misma (Tormo & Izco, 2004). La mayor parte del ácido cítrico se pierde en el suero durante la elaboración de quesos (McSweeney, 2011); sin embargo, cierta cantidad residual de ácido cítrico queda retenida en la cuajada, concentrándose en la misma y resultando de esta manera el segundo ácido mayoritario luego del láctico en varios tipos de quesos (Izco et al., 2002; Milesi et al., 2010).

En esta experiencia no analizamos el contenido de ácidos orgánicos de la leche UF; sin embargo, es esperable que la concentración de los ácidos presentes naturalmente en la leche disminuya en la ultrafiltración ya que los mismos, al igual que los carbohidratos, pasan libremente por la membrana de UF dado que su tamaño es menor que los poros de la misma. Esto podría ser una de las causas de los menores niveles de cítrico y orótico en los quesos experimentales. Por otro lado, la fermentación del ácido cítrico por bacterias ácido lácticas citrato positivas da origen a compuestos volátiles importantes como acetoína, diacetilo, 2,3-butanodiol (McSweeney, 2011). La disminución de este ácido en los quesos experimentales también podría estar relacionado a la formación de compuestos de aroma (análisis no realizados). Upreti et al. (2006) reportaron que la concentración de ácido orótico en quesos con alto contenido de lactosa fue mayor que en aquellos con bajo contenido de lactosa y lo relacionaron con las actividades metabólicas de las BAL. En nuestro caso, los menores niveles de ácido orótico también podrían estar relacionados con la diferencia en los niveles de lactosa de la leche de elaboración y a su consumo por las NSLAB, que estuvieron en mayores niveles en los quesos UF. McGregor & White (1990) elaboraron queso Cheddar reducido en grasa con leche control y UF, y también encontraron menores niveles de ácido orótico en el queso UF al inicio de la maduración. En cuanto a la disminución del ácido pirúvico es difícil de relacionarlo con algún factor particular ya que existen numerosas vías metabólicas en las que este ácido es el compuesto intermediario (Broadbent et al., 2004; Kaminarides et al., 2007; Liu, 2003; McSweeney & Sousa, 2000). De esta manera, la

concentración de ácido pirúvico depende del balance entre la producción y la degradación por varias vías metabólicas.

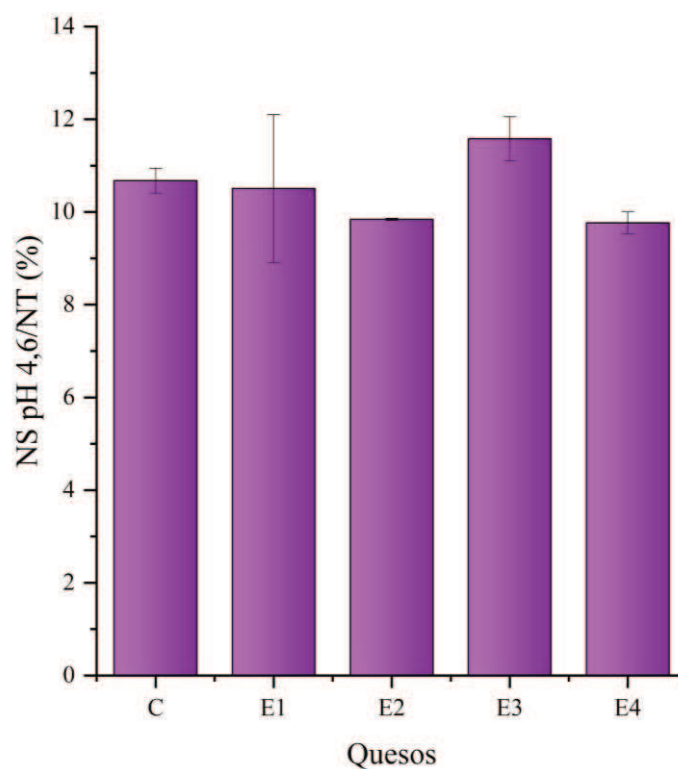


**Figura 48.** Niveles de carbohidratos (■, lactosa; ■, galactosa) y ácidos ■, cítrico y ■, láctico (A), y ácidos ■ orótico, ■ pirúvico e ■ hipúrico (B), en quesos Cremoso miniatura elaborados a partir de leche control y UF a los 30 días de maduración. Los valores (mg/100g de queso) se presentan como el promedio±desviación estándar de tres réplicas de quesos. Barras para el mismo compuesto con diferente letra, difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E3: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de proteína, con y sin adición de calcio, respectivamente. E2 y E4: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de volumen, con y sin adición de calcio, respectivamente.

#### 4.1.5. Proteólisis de los quesos elaborados con leche UF

El contenido porcentual de nitrógeno soluble a pH 4,6 como proporción del nitrógeno total alcanzó valores de ~11 % al final del período de maduración. Estos valores coinciden con los resultados de Milesi (2008) y Peralta (2014), que estudiaron la proteólisis de quesos Cremoso miniatura elaborados con leche sin concentrar. No se encontraron diferencias entre los quesos control y experimentales en la fracción estudiada (Figura 49); sin embargo, se puede observar que los quesos E2 y E4 que fueron elaborados con la dosis de coagulante por unidad de volumen (menor dosis) presentaron una tendencia hacia menores valores. La retención de la enzima coagulante en la cuajada es la principal responsable del contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 en quesos sin cocción y con alta humedad, como el Cremoso, donde se favorece su retención y actividad (Hynes et al., 2001b).



**Figura 49.** Contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS) expresado como proporción (%) del nitrógeno total (NT) en los quesos Cremoso miniatura elaborados con leche control y UF. Los valores corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de tres elaboraciones de queso.

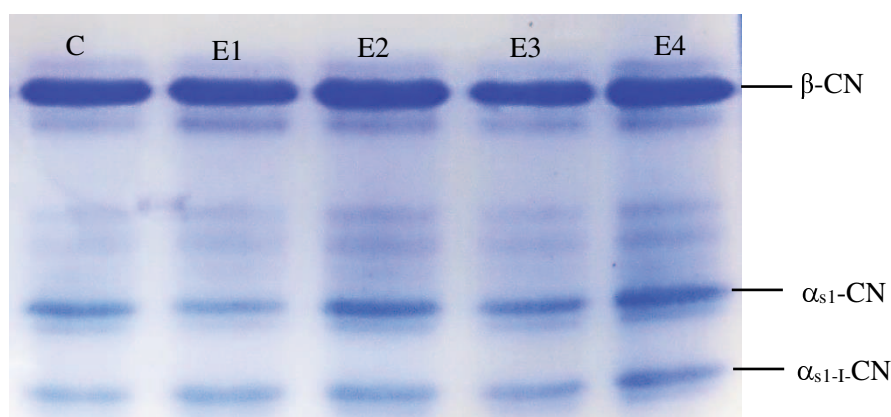
Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E3: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de proteína, con y sin adición de calcio, respectivamente. E2 y E4: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de volumen, con y sin adición de calcio, respectivamente.

Como ya fue descrito en la introducción general, la quimosina adicionada a la leche de elaboración se utiliza para coagular la leche mediante la hidrólisis específica de la  $\kappa$ -caseína presente en la superficie de las micelas de caseínas (Fox et al., 2017b), provocando la desestabilización coloidal y por consiguiente la coagulación (Dalgleish & Corredig, 2012). Sin embargo, esta enzima también contribuye a la proteólisis durante la maduración en la mayoría de



los quesos, particularmente en variedades con una cocción baja o media (Fox et al., 2017b). Si bien una gran proporción de la enzima se pierde en el suero durante la elaboración, un porcentaje variable (entre 0-30 %) se retiene en la cuajada, dependiendo del pH del desuerado, temperatura de cocción, humedad de la cuajada y tipo de enzima (Bansal et al., 2007; Upadhyay et al., 2004; Sheehan et al., 2007). En el proceso de maduración, el coagulante residual actúa fundamentalmente sobre la caseína  $\alpha_{s1}$ , para dar los péptidos  $\alpha_{s1}$  (f1-23) y  $\alpha_{s1}$  (f24-199) o  $\alpha_{s1-I}$  (Carles & Ribadeau-Dumas, 1985; McSweeney, 2004).

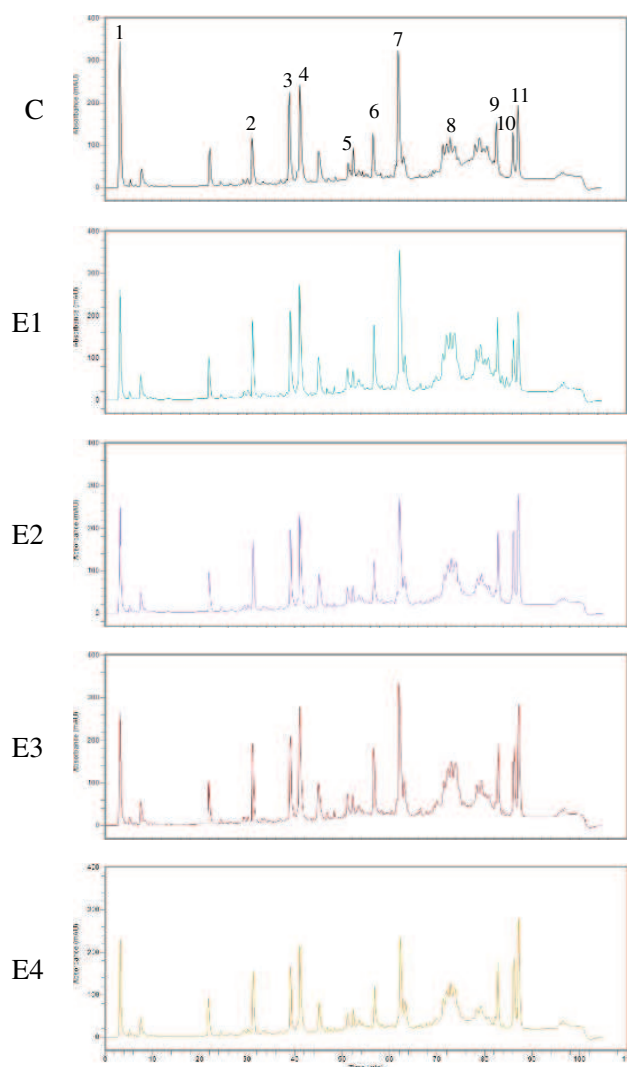
El rol del coagulante como enzima proteolítica durante la maduración de queso Cremoso fue exhaustivamente estudiado en el INLAIN. Para ello, se elaboraron y analizaron quesos en los cuales se suprimió la actividad de la enzima coagulante durante la maduración (Meinardi et al., 1998), y otros estudios en los que se utilizaron diferentes dosis del coagulante, y quesos sin actividad de enzima coagulante y sin fermento, en los cuales el único agente enzimático activo durante la maduración fue el sistema proteolítico nativo de la leche (Hynes, 1998; Hynes et al., 2001b). En estos estudios no fue detectada una acción proteolítica de la plasmina sobre las caseínas durante la maduración, mientras que la principal transformación fue la escisión de la caseína  $\alpha_{s1}$  en los péptidos  $\alpha_{s1-I}$ -CN y  $\alpha_{s1}$  siendo la quimosina la responsable de la misma. De hecho, los quesos con la enzima coagulante inactivada no evidenciaron acción hidrolítica en mayor medida que las cuajadas frescas y, por lo tanto, no maduraron correctamente. A su vez, los autores concluyeron que el coagulante no hidroliza la  $\beta$ -caseína durante la maduración en este tipo de queso. En otro estudio se informó que el uso de una dosis normal, media y doble de coagulante condujo a diferente nivel de coagulante residual en los quesos, y diferencias en la proteólisis al inicio de la maduración; sin embargo, la proteólisis se niveló y fue similar en los quesos a los 30 días. Estos resultados se atribuyeron a que una cantidad mínima de coagulante es suficiente para producir la hidrólisis de la caseína  $\alpha_{s1}$  y la consecuente aparición de  $\alpha_{s1-I}$ -CN, aunque más lentamente que en los quesos con dosis normal (Candioti et al., 2007). En nuestro análisis, los perfiles electroforéticos (Figura 50) corroboran lo obtenido para la fracción de nitrógeno soluble ya que no se observan grandes diferencias entre los distintos tratamientos. La fracción  $\alpha_{s1}$ -CN se ve levemente más marcada para el queso control y los experimentales E2 y E4, lo que sugeriría que los quesos E1 y E3 tuvieron una proteólisis levemente mayor, resultado que se correlaciona con la mayor dosis de coagulante. Sin embargo, el efecto de esta mayor dosis de coagulante no fue muy marcada, lo que se podría atribuir a lo mencionado anteriormente, que diferentes dosis generan diferencias de proteólisis al inicio de la maduración pero que a los 30 días se equilibran (Candioti et al., 2007), aunque también puede haber un efecto del menor contenido de humedad en los quesos E1 y E3, que desfavorece la retención de la enzima coagulante (Vélez et al., 2015).



**Figura 50.** Perfiles electroforéticos de la fracción insoluble a pH 4,6 de una de las réplicas de elaboración de los quesos Cremoso UF a los 30 días de maduración. Los gels del resto de las réplicas de los quesos fueron similares. Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E3: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de proteína, con y sin adición de calcio, respectivamente. E2 y E4: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de volumen, con y sin adición de calcio, respectivamente.

La Figura 51 muestra los perfiles peptídicos de una de las réplicas de elaboración de quesos Cremoso miniatura a los 30 días de maduración. Todos los perfiles fueron en general bastante similares. Se observaron diferencias sólo en algunos picos: el pico 1 fue mayor para los quesos control que los experimentales, mientras que los picos 2 y 5 tuvieron una tendencia opuesta. Los picos 6 y 7 tuvieron una mayor altura para los quesos E1 y E3 en relación a C, E2 y E4; probablemente estos picos sean derivados de la actividad coagulante sobre las caseínas ya que la dosis de coagulante era menor en estos últimos quesos. El grupo de péptidos marcados con el número 8 también aumentaron en los quesos experimentales, sobre todo en los E1 y E3. En cuanto a los picos correspondientes a las proteínas de suero (9, 10 y 11) fueron mayores en los quesos experimentales. En la leche UF se concentran todas las proteínas de la leche, tanto las proteínas de suero como las caseínas. Considerando que las proteínas de suero son solubles, es esperable que estén en mayores niveles en el suero y en la fase acuosa de la cuajada obtenida a partir de leche UF, en comparación al control. De este modo, se explica su mayor concentración en los perfiles peptídicos de los extractos de quesos UF.

Los resultados obtenidos en los diferentes índices de proteólisis analizados reflejan que, si bien la proteólisis fue bastante similar en todos los quesos, se presentaron algunas diferencias. El uso de leche UF condujo a mayores niveles de algunos péptidos y de las proteínas de suero en los perfiles peptídicos; las diferencias fueron más marcadas en los quesos en los que se usó una dosis de coagulante estandarizada por proteína.



**Figura 51.** Perfiles peptídicos obtenidos por RP-HPLC de los quesos Cremoso. El primer cromatograma contiene los picos identificados. Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E3: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de proteína, con y sin adición de calcio, respectivamente. E2 y E4: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de volumen, con y sin adición de calcio, respectivamente.

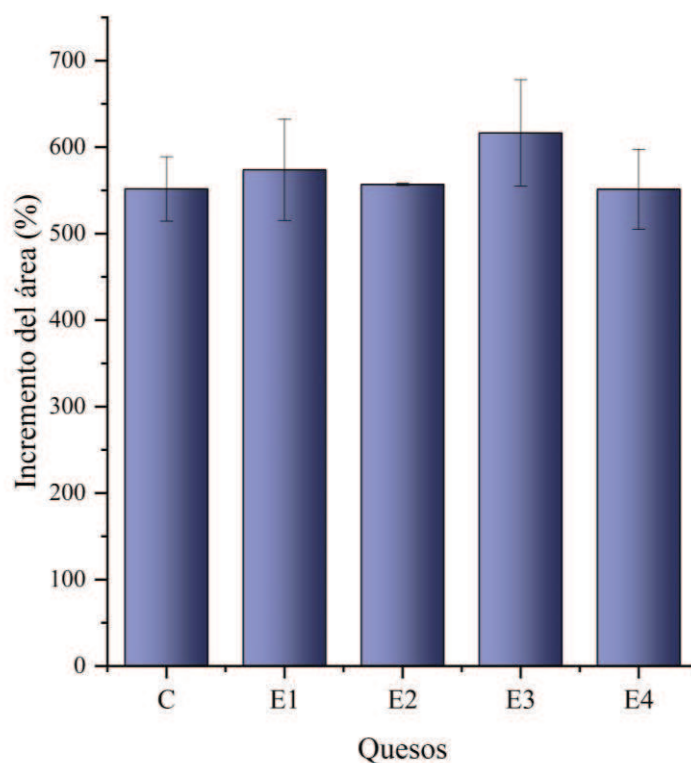
En general, en la bibliografía sobre quesos elaborados con leche UF, se informan resultados disímiles ya que predomina información acerca de una proteólisis retardada. Esto ha sido atribuido a distintas razones: una menor lisis del starter debido a la mayor capacidad buffer del retentado de UF y a la mayor cantidad de nutrientes en la leche concentrada (Hannon et al., 2006; Saboya et al., 2001), a la retención de compuestos que inhiben el coagulante y la plasmina (Benfeld et al., 2006; Kelly et al., 2008), a la actividad inhibitoria de proteínas de suero de alto peso molecular (Christensen et al., 1991; Neocleous et al., 2002), al uso de dosis incorrectas de coagulante (Agrawal & Hassan, 2007; Neocleous et al., 2002), a una menor actividad microbiana (El-Alfy et al., 2008; Hesari et al., 2007). Sin embargo, en algunos trabajos los autores hallaron

una proteólisis similar entre quesos elaborados con leche control y UF (Cunha et al., 2006). La disparidad puede estar asociada a la variabilidad en la dosis de enzima coagulante, la cual fue adicionada por unidad de volumen de la leche en algunos estudios, mientras que en otros casos se dosificó por unidad de proteína total o caseína (Cunha et al., 2006; Govindasamy-Lucey et al., 2011; Guinee et al., 2006; Ozturk et al., 2015). Incluso se presentan estudios en lo que la dosis de coagulante es menor a la dosis por unidad de volumen: Mehaia (2002) informó que en queso blanco fresco elaborado con leche ultrafiltrada con un factor de concentración de 4, el uso de una dosis baja fue suficiente para obtener un queso de buena calidad. Estos antecedentes resaltan la importancia de determinar la dosis correcta de coagulante en cada tipo de queso en particular cuando se usa leche UF, ya que los parámetros de elaboración y maduración son diferentes, y tienen impacto en la actividad del coagulante. En nuestra experiencia observamos que el uso de cualquiera de las dos dosis de coagulante ensayadas en queso Cremoso fueron adecuadas ya que dieron lugar a elaboraciones similares con algunos cambios menores en la proteólisis, y no se observó el defecto frecuentemente informado de retardo en la maduración. Por otro lado, Hesari et al. (2007) también reportaron un mayor nivel de las proteínas de suero ( $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina) en los quesos blancos iraníes elaborados con leche UF y adición de coagulante por volumen. Además, demostraron que la actividad coagulante fue mayor en los quesos UF.

#### 4.1.6. Capacidad de fusión

Las propiedades de textura, corte, estiramiento y fusión del queso Cremoso juegan un papel importante en su valor comercial y la aceptabilidad del consumidor. En particular, el comportamiento del queso Cremoso durante el calentamiento es importante ya que este queso se suele utilizar fundido en muchas preparaciones de alimentos. Esto se puede evaluar midiendo la capacidad de fusión, es decir, la capacidad del queso para fluir y esparcirse en condiciones estandarizadas a altas temperaturas (Candioti et al., 2007). En la Figura 52 se presentan los resultados del análisis de fusión de los quesos a los 30 días de maduración. El uso de leche UF para la elaboración de queso Cremoso junto con diferentes dosis de coagulante y la adición o no de calcio no afectó la fusión, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos quesos. Estos hallazgos coinciden con lo informado por Candioti et al. (2007) en un estudio realizado en quesos Cremoso con diferente dosis de coagulante, en el que estudiaron la influencia de la actividad residual de la enzima y el grado de proteólisis sobre las propiedades de fusión. El estudio reveló que los quesos Cremoso con bajo nivel de coagulante tuvieron una proteólisis más lenta pero que llegó a un nivel similar al final de la maduración en comparación con los quesos que tuvieron mayor dosis. Esto no afectó significativamente la capacidad de fusión del queso Cremoso. La proteólisis de los quesos puede influir en la capacidad de fusión de los mismos, ya que al hidrolizarse los péptidos cargados decrece la repulsión electrostática así como también la interacciones proteína-proteína, resultando en un aumento de la capacidad de fusión (Lucey et al.,

2003). Otros parámetros que tienen una gran influencia en la estructura, textura y capacidad de fusión de los quesos son el pH y el contenido de minerales ya que, al solubilizarse el calcio por cambios en el pH del queso, la asociación entre las caseínas se debilita, lo que ayuda a que el queso se funda con mayor facilidad (Joshi et al., 2003; Lucey & Fox, 1993). Es por ello que la proporción de calcio asociado a las partículas de caseína en el queso es un parámetro estructural mucho más importante que el contenido total de calcio. En los quesos Cremoso miniatura elaborados no se observaron grandes cambios en el nivel de calcio total y en la proteólisis primaria y peptidólisis, lo que es consistente con los resultados que evidenciaron una capacidad de fusión similar entre los quesos.



**Figura 52.** Incremento porcentual del área de un cilindro de queso sometido a calentamiento en estufa. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E3: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de proteína, con y sin adición de calcio, respectivamente. E2 y E4: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de volumen, con y sin adición de calcio, respectivamente.

#### 4.1.7. Perfil de textura

Los resultados del análisis de textura a los 30 días de maduración de los quesos Cremoso miniatura se muestran en la Tabla 27. Si bien todos los quesos elaborados con leche UF tuvieron mayor nivel de dureza que los quesos control y, a su vez, los quesos que tuvieron mayor dosis de coagulante (E1 y E3) tuvieron mayor dureza, sólo se observó diferencia significativa para el queso E1 con respecto al control. Este último fue elaborado con la mayor dosis de coagulante y la adición de calcio. Además, para el queso control y los quesos con menor dosis de coagulante (ya sea con

o sin calcio, E2 y E4) los valores de dureza mostraron valores más cercanos entre sí. En cuanto a la masticabilidad, parámetro directamente relacionado a la dureza, se observó la misma tendencia entre las muestras. El queso E1 tuvo los valores más altos de este parámetro, mientras que E4 registró diferencias significativas con respecto a E1, teniendo valores muy similares al control.

Luego de la deformación aplicada en el ensayo (30 %), los quesos mostraron en general un alto índice de recuperación elástica instantánea (IREI), que es prácticamente igual al índice de recuperación elástica retardada (IRER), lo que indica que estos quesos presentan alta elasticidad, se recuperan fácilmente luego del esfuerzo aplicado y no sufren deformación permanente en las condiciones de ensayo. En cuanto a la adhesividad todos los quesos mostraron valores similares y no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, el queso E4, mostró un valor menor al resto. La adhesividad se considera la fuerza necesaria para eliminar el material adherido en la boca al comer. Los demás parámetros estudiados (cohesividad y resiliencia) no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

**Tabla 27.** Resultados del análisis de textura de los quesos Cremoso miniatura elaborados a partir de leche control y UF a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Parámetro	Quesos				
	Control	E1	E2	E3	E4
Dureza (N)	7,701 $\pm$ 1,014 <sup>b</sup>	19,628 $\pm$ 6,993 <sup>a</sup>	9,648 $\pm$ 0,524 <sup>a,b</sup>	13,795 $\pm$ 1,409 <sup>a,b</sup>	9,545 $\pm$ 1,660 <sup>a,b</sup>
IREI	0,380 $\pm$ 0,040	0,324 $\pm$ 0,023	0,342 $\pm$ 0,045	0,342 $\pm$ 0,030	0,340 $\pm$ 0,007
IRER	0,367 $\pm$ 0,019	0,370 $\pm$ 0,010	0,353 $\pm$ 0,012	0,358 $\pm$ 0,007	0,351 $\pm$ 0,013
Cohesividad	0,676 $\pm$ 0,023	0,675 $\pm$ 0,040	0,648 $\pm$ 0,024	0,672 $\pm$ 0,014	0,666 $\pm$ 0,010
Resiliencia	0,348 $\pm$ 0,024	0,360 $\pm$ 0,012	0,323 $\pm$ 0,009	0,360 $\pm$ 0,036	0,355 $\pm$ 0,014
Masticabilidad (N)	2,059 $\pm$ 0,503 <sup>b</sup>	4,690 $\pm$ 1,542 <sup>a</sup>	2,221 $\pm$ 0,245 <sup>a,b</sup>	3,303 $\pm$ 0,349 <sup>a,b</sup>	2,134 $\pm$ 0,354 <sup>b</sup>
Adhesividad (J)	1,277 $\pm$ 0,247	1,490 $\pm$ 0,382	1,300 $\pm$ 0,261	1,684 $\pm$ 0,606	0,894 $\pm$ 0,160

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E3: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de proteína, con y sin adición de calcio, respectivamente. E2 y E4: Quesos elaborados con leche UF y dosis de coagulante por unidad de volumen, con y sin adición de calcio, respectivamente.  
<sup>a,b</sup> Los valores con diferentes superíndices en una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

La concentración más elevada de caseína y coagulante probablemente produjo una red de caseínas tridimensional más fuerte durante la coagulación. A su vez, las diferencias de dureza entre los quesos experimentales también pueden atribuirse al menor contenido de humedad del queso E1 con respecto al resto. La textura de los quesos se ve afectada por múltiples factores: factor de concentración proteica, composición del queso (relación materia grasa/proteína y contenido de humedad), grado de proteólisis, contenido de calcio y pH, entre otras (Fox et al., 2017d; Neocleous et al., 2002). Broome et al. (1998) encontraron que el queso Cheddar elaborado

con leche UF con un contenido de proteína entre 4,5-5 % resultó más duro y con una mayor masticabilidad que el queso elaborado con leche control (3,46 % de proteína). De forma similar, Soodam et al. (2014) informaron que el queso Cheddar elaborado con leche UF (4,8 y 5,8 % de proteínas) a los 180 días de maduración fue significativamente más duro que el queso control elaborado con un nivel de 3,7 % de proteína en la leche de partida. Hou et al. (2014) estudiaron el impacto del lavado de la cuajada para disminuir los niveles de lactosa en la textura del queso Cheddar y observaron que aún con una composición y proteólisis similar, pero con menores niveles de lactosa y ácido láctico, los quesos eran en general más firmes y menos quebradizos. Otro factor que puede afectar la textura del queso es el nivel de grasa, resultando más duros aquellos con menor contenido de grasa (Rashidi et al., 2015).

## 4.2. Influencia del agregado de LPD en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso

### 4.2.1. Composición y pH de la leche de elaboración

La LPD utilizada para el enriquecimiento proteico de la leche utilizada en la elaboración de los quesos Cremoso miniatura fue la misma que en la experiencia *in vitro*, su composición se muestra en la sección 4.4.1. del Capítulo 3. Los valores del pH y de la composición final de la leche control y los distintos tipos experimentales se muestran en la Tabla 28. Al igual que lo observado en el capítulo anterior, hubo una leve disminución del pH de la leche por la incorporación de la LPD. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de materia grasa, proteína y lactosa entre los tres tipos de leche de elaboración siendo mayores a mayores niveles de adición de polvo, aunque se mantuvo la relación materia grasa:proteína en 1,1. En esta experiencia, a diferencia de lo realizado en el capítulo anterior, se adicionó materia grasa a las leches enriquecidas con LPD para mantener la misma relación materia grasa:proteína con el objetivo de obtener quesos Cremoso de similar composición.

**Tabla 28.** Composición global y pH de la leche control y adicionada de LPD utilizada en la elaboración de los quesos Cremoso miniatura. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Leche	pH	Grasa (%p/v)	Proteína (%p/v)	Lactosa (%p/v)	Sólidos totales no grasos (%p/v)	Sólidos totales (%p/v)
Control	6,63 $\pm$ 0,04	3,76 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	3,30 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	4,92 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	8,93 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	12,59 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
E1	6,58 $\pm$ 0,04	4,75 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	4,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	6,21 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	11,20 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	15,58 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
E2	6,56 $\pm$ 0,03	5,36 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	4,72 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	7,15 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	12,85 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	18,23 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>

Control: Leche sin adición de LPD. E1: Leche adicionada de 2,8 % p/v de LPD. E2: Leche adicionada de 4,8 % p/v de LPD.

<sup>a,b,c</sup> Los valores con diferentes superíndices en una misma columna difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Composición global y pH de los quesos y sueros, y rendimiento quesero

La composición global y el pH de los quesos Cremoso miniatura (Tabla 29) estuvieron dentro de lo establecido por la legislación vigente (CAA, 2006). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al pH, la humedad y el nivel de proteínas, mientras que si se hallaron para los niveles de materia grasa de los quesos control con respecto a E1L y E2, aunque la diferencia numérica fue muy baja. De todas maneras, entre los quesos experimentales no se observó esta diferencia.

**Tabla 29.** Composición, pH y rendimiento de los quesos Cremosos miniatura elaborados a partir de leche control y LPD a los 30 días de maduración, y composición, pH y volumen de los sueros de cada elaboración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración

Queso	Control	E1	E1L	E2	E2L
pH	5,25 $\pm$ 0,00	5,27 $\pm$ 0,04	5,31 $\pm$ 0,01	5,29 $\pm$ 0,04	5,27 $\pm$ 0,03
Humedad (% p/p)	54,32 $\pm$ 0,45	53,43 $\pm$ 0,67	53,67 $\pm$ 0,62	53,80 $\pm$ 0,83	54,11 $\pm$ 0,50
Proteína (% p/p)	17,69 $\pm$ 0,55	17,51 $\pm$ 0,37	17,06 $\pm$ 0,17	16,90 $\pm$ 0,35	16,93 $\pm$ 0,77
Grasa (% p/p)	26,36 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	25,89 $\pm$ 0,39 <sup>a,b</sup>	25,54 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	25,35 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	25,65 $\pm$ 0,17 <sup>a,b</sup>
Peso (g)	280 $\pm$ 6	272 $\pm$ 8	273 $\pm$ 3	274 $\pm$ 5	274 $\pm$ 5
Rendimiento (%)†	14,0 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	18,1 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	18,2 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	21,1 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	21,1 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
Recuperación proteína (%)	74,9 $\pm$ 1,1	78,3 $\pm$ 3,4	76,1 $\pm$ 0,1	75,4 $\pm$ 0,7	75,7 $\pm$ 2,6
Recuperación sólidos totales (%)	50,7 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	54,4 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	53,9 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	53,4 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	53,0 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
<b>Suero</b>					
pH	6,35 $\pm$ 0,07	6,35 $\pm$ 0,00	6,38 $\pm$ 0,04	6,34 $\pm$ 0,09	6,34 $\pm$ 0,05
Grasa (% p/v)	0,40 $\pm$ 0,03 <sup>a,b</sup>	0,39 $\pm$ 0,12 <sup>a,b</sup>	0,30 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,50 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,32 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
Proteína (% p/v)	1,11 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,19 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	1,01 $\pm$ 0,01 <sup>e</sup>	1,24 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,04 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
Lactosa (% p/v)	5,06 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	6,51 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	4,73 $\pm$ 0,09 <sup>e</sup>	7,53 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	5,34 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>
Sólidos totales no grasos (% p/v)	6,42 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	8,18 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	5,92 $\pm$ 0,13 <sup>d</sup>	9,28 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	6,65 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>
Sólidos totales (% p/v)	7,12 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	8,21 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	6,70 $\pm$ 0,14 <sup>d</sup>	9,00 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	7,16 $\pm$ 0,15 <sup>c</sup>
Volumen (mL)	1699 $\pm$ 45 <sup>a</sup>	1159 $\pm$ 56 <sup>b</sup>	1173 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	934 $\pm$ 46 <sup>c</sup>	1021 $\pm$ 39 <sup>c</sup>

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E1L: Quesos elaborados con leche adicionada de 2,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente. E2 y E2L: Quesos elaborados con leche adicionada de 4,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada.

<sup>a,b,c,d,e</sup> Los valores con diferentes superíndices en una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

El peso de los quesos fue similar (275 $\pm$ 3 g) entre los distintos tratamientos. El rendimiento quesero calculado en función del volumen de leche fue mayor en los quesos elaborados con leches enriquecidas ( $p < 0,05$ ), incrementándose ~29% y ~50% en los quesos con el nivel menor y mayor de LPD incorporada, respectivamente, en comparación al control. En cuanto a la recuperación de



proteínas y sólidos totales, se observaron mayores valores en los quesos experimentales, siendo significativa la diferencia únicamente en la recuperación de sólidos ( $p < 0,05$ ).

En cuanto al volumen de suero de cada tina de elaboración, se encontraron diferencias significativas, al igual que lo observado en la experiencia de quesos UF. De esta manera, el uso de las leches enriquecidas con LPD permite optimizar la capacidad de la planta quesera, y disminuir el volumen de suero producido por kg de queso. La concentración proteica y el contenido de lactosa de los sueros fue diferente para cada tratamiento, lo que se correlacionó con la diferente concentración de la leche de partida y con la etapa de lavado de la cuajada que disminuyó la concentración con respecto a los sueros pertenecientes a las cuajadas no lavadas. El pH de los sueros fue similar ( $p \geq 0,05$ ) para todos los tratamientos.

### 4.2.3. Recuentos microbiológicos

En la Tabla 30 se muestran los resultados de los recuentos microbiológicos de los quesos Cremoso miniatura a los 30 días de maduración. Al igual que lo observado en los quesos elaborados con leche UF, el recuento de las bacterias lácticas totales que referencian el nivel del fermento primario estuvo dentro de los niveles esperados ( $\sim 9,5$  log UFC/g de queso) y no hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Estos hallazgos coinciden con los de Shakeel-Ur-Rehman et al. (2003a), que estudiaron la influencia de la modificación de los niveles de lactosa en queso Cheddar. En esta experiencia, y a diferencia de lo que encontrado en los quesos UF, las NSLAB estuvieron por debajo de 3 órdenes logarítmicos UFC/g en todos los quesos.

**Tabla 30.** Recuentos de bacterias lácticas totales y NSLAB (log UFC/g) en quesos Cremoso miniatura elaborados a partir de leche control y adicionada de LPD a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

	Quesos				
	Control	E1	E1L	E2	E2L
Bacterias lácticas totales (log UFC/g)	9,59 $\pm$ 0,09	9,58 $\pm$ 0,07	9,50 $\pm$ 0,10	9,46 $\pm$ 0,10	9,51 $\pm$ 0,11
NSLAB (log UFC/g)	<3	<3	<3	<3	<3

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E1L: Quesos elaborados con leche adicionada de 2,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente. E2 y E2L: Quesos elaborados con leche adicionada de 4,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada.

Estos resultados indican que el crecimiento, tanto del cultivo iniciador como de las NSLAB, no estuvo influenciado por la diferente composición de la leche de partida. Se ha propuesto que la lactosa puede ser utilizada por las NSLAB para su crecimiento en el queso (Williams et al., 2000); sin embargo, en esta experiencia no vimos un impacto significativo de los mayores niveles

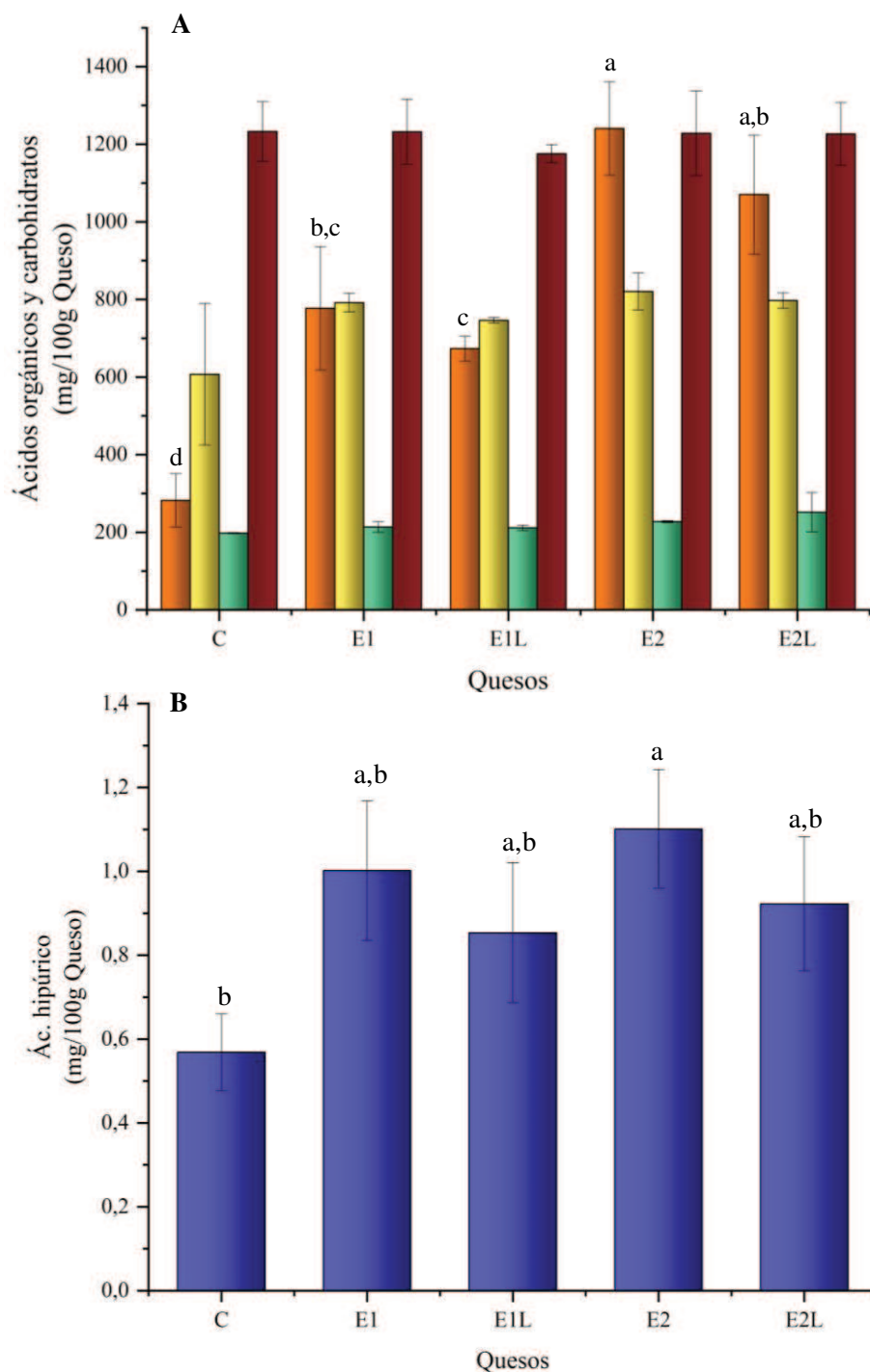
de este carbohidrato en las NSLAB, lo que puede atribuirse a una buena calidad microbiológica de la leche, a la elaboración a escala miniatura en laboratorio donde las contaminaciones son menores que en una planta láctea, y al poco tiempo de maduración de este tipo de queso.

#### 4.2.4. Carbohidratos y ácidos orgánicos

Se determinó la concentración de lactosa, galactosa y tres ácidos orgánicos (láctico, cítrico e hipúrico) en los quesos control y experimentales a 30 días de maduración (Figura 53). En todos los quesos, los ácidos mayoritarios fueron el ácido láctico (~ 1200 mg/100 g), seguido por el ácido cítrico (~ 200 mg/100 g), los cuales estuvieron en niveles similares en todos los quesos. El contenido de ácido hipúrico fue muy bajo (< 2 mg/100 g) y presentó diferencias significativas: los menores niveles se presentaron en los quesos control, seguido por los quesos experimentales que tuvieron la etapa de lavado y por último los experimentales sin lavado. Esta diferencia se puede atribuir al incremento de este ácido en la leche de elaboración por el agregado de LPD ya que el ácido hipúrico está presente de forma natural en la leche. En efecto, los mayores niveles se encontraron para el queso elaborado con el mayor nivel de polvo adicionado y es evidente que el lavado de la cuajada influyó en la disminución.

En cuanto a los carbohidratos, como era de esperar, se encontraron diferencias significativas en la concentración de lactosa entre el queso control y experimentales ya que el polvo adicionado en la leche experimental aportaba lactosa en alta proporción. La concentración de lactosa en el queso control fue similar a la determinada en el queso control de la experiencia de UF, lo que era de esperar ya que son equivalentes; este resultado muestra la reproducibilidad del modelo miniatura utilizado en ambas experiencias. Dentro de los quesos experimentales, se hallaron mayores contenidos de lactosa en los quesos elaborados con más LPD, con una tendencia a disminuir en los quesos con etapa de lavado, pero sin diferencias significativas. Algunos autores (Shakeel Ur Rehman et al., 2003) informaron algunas desventajas en el uso de LPD como estrategia de estandarización de la leche: el aumento de la concentración de lactosa en la leche enriquecida puede traer como consecuencia un mayor contenido residual en el queso y, en consecuencia, fermentaciones no deseadas durante la maduración. Sin embargo, en nuestra experiencia, no se verificó un incremento del ácido láctico en los quesos Cremoso con el nivel más alto de lactosa, ni modificaciones del pH, y tampoco se observaron mayores recuentos de NSLAB. Oh et al. (2014) estudiaron los efectos de la temperatura de maduración y el enriquecimiento proteico (2 % p/p de LPD) en quesos Cottage y encontraron que para una temperatura de maduración normal (5 °C) los niveles de ácido láctico para los quesos enriquecidos y controles (sin adición de LPD) a los 28 días fueron similares, mientras que al ser madurados a 12 °C y suplementados con LPD el ácido láctico aumentó significativamente. Este aumento fue atribuido al mayor crecimiento de las NSLAB en los quesos madurados a mayor temperatura y con mayores niveles de lactosa. Por otro lado, en nuestra investigación, el contenido de galactosa

fue mayor en los quesos experimentales que en los controles; sin embargo, la diferencia no fue significativa. Las tendencias observadas en los niveles de lactosa y galactosa difieren de la observada en los quesos elaborados mediante UF, lo que puede atribuirse de la diferente concentración de la lactosa en las leches de elaboración.

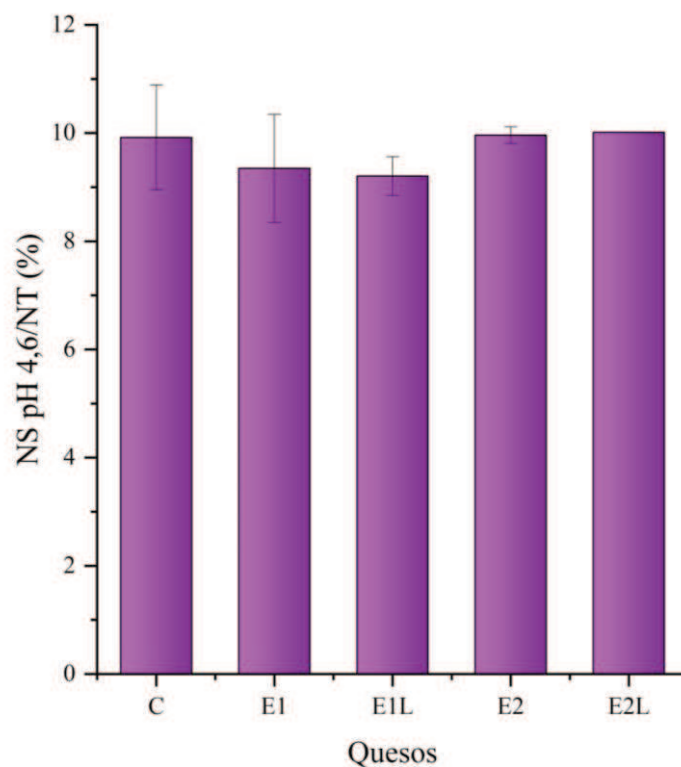


**Figura 53.** Niveles de carbohidratos (■, lactosa; ■, galactosa) y ácidos (■, cítrico; ■, láctico) (A), ácido hipúrico (■) (B) en los quesos Cremoso miniatura elaborados con leche control y adicionada de LPD. Los valores (mg/ 100g de queso) se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de quesos. Barras para el mismo compuesto con diferente letra, difieren significativamente ( $p < 0,05$ ). Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E1L: Quesos elaborados con leche adicionada de 2,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente. E2 y E2L: Quesos elaborados con leche adicionada de 4,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada.

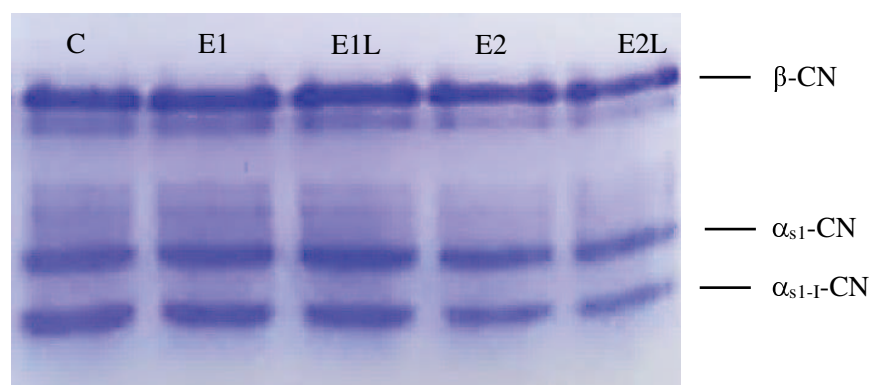
#### 4.2.5. Estudio de la proteólisis

Los niveles de nitrógeno soluble a pH 4,6 como proporción del nitrógeno total fueron similares a los encontrados para la experiencia de UF. En este caso tampoco se observaron diferencias significativas entre los quesos miniatura con y sin la adición de LPD a la leche de elaboración (Figura 54). La Figura 55 muestra los geles obtenidos de las fracciones insolubles a pH 4,6 de cada tratamiento a los 30 días de maduración, que fueron similares. Estos parámetros proporcionan un índice de proteólisis primaria, relacionado principalmente con la enzima coagulante. Cabe mencionar que en la elaboración de estos quesos Cremoso miniatura, el coagulante fue adicionado por unidad de volumen, por lo que la relación enzima:caseína fue menor en los quesos experimentales, sobre todo en los de mayor adición de LPD. Algunos autores (Govindasamy-Lucey et al., 2005) mencionan que cuando la relación enzima:caseína se mantiene constante para la elaboración de queso a partir de leche con niveles variables de sólidos totales, no se observan diferencias en la proteólisis. Moynihan (2015) elaboró quesos Cheddar con distintos niveles de proteína en la leche (3,35; 3,66; 4,13 y 4,91 % p/v) por el agregado de LPD y encontró que los quesos con mayor nivel proteico tuvieron mayor cantidad de  $\alpha_{s1}$ -caseína (f 24-199) que de  $\alpha_{s1}$ -caseína (f 102-199) y menores niveles de NS a pH 4,6/NT. Los investigadores asociaron esto a una menor actividad del coagulante debido a que se utilizó una menor relación enzima:caseína en los quesos con mayor nivel de LPD. Sin embargo, el efecto depende del tipo de queso y el tiempo de maduración. Candiotti et al. (2007) informaron que el uso de diferente relación coagulante:caseína condujo a similares niveles de proteólisis en queso Cremoso al final de la maduración. Esto fue atribuido a que la dosis de coagulante utilizada, aun cuando la relación coagulante:caseína fue menor, fue suficiente para lograr el nivel de proteólisis adecuado. Esto podría explicar también los resultados que obtuvimos en esta experiencia.

Por otro lado, Brito et al. (2000) encontraron niveles más bajos de proteólisis primaria en queso Maribo elaborado con leche adicionada de diferentes niveles de LPD; para interpretar este resultado se consideró que el tratamiento térmico medio aplicado al polvo utilizado afectó la susceptibilidad de las caseínas a la proteólisis durante la maduración. En los quesos Cremoso elaborados en esta experiencia, la LPD utilizada era de tratamiento térmico bajo. Por otro lado, y en coincidencia con nuestros resultados, el nivel de lactosa y el lavado de la cuajada en la elaboración de quesos Cheddar no afectó significativamente el nivel de nitrógeno soluble a pH 4,6 (Hou et al., 2014; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2004).



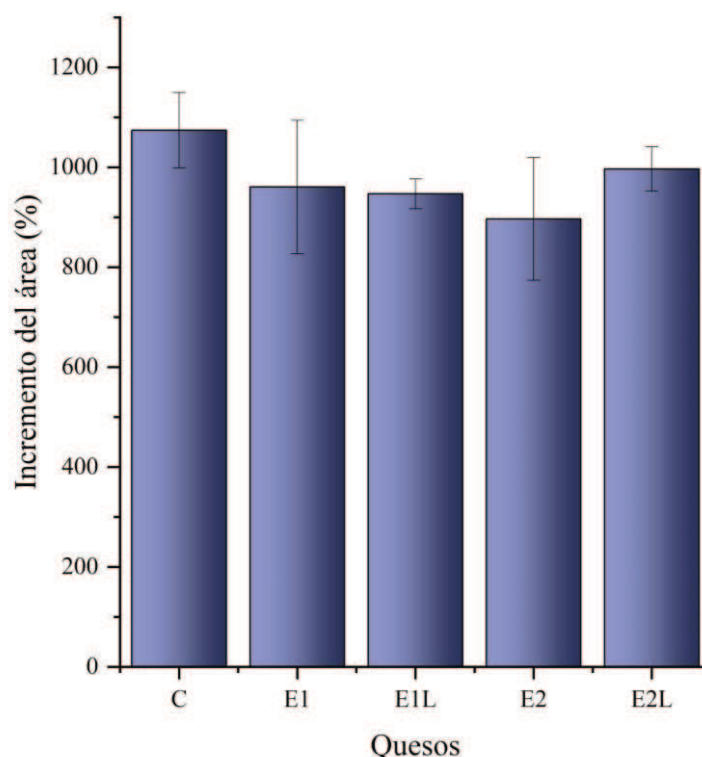
**Figura 54.** Contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS), expresado como proporción (%) del nitrógeno total (NT), en los quesos Cremoso miniatura elaborados con leche control y adicionada de LPD a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración. Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E1L: Quesos elaborados con leche adicionada de 2,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente. E2 y E2L: Quesos elaborados con leche adicionada de 4,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada.



**Figura 55.** Perfiles electroforéticos de la fracción insoluble a pH 4,6 de una de las réplicas de elaboración de los quesos Cremoso elaborados con leche con y sin adición de LPD, a los 30 días de maduración. Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E1L: Quesos elaborados con leche adicionada de 2,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente. E2 y E2L: Quesos elaborados con leche adicionada de 4,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada. Los gels del resto de las réplicas de los quesos fueron similares.

#### 4.2.6. Capacidad de fusión

En cuanto a la capacidad de fusión, no se encontraron diferencias significativas entre los quesos (Figura 56). Los valores obtenidos fueron superiores a los encontrados para la experiencia de UF; esto puede estar relacionado al mayor contenido de humedad de los quesos de esta experiencia y sus menores valores de pH, parámetros que influyen en la capacidad de fusión. La mayor concentración proteica de la leche de partida y el lavado de la cuajada no influyeron.



**Figura 56.** Incremento porcentual del área de un cilindro de queso sometido a calentamiento en estufa de los quesos Cremoso elaborados con leche con y sin adición de LPD, a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración. Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E1L: Quesos elaborados con leche adicionada de 2,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente. E2 y E2L: Quesos elaborados con leche adicionada de 4,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada.

Moynihan (2015) encontró que la cantidad de LPD agregada a la leche de elaboración de queso Cheddar afectaba la capacidad de fusión, lo que fue asociado a una menor humedad, en los quesos con mayores niveles de LPD en comparación con el control y quesos con baja adición de LPD. De la misma manera, nuestros resultados muestran una tendencia a menor fusión a medida que se incrementa la adición de LPD en los quesos sin etapa de lavado:  $C > E1 > E2$ . Sin embargo, los quesos con lavado no mostraron una tendencia clara. Se ha informado que el lavado de la cuajada o la dilución del suero conduce a una mayor pérdida de calcio soluble y calcio coloidal, como también de otros iones, lo que implica una disminución de la fuerza iónica que puede afectar positivamente la capacidad de fusión del queso (Lucey et al., 2003). Chevanan & Muthukumarappan (2007) estudiaron la fusión de quesos Cheddar con diferentes niveles de calcio

y fósforo, lactosa y contenido de sal en la humedad y encontraron que los niveles bajos de los cuatro factores estudiados favorecían la capacidad de fusión, al contrario de los niveles elevados. Los autores atribuyeron estos resultados a un efecto indirecto: la mayor proteólisis en los quesos con menor concentración de calcio, fósforo, lactosa y sal en la humedad resultó en un queso más blando y una mayor fusión.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que niveles elevados de azúcares residuales pueden dar lugar a reacciones de caramelización y pardeamiento al someter las muestras a calentamiento energético en un horno o estufa (Porcellato et al., 2015). En la presente experiencia, aun teniendo mayor concentración de lactosa en los quesos experimentales, no se observó diferencia de color con el queso control en el ensayo de fusión llevado a cabo a 130 °C durante 15 min.

#### **4.2.7. Análisis de textura**

Los resultados obtenidos en el análisis de textura (Tabla 31) indican que los quesos E2, E2L y E1 presentaron una dureza levemente superior al control y al queso E1L. En relación al queso control, únicamente el queso E2L mostró diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Una tendencia similar fue observada en los resultados de masticabilidad, lo que es lógico ya que la dureza influye directamente en este parámetro. Estos resultados indican en general un aumento de la dureza y la necesidad de una mayor fuerza para la masticación en los quesos elaborados con leche concentrada, mientras que no hubo una tendencia clara con respecto al lavado de la cuajada. Moynihan (2015) informó que los quesos Cheddar con alto nivel de LPD tuvieron una dureza significativamente más alta que el queso control o el de menor agregado de LPD, es decir que la adición de este polvo lácteo en niveles bajos tuvo poco efecto sobre la dureza de los quesos en comparación con el queso control. En la misma línea, otros autores han demostrado que altos niveles de calcio, fosfato y lactosa residual en el queso Cheddar influyen en los atributos de textura, proporcionando valores más altos de este parámetro (Chevanan & Muthukumarappan, 2007). A su vez, encontraron una correlación inversa entre la dureza y la capacidad de fusión en cualquier tiempo de maduración: a menor dureza, mayor capacidad de fusión. En los quesos Cremoso elaborados en esta experiencia se observaron cambios menores, no significativos, pero la tendencia fue similar.

Como se encontró en los quesos UF, los quesos mostraron en general altos índices de recuperación elástica instantánea y retardada, con valores similares entre ellos, mostrando una alta elasticidad y recuperación luego del esfuerzo aplicado, sin sufrir deformación permanente en las condiciones ensayadas. No se encontraron diferencias significativas en la cohesividad, la resiliencia y la adhesividad entre los distintos tratamientos.

**Tabla 31.** Resultados del análisis de textura de los quesos Cremoso miniatura elaborados a partir de leche control y adicionada de LPD a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Parámetro	Quesos				
	Control	E1	E1L	E2	E2L
Dureza (N)	1,975 $\pm$ 0,339 <sup>a,b</sup>	2,554 $\pm$ 0,482 <sup>b,c</sup>	1,783 $\pm$ 0,183 <sup>a</sup>	2,328 $\pm$ 0,062 <sup>a,b,c</sup>	2,666 $\pm$ 0,309 <sup>c</sup>
IREI	0,368 $\pm$ 0,041	0,357 $\pm$ 0,033	0,353 $\pm$ 0,045	0,373 $\pm$ 0,044	0,377 $\pm$ 0,044
IRER	0,277 $\pm$ 0,143	0,336 $\pm$ 0,008	0,331 $\pm$ 0,025	0,356 $\pm$ 0,029	0,342 $\pm$ 0,020
Cohesividad	0,728 $\pm$ 0,029 <sup>a</sup>	0,722 $\pm$ 0,047 <sup>a</sup>	0,709 $\pm$ 0,046 <sup>a</sup>	0,738 $\pm$ 0,019 <sup>a</sup>	0,725 $\pm$ 0,013 <sup>a</sup>
Resiliencia	0,316 $\pm$ 0,054	0,342 $\pm$ 0,048	0,311 $\pm$ 0,024	0,355 $\pm$ 0,042	0,358 $\pm$ 0,032
Masticabilidad (N)	0,384 $\pm$ 0,198 <sup>a</sup>	0,620 $\pm$ 0,112 <sup>a,b</sup>	0,422 $\pm$ 0,087 <sup>a,b</sup>	0,609 $\pm$ 0,036 <sup>a,b</sup>	0,662 $\pm$ 0,097 <sup>b</sup>
Adhesividad (J)	1,451 $\pm$ 0,331	1,516 $\pm$ 0,603	0,957 $\pm$ 0,397	1,610 $\pm$ 0,484	1,579 $\pm$ 0,426

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E1 y E1L: Quesos elaborados con leche adicionada de 2,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente. E2 y E2L: Quesos elaborados con leche adicionada de 4,8 % p/v de LPD, sin y con lavado de la cuajada.

<sup>a,b,c</sup> Los valores con diferentes superíndices en una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Influencia del agregado de PSM en la elaboración y perfiles de maduración de queso Cremoso

#### 4.3.1. Composición y pH de la leche de elaboración

El ingrediente de PSM utilizado para el enriquecimiento proteico fue el mismo que se utilizó para la experiencia en Optigraph, su composición se muestra en la sección 4.5.1. del Capítulo 3. El agregado de 2,25 % p/v de PSM a la leche de elaboración incrementó significativamente los niveles de proteína, lactosa y sólidos totales de la leche, mientras que el nivel de materia grasa se mantuvo sin modificaciones como se muestra en la Tabla 32. De todas maneras, se debe tener en cuenta que el nivel de proteína aumentado (~1 % p/v) en la leche de elaboración corresponde a proteínas de suero únicamente, a diferencia de las experiencias anteriores.

**Tabla 32.** Composición global y pH de la leche control y adicionada de PSM utilizada en la elaboración de los quesos Cremoso miniatura. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración

Leche	pH	Grasa (%p/v)	Proteína (%p/v)	Lactosa (%p/v)	Sólidos totales no grasos (%p/v)	Sólidos totales (%p/v)
Control	6,65 $\pm$ 0,05	3,88 $\pm$ 0,08	3,47 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	4,92 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	9,16 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	12,95 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
E	6,60 $\pm$ 0,05	3,85 $\pm$ 0,13	4,43 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	5,70 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	11,06 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	14,76 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>

Control: Leche sin adición de PSM. E: Leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM.

<sup>a,b</sup> Los valores con diferentes superíndices en una misma columna difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).



### 4.3.2. Composición global y pH de los quesos y sueros, y rendimiento quesero

La composición global y el pH de los quesos elaborados se presentan en la Tabla 33. Los quesos experimentales fueron significativamente diferentes de los controles en cuanto al pH y a la composición global, mientras que no hubo diferencias significativas entre los quesos experimentales con y sin lavado. Todos los quesos tuvieron un nivel de humedad mayor al 55 %, por lo que serían considerados quesos de muy alta humedad según la legislación vigente (CAA, 2006); en los quesos control la humedad estuvo en este límite mientras que en los quesos experimentales, la humedad fue un 5 % mayor. Las PSM actúan como material de relleno inerte en la red de la cuajada, de forma similar a los glóbulos de grasa; asimismo, se postula que estas partículas bloquean los poros, dificultando la expulsión del suero durante el tratamiento de la cuajada por lo que dan como resultado un mayor contenido de humedad en los granos de cuajada (Hinrichs, 2001). Además, las proteínas de suero desnaturalizadas presentan una gran capacidad de retención de agua, que permite aumentar la humedad en el queso y por lo tanto suavizar la textura, sobre todo en quesos bajos en grasa (Steffl et al., 1999).

**Tabla 33.** Composición global, pH y peso de los quesos Cremosos miniatura elaborados a partir de leche control y adicionada de PSM a los 30 días de maduración, y composición, pH y volumen de los sueros de cada elaboración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Queso	Control	E	EL
pH	5,38 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	5,25 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	5,25 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
Humedad (% p/p)	55,16 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	60,10 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	59,63 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>
Proteína (% p/p)	17,05 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	16,37 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	16,83 $\pm$ 0,60 <sup>a,b</sup>
Grasa (% p/p)	25,58 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	19,97 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	20,33 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>
Peso (g)	304 $\pm$ 7 <sup>b</sup>	381 $\pm$ 71 <sup>a</sup>	366 $\pm$ 10 <sup>a</sup>
Rendimiento (%)†	15,2 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	23,8 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	22,9 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
Recuperación proteína (%)	74,6 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	70,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	69,9 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
Recuperación sólidos totales (%)	52,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	51,5 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	50,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
Suero			
pH	6,40 $\pm$ 0,05	6,35 $\pm$ 0,09	6,44 $\pm$ 0,06
Grasa (% p/v)	0,47 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,46 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
Proteína (% p/v)	1,12 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	1,51 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	1,28 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Lactosa (% p/v)	5,09 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	5,94 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	4,43 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
Sólidos totales no grasos (% p/v)	6,49 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	7,93 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	5,91 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
Sólidos totales (% p/v)	7,31 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	8,24 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	6,88 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>
Volumen (mL)	1655 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	1562 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	1605 $\pm$ 45 <sup>a,b</sup>

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E y EL: Queso elaborado con leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente.

<sup>a,b,c</sup> Los valores con diferentes superíndices en una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Di Cagno et al. (2014) elaboraron quesos tipo Caciotta con leche entera, leche descremada (0,3 % p/v de materia grasa) y leche descremada adicionada de 0,5 % p/v de PSM; estos autores encontraron que la adición de PSM incrementó significativamente la retención de humedad del queso con respecto al control. En la misma línea, Punidadas et al. (1999) encontraron que la humedad de los quesos Mozzarella elaborados con proteínas de suero fue mayor que sus respectivos controles. Sturaro et al. (2015) informaron una diferencia significativa para la humedad del queso Caciotta elaborado con 3,0 o 4,0 % de PSM en variedades con contenido normal o disminuido de grasa. Un menor contenido de grasa en los quesos elaborados con adición de PSM fue atribuido a una mayor pérdida de grasa en el suero, debido a una mayor porosidad de la cuajada que contiene partículas de proteína de suero de diferente tamaño (Punidadas et al., 1999). En nuestra experiencia, encontramos que la adición de PSM hizo que la cuajada aumente la afinidad por el agua incrementando la humedad de los quesos experimentales. El menor contenido de grasa en éstos no estuvo asociado a mayores pérdidas en el suero ya que el nivel de grasa fue similar; es probable que esto se deba a la diferencia de humedad entre los quesos. En relación a las proteínas, también estuvieron en menores niveles en los quesos experimentales, aunque la diferencia fue menos marcada que para la materia grasa. En este caso se contraponen dos efectos, la disminución relativa por el alto contenido de agua y el aumento de las proteínas agregadas que se retienen en la cuajada.

Con respecto al pH, se observó una disminución significativa para los quesos experimentales con respecto al control; de todas maneras, ambos valores están dentro del rango esperado para este tipo de quesos. Una disminución en el pH por la incorporación de PSM fue también encontrada por Di Cagno et al. (2014) en quesos Caciotta. El contenido de humedad del queso tiene un impacto importante en la actividad microbiana (Hayaloglu, 2016); el mayor nivel de humedad en los quesos experimentales podría haber favorecido la actividad acidificante del starter.

El rendimiento quesero fue mayor ( $p < 0,05$ ) para los quesos experimentales y esto puede deberse al mayor contenido de humedad de estos quesos (Tabla 33). Como fue mencionado previamente, la adición de PSM desnaturalizadas promueve una mayor retención de agua y obstruye el drenaje del suero, lo que conlleva a un aumento en el rendimiento quesero (Masotti et al., 2017). Una relación directa entre el grado de desnaturalización de las proteínas de suero del polvo adicionado y la retención de las mismas en el queso fue verificada por Hinrichs (2001). La recuperación de proteínas y sólidos totales disminuyó en los quesos experimentales de esta experiencia, lo que puede indicar que una parte de las PSM adicionadas no se incorporó a la cuajada y se perdió en el suero.

Se observaron mayores niveles de proteínas en el suero proveniente de los quesos experimentales, mientras que un mayor nivel de lactosa fue observado solamente en el suero del

queso E debido al incremento de estos compuestos en la fase acuosa por el agregado de las PSM; el efecto fue menor en los quesos con lavado debido a la dilución del suero durante esta etapa. El volumen de suero estuvo en el mismo rango para todos los quesos, presentando un nivel menor en el queso E.

### 4.3.3. Recuentos microbiológicos

En la Tabla 34 se presentan los valores de los recuentos microbiológicos de los quesos Cremoso miniatura a los 30 días de maduración. Los recuentos de las bacterias lácticas totales tuvieron valores similares a los informados en las experiencias anteriores de este capítulo (~9,5 log UFC/g de queso). Esto confirma que la diferente composición de la leche de elaboración no influyó en el crecimiento y desarrollo del fermento primario. En cuanto a las NSLAB, se encontraron en bajos niveles (< 2 log UFC/g de queso) y no hubo diferencia entre los distintos quesos. Si bien la incorporación de PSM aumenta el contenido de lactosa, que puede ser utilizado como principal nutriente por parte de los microorganismos adventicios, éste no fue un factor que influyó en su crecimiento.

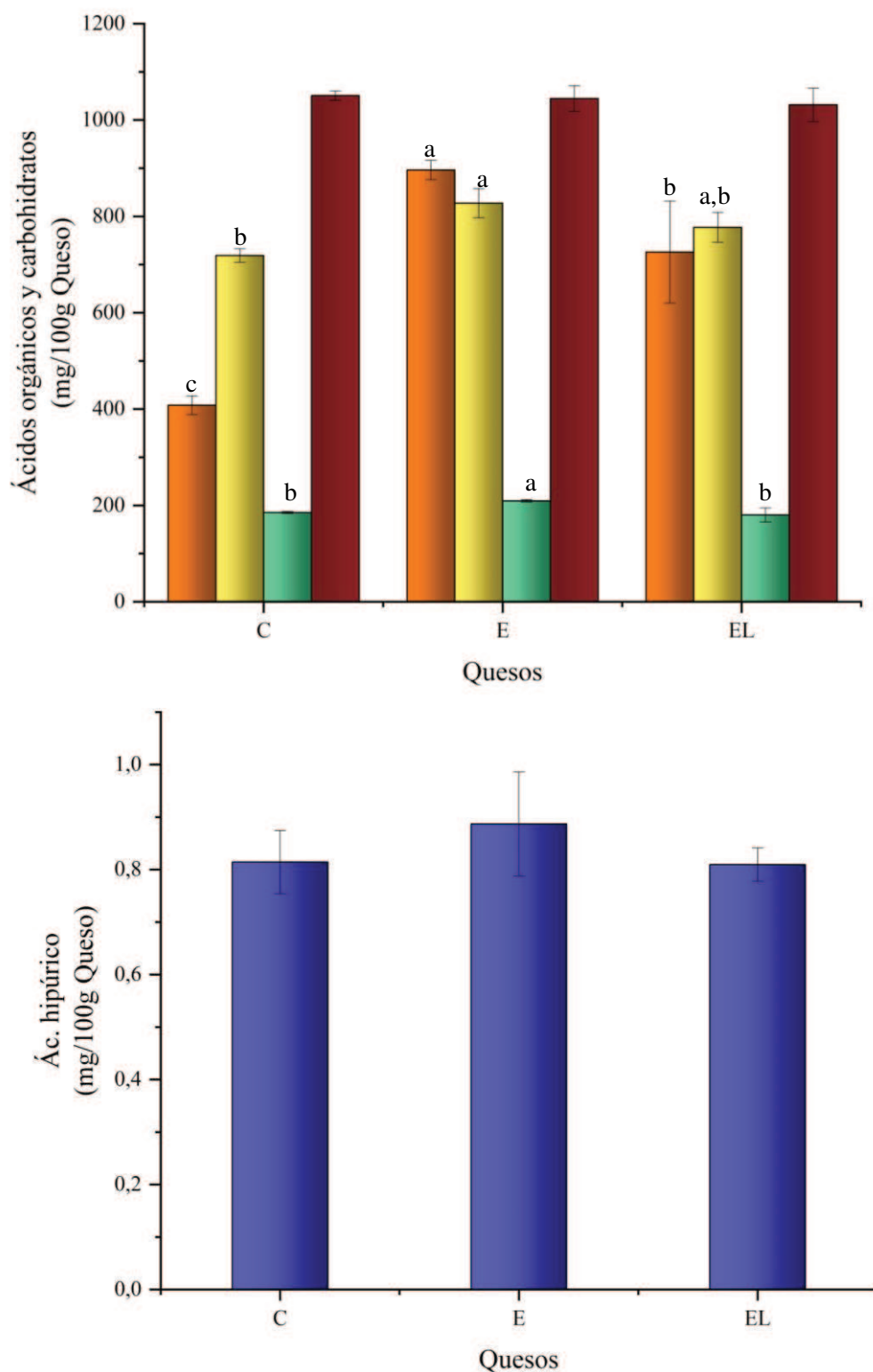
**Tabla 34.** Recuentos de bacterias lácticas totales y NSLAB (log UFC/g) en los quesos Cremoso miniatura elaborados a partir de leche control y adicionada de PSM a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Parámetros	Quesos		
	Control	E	EL
Bacterias lácticas totales (log UFC/g)	9,52 $\pm$ 0,07	9,54 $\pm$ 0,07	9,53 $\pm$ 0,08
NSLAB (log UFC/g)	<2	<2	<2

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E y EL: Queso elaborado con leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente.

### 4.3.4. Carbohidratos y ácidos orgánicos

Los niveles de los ácidos orgánicos y carbohidratos detectados en los quesos Cremoso miniatura con adición de PSM se presentan en la Figura 57. Se cuantificaron tres ácidos orgánicos: ácido láctico, ácido cítrico y ácido hipúrico, en orden decreciente de concentración. Sólo se encontraron diferencias significativas en los niveles de ácido cítrico, siendo el queso experimental sin lavado el que se diferenció de los otros dos presentando un nivel mayor; el polvo adicionado puede haber aportado también un cierto nivel de este ácido.



**Figura 57.** Niveles de carbohidratos (■, lactosa; ■, galactosa) y ácidos (■, cítrico; ■, láctico) (A), ácido hipúrico (■) (B), en quesos Cremoso miniatura elaborado a partir de leche control y adicionada de PSM a los 30 días de maduración. Los niveles (mg/100 g de queso) se presentan como el promedio ± desviación estándar de tres réplicas de quesos. Barras para el mismo compuesto con diferente letra, difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E y EL: Queso elaborado con leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente.

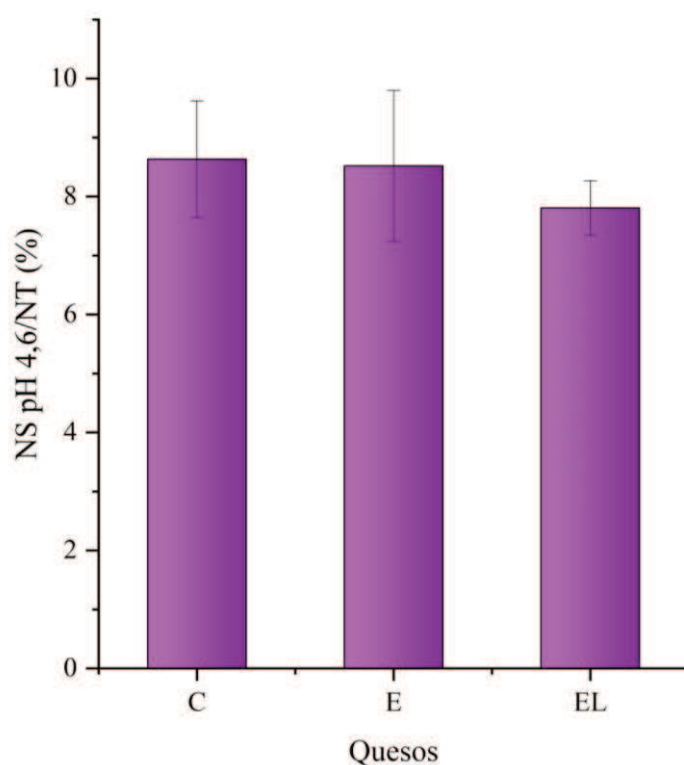
El nivel de lactosa fue mayor para los quesos experimentales, como era de esperar por el agregado del polvo; sin embargo, esto no impactó en los niveles de ácido láctico, pero sí se vio una reducción del pH de los quesos experimentales al finalizar la maduración. El lavado de la cuajada permitió disminuir significativamente el nivel de lactosa del queso, aunque los niveles igualmente se encuentran por encima del doble de lo encontrado en el queso control. La concentración de galactosa fue superior para los quesos experimentales que para el control; sin embargo, sólo fue significativa para el queso E, pero no para el EL, probablemente debido a una disminución de la misma en éste último por el lavado. Osaili et al. (2010) elaboraron quesos Mozzarella de baja humedad sin lavado y con distintos niveles de lavado (10, 25 y 50 %). Los niveles de galactosa de los quesos con lavado del 25 % y el 50 % fueron inferiores ( $p \geq 0,05$ ) en comparación con el 10 % y el control.

#### 4.3.5. Estudio de la proteólisis

El contenido de NS a pH 4,6 como proporción del nitrógeno total fue similar entre los tratamientos (Figura 58), lo que sugiere que la adición de PSM no alteró significativamente la proteólisis primaria. De manera similar, otros autores informaron que la adición de PSM no afectó significativamente la proteólisis (Schenkel et al., 2013; Stankey et al., 2017). Sin embargo, en un estudio realizado por Zalazar et al. (2002) en queso Cremoso elaborado con leche reducida en materia grasa (1,65 % p/v) y con el agregado de 2 % p/p de Dairy-Lo (producto comercial de proteínas de suero desnaturalizadas, con 35 % de proteína), se encontró que el nivel de NS a pH 4,6 fue significativamente mayor que en el queso control (elaborado sin adición de PSM y con 3 % p/v de materia grasa en la leche de elaboración). Estos resultados fueron atribuidos a la reducción de los sitios hidrofóbicos en la superficie de la caseína, al mayor contenido de humedad de estos quesos o a la cuantificación de las proteínas de suero del polvo adicionado en la fracción de NS pH 4,6 debido a que las mismas son solubles en esta condición.

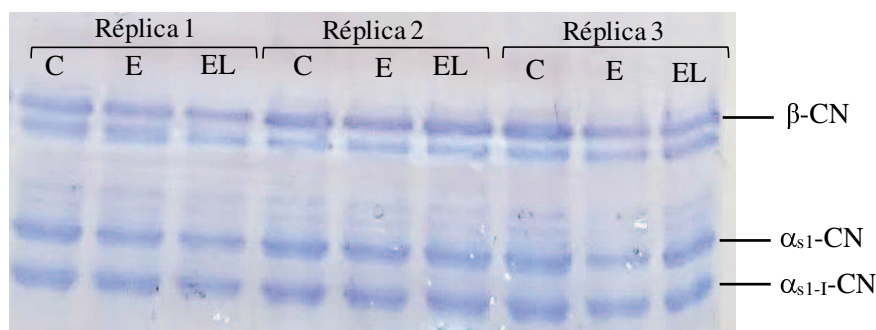
El perfil de electroforesis de la fracción insoluble a pH 4,6 de los quesos Cremoso a los 30 días de maduración se presenta en la Figura 59. Como se mencionó anteriormente, la enzima coagulante es la responsable de la hidrólisis de la caseína  $\alpha_{s1}$  que da como resultado la caseína  $\alpha_{s1-1}$  (Fox, 1988) y la proporción de esta enzima en quesos podría ser mayor si se retiene mayor humedad. La comparación visual de los patrones electroforéticos de quesos control y experimentales no reveló diferencias en el tamaño e intensidad de las distintas bandas, por lo que el agregado de las PSM y el lavado de la cuajada no afectó la proteólisis primaria, resultados que concuerdan con los niveles obtenidos de la fracción soluble a pH 4,6. Di Cagno et al. (2014) obtuvieron resultados similares para los quesos Caciotta bajos en grasa y con adición de PSM. Estos autores atribuyeron esta similitud al alto pH del suero en el drenado y la nula o baja cocción de la cuajada en este tipo de quesos que hizo que la retención de la quimosina y la actividad de la plasmina sean bajas, aún cuando los quesos tuvieron mayor humedad. En la misma línea,

Schenkel et al. (2013) elaboraron quesos Gouda adicionados con 1 % p/p de PSM (Simplese®) con diferentes niveles de materia grasa: alto, reducido y bajo con las siguientes relaciones grasa:proteína de 0,9; 0,5 y 0,1, respectivamente. Estos autores encontraron que no hubo diferencia significativa en la ruptura de la red de paracaseína entre los quesos control y el adicionado de PSM respectivo mediante el análisis del nitrógeno soluble en agua. De manera similar, Stankey et al. (2017) informaron que a pesar del mayor contenido de humedad en los quesos Cheddar reducidos en materia grasa elaborados con 0,50 % de PSM (Nutrilac® CH-4560), no hubo diferencia en la proteólisis cuantificada mediante el nitrógeno soluble en TCA y lo atribuyeron a que las PSM no son hidrolizadas por las proteasas derivadas del coagulante o del cultivo iniciador, de esta manera permanecen estables a lo largo de la maduración.



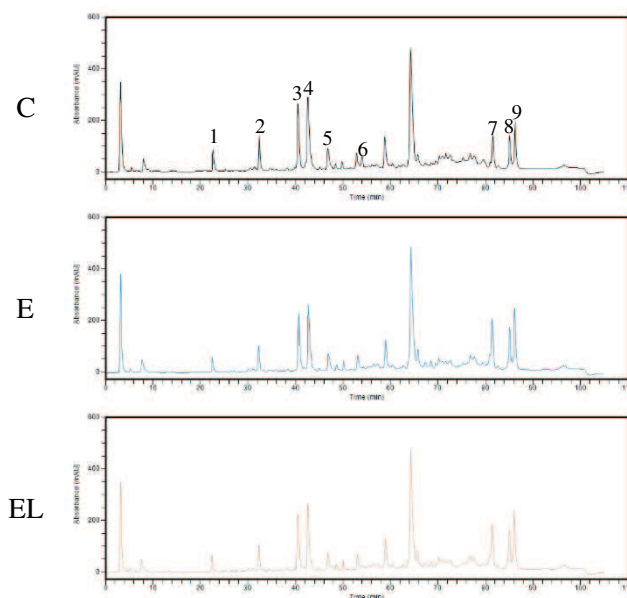
**Figura 58.** Contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS), expresado como proporción (%) del nitrógeno total (NT), en los quesos Cremoso miniatura elaborados a partir de leche control y adicionada de PSM a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E y EL: Queso elaborado con leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente.



**Figura 59.** Perfiles electroforéticos de la fracción insoluble a pH 4,6 del triplicado de elaboraciones de los quesos Cremoso con y sin PSM adicionadas, a los 30 días de maduración. Control: Queso elaborado de forma tradicional. E y EL: Queso elaborado con leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente.

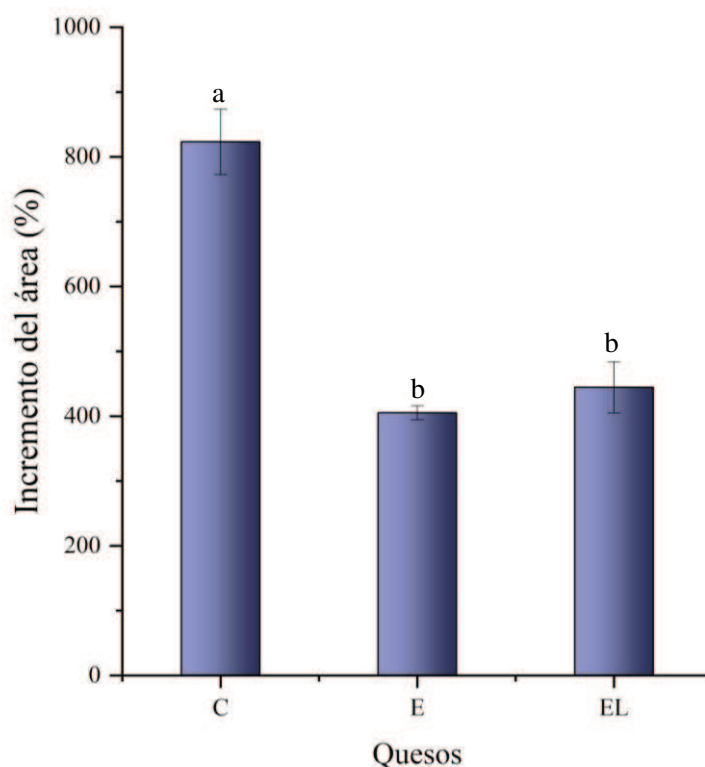
En la Figura 60 se muestran los perfiles peptídicos de las tres tandas de elaboración de los quesos Cremoso miniatura con y sin incorporación de PSM a los 30 días de maduración. Los resultados de los perfiles concuerdan con lo encontrado en los índices de proteólisis descritos anteriormente, ya que no se observaron grandes diferencias entre los quesos. Algunas mínimas diferencias se observaron en los picos 1, 2, 3, 4 y 5 que fueron menores en los quesos experimentales, como también en el pico 6 que sólo aparece en los quesos control. Los picos 7, 8 y 9, pertenecientes a las proteínas de suero, se vieron aumentados en los quesos experimentales, lo que demuestra una mayor retención de estas proteínas en la cuajada del queso por el agregado del polvo.



**Figura 60.** Perfiles peptídicos obtenidos por RP-HPLC de los quesos Cremoso elaborados a partir de leche control y adicionada de PSM a los 30 días de maduración. Control: Queso elaborado de forma tradicional. E y EL: Queso elaborado con leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente.

### 4.3.6. Capacidad de fusión

Se encontraron diferencias significativas en la capacidad de fusión de los quesos elaborados con leche adicionada de PSM (Figura 61). Los valores obtenidos del incremento del área del cilindro del queso luego del calentamiento fueron el doble para el queso control con respecto a los experimentales. Hay que tener en cuenta que el pH y el contenido de materia grasa (si bien no fue un queso reducido en grasa) de los quesos experimentales fue significativamente menor que el control, mientras que el contenido de humedad fue mayor; parámetros que influyen sobre la capacidad de fusión. Mercanti et al. (2004) abordaron esta temática estudiando el efecto de diferentes parámetros sobre la capacidad de fusión del queso Cremoso y encontraron que tanto el contenido graso como el grado de maduración afectaron positivamente dicha capacidad. Además, observaron que la incorporación de proteínas de suero produjo una disminución pronunciada en la capacidad de fusión, al igual que lo observado en el presente trabajo.



**Figura 61.** Incremento porcentual del área de un cilindro de queso sometido a calentamiento en estufa de los quesos elaborados a partir de leche control y adicionada de PSM a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración. Barras para el mismo compuesto con diferente letra, difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E y EL: Queso elaborado con leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente.

Al calentar el queso se observan fácilmente cambios interrelacionados: derretimiento, flujo, ablandamiento y estiramiento. Estos cambios pueden ocurrir en algunos quesos a temperaturas relativamente bajas (Camembert muy maduro), pero es común que se observen a temperaturas  $> 40$  °C. La materia grasa es el único componente sólido en el queso que realmente se derrite a las

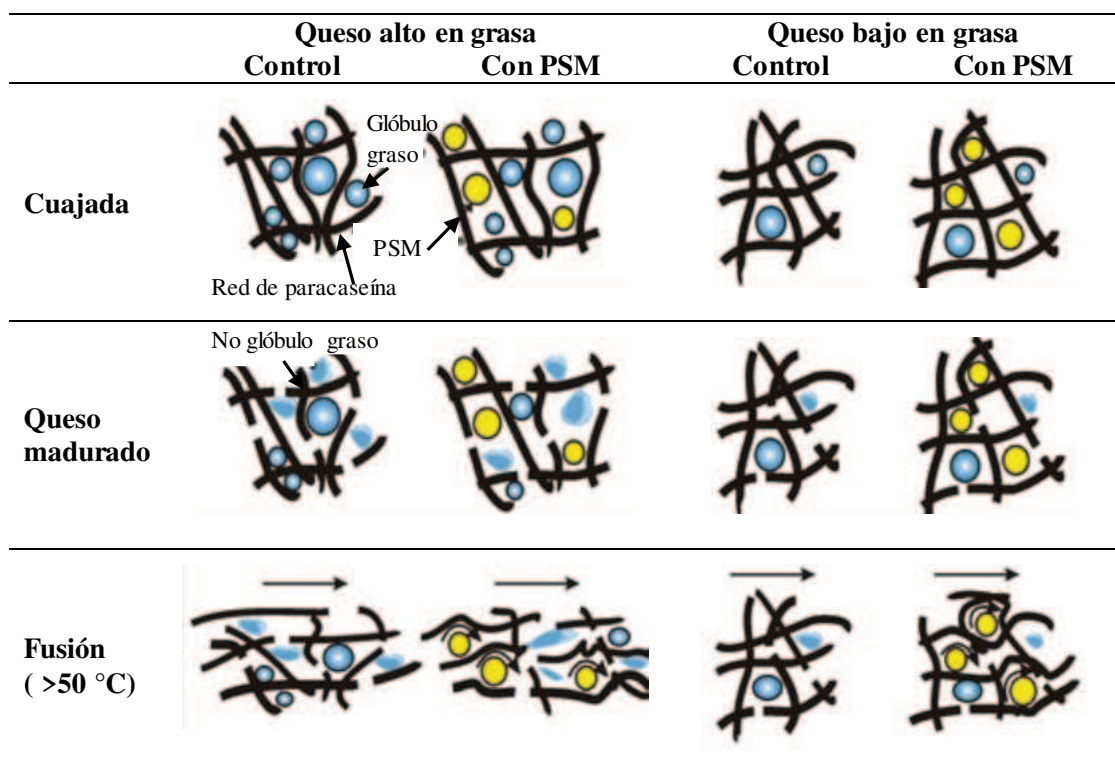


temperaturas de preparación de alimentos (horno para pizza, por ejemplo). El glóbulo de grasa está compuesto por diferentes tipos de triglicéridos, cada uno con su temperatura de fusión específica, pero, en general, está completamente líquida alrededor de 40 °C (Walstra & Jenness, 1984), mientras que las proteínas (caseínas y proteínas de suero) no se derriten, pero sí pueden cambiar sus interacciones para producir el efecto de derretimiento (capacidad del queso para fluir, esparcirse, así como la pérdida visual de integridad de las piezas de queso individuales) (Lucey et al., 2003).

Ahora bien, cuando se reduce la grasa, aumenta el número de interacciones caseína-caseína, mientras que al añadir proteínas de suero, éstas contrarrestan ese efecto porque se comportan de forma similar a los glóbulos grasos (relleno inerte) y disminuyen las interacciones dentro de la matriz tridimensional caseínica, con la diferencia de que no se derriten al calentarse (Ipsen, 2017; Schenkel et al., 2013). Estas partículas de proteínas de suero permanecen como una masa esférica, aumentando la irregularidad de la red proteica (Figura 62).

Stankey et al. (2017) elaboraron quesos Cheddar bajos en grasa con PSM y encontraron que aquellos elaborados con 0,35 o 0,50 % de PSM eran menos fundibles que los quesos control o con 0,15 % de PSM. Schädle et al. (2020) estudiaron las propiedades de quesos procesados reducidos en grasa con la adición de PSM e informaron que, dependiendo del nivel de PSM adicionadas, el valor de fluidez de los quesos cambiaba: de 3 a 4 % de PSM el valor disminuyó, mientras que aumentó para 5 y 7 % de PSM. En contraposición, Schenkel et al. (2013) informaron que el derretimiento de los quesos disminuyó con el contenido de grasa, mientras que la adición de PSM mejoró el derretimiento para todos los niveles de grasa; además el queso elaborado con una reducción de materia grasa y la adición de PSM mostró un comportamiento similar al queso alto en grasa sin PSM. Por otro lado, Zalazar et al. (2002) encontraron un comportamiento similar ( $p \geq 0,05$ ) entre los quesos control con contenido normal de materia grasa y aquellos reducidos en materia grasa con y sin adición de PSM, los cuales tenían un mayor nivel de humedad; los autores postularon que la capacidad de fusión de quesos bajos en grasa se conserva cuando la reducción de grasa se acompaña de un mayor nivel de humedad.

Como se ha mencionado anteriormente, los quesos Cremoso son muy utilizados en la preparación de distintos tipos de alimentos procesados por medio del calor como las pizzas y distintos tipos de rellenos. Para que estas preparaciones puedan presentar una buena calidad es necesario que el queso que se utilice presente características de fusión adecuadas. En este ensayo observamos que las PSM, adicionadas en un nivel de 2,25% p/v, afectaron esta propiedad importante del queso Cremoso por lo que no serviría como queso para fundir. Por otro lado, al igual que lo observado en la experiencia anterior, el color del queso luego del calentamiento no presentó diferencias, a pesar de los distintos niveles de azúcares residuales que tenían.



**Figura 62.** Esquema de la estructura y la capacidad de fusión del queso según el contenido de grasa (azul), y de un relleno inerte agregado (PSM, amarillo) durante la maduración. Figura modificada de Schenkel et al., 2013.

#### 4.3.7. Perfil de textura

Como se observa en la Tabla 35, el queso control presentó una dureza significativamente superior ( $p < 0,05$ ) a los quesos experimentales, en el orden de 2,2 y 2,7 veces en relación a los quesos E y EL, respectivamente; mientras que la dureza fue similar entre los quesos experimentales. Cabe destacar que estos últimos perdieron la estructura, aún estando en heladera, lo que fue asociado a su elevado contenido de humedad; sin embargo, a alta temperatura no fundieron tanto como los controles.

Nuevamente como ocurrió en los quesos UF y con agregado de LPD, los niveles de recuperación elástica instantánea y retardada son similares y no hay diferencia entre los tratamientos, por lo que se recuperan fácilmente luego de aplicado el esfuerzo sin sufrir deformación permanente en las condiciones ensayadas. En lo que respecta a masticabilidad y resiliencia, se encontraron diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ). El control presentó valores de masticabilidad 2,3 y 2,9 veces mayor frente a los quesos E y EL, respectivamente, de la misma forma que lo hallado para la dureza ya que estos parámetros están relacionados. Esto indicaría que los quesos experimentales tienen una estructura menos firme donde se debería aplicar una menor fuerza para masticarlos. En cuanto a la resiliencia, el control es 1,5 veces superior a los tratamientos E y EL. Para la cohesividad y la adhesividad no se encontraron diferencias significativas entre las muestras ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabla 35.** Resultados del análisis de textura de los quesos Cremoso miniatura elaborados a partir de leche control y adicionada de PSM a los 30 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración.

Parámetros	Quesos		
	Control	E	EL
Dureza (N)	3,528 $\pm$ 0,265 <sup>a</sup>	1,636 $\pm$ 0,176 <sup>b</sup>	1,315 $\pm$ 0,255 <sup>b</sup>
IREI	0,400 $\pm$ 0,041	0,404 $\pm$ 0,083	0,427 $\pm$ 0,005
IRER	0,376 $\pm$ 0,016	0,354 $\pm$ 0,079	0,362 $\pm$ 0,005
Cohesividad	0,712 $\pm$ 0,021	0,728 $\pm$ 0,088	0,687 $\pm$ 0,021
Resiliencia	0,350 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,236 $\pm$ 0,044 <sup>b</sup>	0,247 $\pm$ 0,042 <sup>b</sup>
Masticabilidad (N)	0,945 $\pm$ 0,098 <sup>a</sup>	0,419 $\pm$ 0,118 <sup>b</sup>	0,327 $\pm$ 0,066 <sup>b</sup>
Adhesividad (J)	1,524 $\pm$ 0,447	1,183 $\pm$ 0,163	0,958 $\pm$ 0,262

Control: Queso elaborado de forma tradicional. E y EL: Queso elaborado con leche adicionada de 2,25 % p/v de PSM, sin y con lavado de la cuajada, respectivamente.

<sup>a,b</sup> Los valores con diferentes superíndices en una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Koca & Metin (2004) elaboraron quesos bajos en grasa utilizando 1 % p/p de distintos productos de proteínas de suero y los compararon con quesos control con y sin reducción en el contenido de materia grasa. En el estudio textural llevado adelante encontraron que el queso control alto en grasa fue el más blando de todos, seguido por el queso reducido en grasa con adición de PSM y por último el queso control reducido en grasa sin adición de éstas. El contenido de materia grasa interfiere en la matriz proteica ya que actúa como lubricante para proporcionar suavidad y una textura más blanda (Romeih et al., 2002). Por ello, cuando se reduce o elimina la materia grasa, la caseína juega un papel fundamental en el desarrollo de la textura durante la maduración del queso (Lucey et al., 2003; Mistry & Kasperson, 1998); por este motivo, los quesos con menor contenido de grasa son más duros debido a su alto contenido de proteína. Sin embargo, otros autores informaron que la adición de 1 % p/p de PSM (53 % p/p proteína) a la leche de elaboración con distinta relación materia grasa:proteína (0,9; 0,5 y 0,1) redujo los parámetros texturales (dureza, gomosidad, cohesión, elasticidad) en comparación con el queso control correspondiente (con misma relación materia grasa: proteína pero sin adición de PSM), encontrando mayores diferencias para los quesos bajos en grasa, aún teniendo contenidos de humedad similares entre sus correspondientes controles (Schenkel et al., 2013). Estos autores atribuyeron esta diferencia al papel de las PSM en la matriz del queso ya que actúan como un relleno inerte que altera la red de paracaseína generando puntos débiles, reduciendo así la dureza. Las discrepancias entre los distintos estudios pueden deberse a diferencias en las características de las micropartículas adicionadas (formas de obtención, dispersión, conformación de agregados, composición), nivel agregado a la leche de elaboración, tratamiento térmico, condiciones de elaboración y composición final del queso (pH, contenido de calcio y grasa), como también condiciones de maduración. Esto resalta la importancia del estudio de estas intervenciones en

cada variedad de queso en particular para conocer con certeza su impacto en las características del mismo.

## 5. Conclusiones

En el presente capítulo demostramos que el uso de diferentes estrategias para aumentar el nivel proteico de la leche de quesería para la elaboración de queso Cremoso permitió obtener un rendimiento quesero significativamente mayor. Algunas intervenciones produjeron modificaciones en ciertas propiedades de los quesos pero, en general, los quesos obtenidos con leche UF y adicionada de LPD fueron similares a los tradicionales, mientras que aquellos adicionados de PSM presentaron algunas diferencias marcadas.

En particular, el uso de leche UF no produjo un retardo en la maduración, pero tuvo un impacto significativo en la textura de los quesos, resultando más duros los que tenían la mayor dosis de coagulante. En base a los resultados obtenidos, para la elaboración de quesos UF sería recomendable utilizar una dosis de coagulante por volumen y no agregar calcio, lo que permite disminuir los costos y obtener quesos similares al control.

Por otro lado, la incorporación de LPD a dos niveles en la leche de elaboración permitió obtener quesos con características generales similares al control, pudiendo utilizarse cualquiera de los dos niveles de polvos adicionados. El lavado de la cuajada, si bien disminuyó un poco el nivel de lactosa, no demostró ser imprescindible para obtener quesos de buena calidad. Asimismo, el lavado, además de agregar una etapa más al proceso de elaboración, puede generar problemas adicionales por el incremento del volumen de suero para su tratamiento.

Finalmente, la incorporación de PSM proporciona una alternativa para obtener quesos con un mayor rendimiento, mayor humedad y un contenido disminuido de materia grasa, lo que presenta grandes oportunidades para este tipo de producto. Sin embargo, los quesos mostraron cambios significativos en la fusión, una propiedad importante de la variedad Cremoso, y en la textura. En este sentido, pueden proponerse estudios sensoriales para dimensionar el impacto de estas diferencias en la aceptación y, de ser necesario, emprender nuevas formulaciones.

---

Influencia de cultivos adjuntos y del enriquecimiento en  
proteínas en la maduración de quesos Cremoso

## 1. Introducción

Los fermentos adjuntos o de afinado se han difundido ampliamente en la industria quesera en las últimas dos décadas, ya sea como cultivos secundarios o incluidos en las formulaciones del fermento primario. El objetivo de esta innovación es la mejora de la calidad de quesos a través de un mejor control de la microbiota y la bioquímica de la maduración (Burns et al., 2012; Johnston et al., 2010; Katsiari et al., 2002; Merchán et al., 2022). Los cultivos adjuntos generalmente están constituidos por lactobacilos mesófilos de origen no fermento, aislados de quesos de buena calidad y cuyas propiedades bioquímicas y tecnológicas han sido adecuadamente caracterizadas (Johnston et al., 2010). Como se ha mencionado en otras secciones de esta tesis, de los fermentos adjuntos se espera que prosperen en el queso evitando la proliferación de NSLAB adventicias y potencialmente perjudiciales, que no produzcan ningún defecto y que, en lo posible, también aporten positivamente al flavour y la calidad del producto final (Broadbent et al., 2011). La influencia de las NSLAB y fermentos adjuntos durante la maduración de quesos depende de sus actividades enzimáticas específicas (Yvon, 2006).

Como se mencionó anteriormente, el agregado de polvos lácteos a la leche de elaboración es una estrategia utilizada para estandarizar el nivel proteico y/o aportar propiedades tecnofuncionales como la mejora de la textura y la retención de agua. También es una práctica posible para destinar leche en polvo de acuerdo con las fluctuaciones del precio y el mercado, en industrias que producen tanto quesos como leche en polvo. Sin embargo, esta práctica incrementa la cantidad de sustratos fermentables como lactosa y citrato, que podrían ser utilizados tanto por los fermentos incorporados al queso como por la biota adventicia. A su vez, el incremento del nivel de proteínas ocasiona cambios en las propiedades de coagulación (Guinee et al., 1997) que se deben tener en cuenta para ajustar el protocolo de elaboración. Estos efectos en las etapas de elaboración sin duda tienen su correlato en los perfiles de maduración y, si no se controlan adecuadamente, pueden derivar en la aparición de defectos de textura o sabor.

La maduración del queso es un proceso muy complejo que involucra cambios microbiológicos, bioquímicos y físicos que dan como resultado el sabor y la textura típicos de cada tipo de queso, que dependen principalmente de la composición de la leche, la microbiota (cultivo iniciador, adjuntos y microorganismos adventicios), la tecnología de elaboración y la composición del queso resultante, y de las condiciones y duración de la maduración (McSweeney, 2011). Las enzimas microbianas juegan un papel clave durante la maduración porque metabolizan los carbohidratos, proteínas y lípidos presentes en la leche produciendo diferentes compuestos que impactan en el sabor y aroma del queso (Smit et al., 2005; Yvon, 2006). De esta forma, el uso de cultivos adjuntos, seleccionados en base a sus habilidades enzimáticas específicas, se ha propuesto como una estrategia para acelerar la maduración del queso, mejorar su calidad y/o incrementar/diversificar el desarrollo del sabor y aroma (Crow et al., 2001).

El uso de fermentos adjuntos en quesos de corta maduración como el queso Cremoso se ha propuesto para favorecer la peptidólisis y la formación de compuestos volátiles (Milesi et al., 2008, 2009, 2010). En el caso de enriquecimiento proteico, el incremento de nutrientes y precursores de compuestos de aroma, aportados por los polvos lácteos u otras fuentes de sólidos, como los retentados, podría modificar la producción de compuestos por parte de la microbiota del queso ya sea tradicional o intervenida con cultivos adjuntos (Oh et al., 2014; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2003a).

Para conocer la influencia de las innovaciones tecnológicas en la calidad de los quesos, son importantes tanto los estudios químicos y microbiológicos, como sensoriales. En particular, el análisis sensorial con consumidores es fundamental para conocer el impacto real de las modificaciones estudiadas en la aceptabilidad del producto (Ares et al., 2017; Moskowitz & Hartmann, 2008). La opinión de los consumidores se ha utilizado para obtener una descripción sensorial del alimento propuesto y juicios hedónicos. Estos últimos permiten identificar las características sensoriales clave, para luego indagar en información útil para la formulación de productos (Ares et al., 2017; Moskowitz & Hartmann, 2008). De esta manera, una mejor comprensión de la preferencia del consumidor le brinda herramientas a la industria quesera para el desarrollo de nuevos productos o la mejora de la calidad.

En el INLAIN se han obtenido y caracterizado varias cepas de fermentos adjuntos. Como se mencionó en el Capítulo 2 sección 3.1.2., la cepa *Lactocaseibacillus paracasei* 90 (Lp90) fue ensayada en modelos de queso y en quesos blandos, semiduros y duros como cultivo fresco o liofilizada (Cuffia, 2016; Milesi et al., 2008, 2010; Peralta et al., 2016a, 2017), mientras que la cepa *Lactobacillus rhamnosus* 73 (Lr73) fue evaluada como cultivo fresco en queso blando y semiduro (Milesi et al., 2008, 2009). Además, estas cepas se han caracterizado en cuanto a su perfil de actividades aminotransferasa y glutamatodeshidrogenasa, las cuales son enzimas clave en el catabolismo de aminoácidos durante la maduración, de los que derivan compuestos volátiles de impacto en el flavour del queso (Peralta et al., 2016b). Recientemente se obtuvieron cultivos liofilizados de estas dos cepas luego de su crecimiento en un medio a base de permeado de suero; ambas cepas alcanzaron altos niveles en este medio, los cuales se mantuvieron luego de la liofilización (Batistela, 2022). Estos fermentos liofilizados se utilizaron en el presente estudio como cultivos adjuntos en queso Cremoso.

La información existente, tanto en la literatura como en los antecedentes de trabajos previos en nuestro laboratorio, dan cuenta de la influencia de los fermentos adjuntos en variedades de queso tradicionales, pero todavía no existen estudios que caractericen la performance de estos fermentos en quesos elaborados con leches enriquecidas en proteínas por el agregado de ingredientes lácteos. Esta investigación es necesaria, dado que los polvos lácteos y otros sólidos

introducen cambios en la composición y en el ambiente que ésta determina en el alimento, para la acción microbiana y enzimática.

## 2. Objetivos

- Determinar el impacto del uso de leche enriquecida con Leche en Polvo Descremada (LPD) y la utilización de fermentos adjuntos en la elaboración, perfiles de maduración y propiedades sensoriales de queso Cremoso.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Cultivos primarios y adjuntos

Para las elaboraciones de quesos se utilizó un fermento liofilizado de *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen, Quilmes, Argentina) como cultivo primario. Además, se utilizaron como cultivos adjuntos dos cepas autóctonas, *Lactocaseibacillus paracasei* 90 (Lp90) y *Lactocaseibacillus rhamnosus* 73 (Lr73), del cepario del INLAIN. Ambas cepas se inocularon a partir de un cultivo overnight (2 % v/v) en un medio formulado a base de permeado de suero que fue previamente optimizado por Batistela (2022). El crecimiento se llevó a cabo en un fermentador de 2L (Sartorius Biostat A plus®, Goettingen, Alemania) durante 24 h a pH controlado (pH 6,5) automáticamente mediante la adición de NaOH 2,3 M. Luego, las células se separaron por centrifugación (13000 × g, 30 min, 4 °C), se lavaron dos veces con un buffer de fosfato de potasio (50 mM, pH 7,0) y se resuspendieron en una solución conteniendo 10 % p/v de maltodextrina y 3 % p/v de sacarosa. Las suspensiones celulares se congelaron a -80 °C y se mantuvieron durante 24 h, luego de lo cual se liofilizaron (Christ Alpha 1–4 LD Plus, Osterode am Harz, Alemania) y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

### 3.2. Elaboraciones de quesos

#### 3.2.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado para estudiar la influencia de dos factores (F) en la elaboración y maduración del queso Cremoso:

**F1-** adición de LPD a la leche de elaboración a dos niveles: 1- sin adición de LPD (queso control C), y 2- con adición de LPD (quesos P); la misma relación grasa/proteína = 1,0 fue utilizada para la leche de elaboración con y sin LPD.

**F2-** adición de una cepa autóctona como cultivo adjunto, a tres niveles: 1- sin adición de cultivo adjunto, 2- con adición de la cepa Lp90 y 3- con adición de la cepa Lr73.

De esta forma, se elaboraron seis tipos de queso Cremoso, denominados como: C, C90, C73, P, P90 y P73 (Tabla 36). Las elaboraciones se realizaron por triplicado.



**Tabla 36.** Diseño experimental de la elaboración de quesos

Factores y niveles		Factor 1 (F1): adición de LPD	
		Sin LPD	Con LPD
<b>Factor 2 (F2):</b>	Sin cultivo adjunto	C	P
<b>Adición de un</b>	Con Lp90	C90	P90
<b>cultivo adjunto</b>	Con Lr73	C73	P73

### 3.2.2. Preparación de la leche de elaboración

La leche cruda para las elaboraciones de quesos fue provista por una planta láctea cercana (Milkaut SA, Santa Fe, Argentina). Para todos los quesos, la leche de elaboración fue estandarizada a una relación de materia grasa/proteína de 1,0.

Para los quesos C, C90 y C73, elaborados con leche control (sin adición de LPD), una porción de leche fue descremada (Alfa Laval Separador Co., Tumba, Suecia) y adicionada al pool total (90 L) para alcanzar la relación requerida. El contenido de grasa y proteína de la leche de partida para estos quesos fue de  $3,33 \pm 0,20$  y  $3,25 \pm 0,08$  % p/p, respectivamente.

Para la elaboración de los quesos P, P90 y P73, se adicionó LPD de bajo tratamiento térmico (La Serenísima, Buenos Aires, Argentina) a la leche de elaboración para incrementar su contenido proteico. La LPD se resuspendió a una concentración de 5,2 % p/v en 90 L de leche cruda utilizando un mezclador sólido-líquido (SIMES, MSL-SAN, 1A-1HP), recirculando la mezcla durante 10 min, que posteriormente se almacenó a 4 °C durante 18 h para permitir una correcta hidratación del polvo. Al día siguiente, la relación grasa/proteína se ajustó a 1,0 mediante la adición de crema (contenido de grasa  $53,3 \pm 1,3$  % p/p). Los niveles de grasa y proteína de la leche enriquecida fueron:  $4,90 \pm 0,16$  y  $4,69 \pm 0,01$  % p/p, respectivamente.

### 3.2.3. Elaboraciones de queso

Cada día se elaboraron seis quesos diferentes a escala piloto (30 L) según el diseño experimental (Tabla 36). La leche de quesería se pasteurizó a 63 °C durante 30 min, y pasado ese tiempo, se enfrió a 37 °C. Luego, se agregó cloruro de calcio (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración final de 0,02 % p/v en la leche y se inoculó el cultivo primario a un nivel de  $10^6$  UFC/mL. Los cultivos adjuntos Lp90 y Lr73 también se inocularon al mismo nivel, solo en la leche de elaboración de los quesos C90-P90 y C73-P73, respectivamente. Los quesos C y P se elaboraron sin cultivos adjuntos. Ambos cultivos liofilizados (primario y adjunto) se resuspendieron en leche pasteurizada (50 mL) y se mantuvieron durante 10 min a 37 °C antes de agregarlos a la leche de elaboración. Luego de su agregado a la tina y de transcurridos 15 min, se añadió la enzima coagulante (ChyMax, Chr. Hansen, Argentina, 74 IMCU/mL) en una dosis de 34 IMCU/L. Cuando la cuajada alcanzó la firmeza adecuada, se cortó (con agitación manual) en cubos de 1 cm<sup>3</sup>. Luego se separó la cuajada del suero, se colocó en moldes microperforados y posteriormente se llevó a cámara caliente (38-39 °C) para contribuir a la acidificación hasta pH

5,4. Posteriormente, los quesos (4 kg aprox.) fueron salados por inmersión en salmuera (20 % p/v, pH 5,4) a 4 °C y madurados a 4 °C durante 60 días. Los quesos fueron envasadas al vacío luego de 5 días de elaboración.

### **3.3. Determinaciones analíticas**

#### **3.3.1. Análisis de composición global, pH, rendimiento quesero y recuperación**

La composición global se determinó a los 12 días de maduración mediante metodologías estandarizadas como se mencionó en el Capítulo 1 sección 3.4.3. El pH se midió a los 12, 30 y 60 días de maduración (Capítulo 1 sección 3.4.2.). El rendimiento quesero y la recuperación de proteína y sólidos totales se calculó como se menciona en el Capítulo 4 sección 3.4.1. para quesos miniatura.

#### **3.3.2. Análisis microbiológicos**

Se realizaron recuentos en placa a los 12, 30 y 60 días de maduración para el análisis microbiológico de los quesos. Los recuentos del fermento primario, coliformes y de los lactobacilos mesófilos (adventicios en quesos controles y adjuntos en quesos experimentales) en los quesos se realizaron como se mencionó en el Capítulo 2 sección 3.3.2.

#### **3.3.3. Evaluación de la proteólisis**

La proteólisis se determinó en muestras de queso a los 12, 30 y 60 días de maduración. La proteólisis primaria se determinó cuantificando el contenido de nitrógeno de la fracción soluble a pH 4,6 por el método Kjeldahl como se mencionó en el Capítulo 1 sección 3.4.5. Además, los perfiles de péptidos se analizaron mediante HPLC de fase reversa como se mencionó en el Capítulo 2, sección 3.3.5.

#### **3.3.4. Perfil de textura y capacidad de fusión**

La capacidad de fusión y el perfil de textura de las muestras de queso se analizó a los 30 y 60 días de maduración como se detalla en el capítulo 4 sección 3.3.6 y 3.3.7.

#### **3.3.5. Ácidos orgánicos y carbohidratos**

Los ácidos orgánicos y los carbohidratos se determinaron por HPLC como se explicó en el Capítulo 1 sección 3.4.4.

#### **3.3.6. Compuestos volátiles**

El análisis de compuestos volátiles se realizó como se detalla en el Capítulo 2 sección 3.3.6.

### **3.4. Análisis sensorial basado en consumidores**

Un total de 107 consumidores fueron reclutados de la base de datos de consumidores del Departamento de Análisis Sensorial de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) en función del nivel de consumo de quesos (al menos dos veces por semana) y de la disponibilidad e interés en participar. Los participantes tenían entre 18 y 65 años y el porcentaje de mujeres participantes fue del 60%. Los consumidores no recibieron ninguna información adicional sobre las muestras antes de la degustación y dieron su consentimiento informado por escrito. Las pruebas se realizaron en cabinas sensoriales individuales, diseñadas de acuerdo con la norma ISO 8589 (2007), las cuales contaban con luz artificial (iluminación tipo luz de día) en un ambiente con temperatura controlada (entre 22 y 24 °C) y circulación de aire. Las muestras se entregaron a los consumidores en porciones de 30 g y se codificaron con números aleatorios de 3 dígitos. El orden en que los consumidores probaron los quesos fue aleatorio para lograr un correcto equilibrio en las presentaciones y minimizar cualquier sesgo sensorial. Se les entregó también agua mineral para enjuagar la boca entre muestra y muestra. Los participantes evaluaron las muestras de queso utilizando una escala hedónica de aceptabilidad y una pregunta CATA (Check All That Apply; marque todo lo que corresponda) (en este orden). Finalmente, para vincular la información de la pregunta CATA con la aceptabilidad, se realizó un análisis de penalización.

#### **3.4.1. Aceptabilidad**

Para este análisis se estableció una escala hedónica horizontal de 9 puntos en la que los consumidores tenían que calificar cada muestra marcando la puntuación sobre la escala proporcionada, donde 9 = me gusta muchísimo, 8 = me gusta mucho, 7 = me gusta moderadamente, 6 = me gusta un poco, 5 = ni me gusta ni me disgusta, 4 = me desagrada levemente, 3 = me desagrada moderadamente, 2 = me disgusta mucho, y 1 = me disgusta extremadamente (Ares et al., 2017). Las categorías verbales de la escala se seleccionaron de manera que la distancia psicológica entre puntos sucesivos de la escala sea igual (Wichchukit & O'Mahony, 2015).

#### **3.4.2. CATA**

La metodología basada en preguntas “marque todo lo que corresponda” (check-all-that-apply, CATA) es un método rápido, adaptable y simple para obtener información acerca de la percepción de los consumidores. Consiste básicamente en una pregunta de múltiple opción en la que el consumidor puede seleccionar de una lista de términos todas aquellas que considere oportunas o que se adecúen al producto que está evaluando, sin existir un límite máximo de términos elegidos. El diseño del cuestionario y de los términos a incluir en la pregunta CATA es clave, los mismos deben ser fáciles de entender para los consumidores y la cantidad de términos oscilará entre 10 y

30 aproximadamente. Se pueden incluir términos relativos a las características sensoriales del producto (dulce, salado, amargo, etc), términos hedónicos (rico, poco agradable, etc.), términos relativos a conceptos (para toda la familia, producto para celíacos, etc.), términos relativos a características no sensoriales (producto de calidad) o términos relativos a ocasiones de uso (para la pizza, para la picada, etc.). Esta metodología ha sido ampliamente aplicada en los últimos años en diversos alimentos como por ejemplo productos cárnicos (da Conceição et al., 2015), vino (Alencar et al., 2019), postres lácteos (Bruzzone et al., 2015), yogur (Cadena et al., 2014), jugos (Lee et al., 2013), entre otros. En particular, existen varios estudios en los que se ha utilizado esta técnica para la evaluación de quesos, como por ejemplo queso crema (Foguel et al., 2021), queso “Minas Frescal” (Oliveira et al., 2017), y Camembert (Galli et al., 2019), entre otros.

La pregunta CATA estuvo compuesta por 27 términos: dulce, blando, elástico, duro, sabor extraño, para toda la familia, sabor lácteo, amargo, suave, cremoso, tradicional, áspero, rico, arricotado, para la picada, pegajoso, ácido, sin sabor, salado, blanco, para la pizza, saludable, agradable, opaco, amarillo, brillante y poco agradable. Los términos fueron seleccionados considerando la opinión de evaluadores entrenados y de la bibliografía (Oliveira et al., 2017; Rodrigues et al., 2021). Según las recomendaciones de Meyners & Castura (2016), el orden en el que se enumeraron los términos sensoriales se equilibró entre los consumidores, siguiendo el diseño experimental de William's Latin Square. La frecuencia de uso de cada término se determinó contando el número de consumidores que eligieron el término para describir cada muestra.

### **3.4.3. Análisis de penalización**

El análisis de penalización tiene como objetivo obtener información acerca de los atributos sensoriales más influyentes sobre la aceptabilidad de las muestras e identificar cuáles de ellos la afectaron de forma negativa. Esta información podría ser utilizada como base para realizar cambios en la formulación de los productos con el objetivo de mejorar su aceptabilidad.

Este análisis se realizó calculando, para cada producto evaluado, su aceptabilidad promedio entre todos los consumidores que marcaron el término en la pregunta CATA y todos los que no lo hicieron. La diferencia entre estos dos valores puede considerarse como una estimación de cuánto cambia la aceptabilidad del producto cuando el atributo está presente o no (Varela & Ares, 2014). Sin embargo, solo aquellos términos CATA que fueron seleccionados para describir el producto por al menos el 20 % de los consumidores se incluyeron en el análisis de penalización (Ares et al., 2014).

### **3.5. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para la composición global, pH, perfil de textura y capacidad de fusión, recuentos microbiológicos, ácidos orgánicos, carbohidratos,

compuestos volátiles y aceptabilidad utilizando el software Minitab 16 (Minitab Inc., State College, PA, EE. UU.). Cuando las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ), las medias se compararon mediante la prueba de Tukey. Por otro lado, las áreas de los picos de los perfiles peptídicos y de los compuestos volátiles se consideraron como variables independientes en un análisis de componentes principales (ACP), para detectar agrupaciones de las muestras según los diferentes tratamientos; para el ACP también se usó Minitab 16. Además, para el análisis sensorial, las pruebas de Chi-cuadrado indicaron que las diferencias de género (femenino y masculino), edad (entre 18-40 y 41-65) y distribuciones de frecuencia de consumo de queso (al menos dos veces por semana y más de dos veces por semana) no fueron significativas. Se realizó la prueba Q de Cochran para identificar diferencias significativas entre muestras para cada uno de los términos/atributos sensoriales de la pregunta CATA. Además, se realizó un Análisis de Correspondencias (AC) y un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) sobre la matriz que contiene la frecuencia de uso de cada término para cada muestra (tabla de contingencia). Todos los datos de los estudios sensoriales se analizaron con el software XLSTAT versión 2014 (Addinsoft, París, Francia).

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Rendimiento, composición global, pH y recuentos microbiológicos**

Como era de esperar, la incorporación de LPD incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) el rendimiento quesero (Tabla 37), al igual que lo observado en la experiencia de quesos miniatura informado en el capítulo 4. El valor promedio del rendimiento de todos los quesos elaborados con leche control (C, C90 y C73) y todos los quesos elaborados con leche enriquecida (P, P90 y P73) fueron  $13,3 \pm 0,6\%$  y  $19,2 \pm 0,4\%$ , respectivamente. Así, esta estrategia permitió aumentar el rendimiento quesero por volumen de leche en casi un 50 %, lo que es beneficioso para incrementar la capacidad operativa de la planta quesera. El mayor rendimiento se correlacionó con el aumento de sólidos totales en la leche fortificada, que contenía niveles de grasa y proteína aproximadamente 47% mayores que la leche control.

En otros trabajos, el incremento de sólidos totales en la leche de elaboración mediante la suplementación con LPD (Brito et al., 2000), retenidos de ultrafiltración (Govindasamy-Lucey et al., 2005) o concentrado de proteína de leche (Shakeel-Ur-Rehman et al., 2003a,b), condujo a un mayor rendimiento quesero por volumen y, en algunos casos, a una mayor recuperación de sólidos totales, lo que fue asociado a una mayor retención de caseína y grasa en la cuajada. En efecto, además del incremento del rendimiento para un mismo volumen de leche, debido al agregado de LPD, puede esperarse un mayor rendimiento por sólidos totales debido al tratamiento térmico aplicado a la LPD durante el secado spray. En efecto, este tratamiento térmico conduce a una desnaturalización de las proteínas de suero, cuya magnitud dependerá de la intensidad del mismo,

y si bien esto puede deteriorar las propiedades de coagulación, en leches fortificadas los efectos generalmente se contrarrestan (Masotti et al., 2017). En nuestro trabajo, las recuperaciones de proteína y sólidos totales fueron similares para los quesos obtenidos con leche control y enriquecida, por lo que no se verificaron diferencias en este sentido.

Los resultados de composición global (proteína, grasa y humedad) y pH también se muestran en la Tabla 46. La composición estuvo dentro de los valores esperados para el queso Cremoso y los resultados fueron similares para todos los quesos ( $p \geq 0,05$ ). Estos resultados confirman la validez de las experiencias del presente capítulo, en los que tanto el uso de una relación constante de caseína/grasa para las leches control y enriquecidas mediante la adición de proteína y grasa, como el corte de la cuajada al mismo valor de firmeza redundó en quesos de composición similar. En el mismo sentido, otros investigadores han reportado un contenido similar de grasa y proteína en quesos elaborados con leche enriquecida con LPD (Moynihan, 2015), o con leche compuesta por diferentes ingredientes lácteos líquidos o secos (Li et al., 2020), en los cuales la relación caseína:grasa se mantuvo constante. Por el contrario, el uso de leche de elaboración con diferente proporción de caseína/grasa afectó la composición del queso (Guinee et al., 2007).

En cuanto al pH, los valores fueron similares entre todos los quesos a los 12 y 30 días, mientras que a los 60 días de maduración se observó un ligero descenso (entre 0,13 y 0,17 unidades con relación a los respectivos controles) en los quesos con la cepa Lr73, siempre dentro de los valores normales para queso Cremoso. Lograr un pH final adecuado para el queso Cremoso es de gran importancia, ya que la sobreacidificación puede llevar al defecto de “arricotado” o “giesatura” (Hynes et al., 1999). En la actualidad, los fermentos lácticos iniciadores rara vez provocan este defecto, por lo que resulta de gran importancia que los fermentos adicionados como adjuntos tampoco contribuyan con excesiva acidez.

Los recuentos totales de BAL fueron similares ( $p \geq 0,05$ ) en todos los quesos y oscilaron entre 9,5 y 9,7 log UFC/g (Tabla 38). Este grupo representa principalmente al cultivo iniciador *S. thermophilus*, que se mantuvo en altas concentraciones en el queso Cremoso, tal como se ha informado en trabajos previos (Milesi et al., 2010; Peralta et al., 2020). El número de bacterias coliformes estuvo por debajo de 4 log UFC/g, inferior al nivel máximo establecido por la legislación nacional (CAA, 2020). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de coliformes para F1 a los 12 días; los quesos P (con y sin adjunto) mostraron los niveles más altos. También hubo diferencias entre los quesos F2 a los 60 días; Lr73 exhibió números más bajos (Tabla 38). Estos resultados indican una influencia negativa de la adición de LPD; sin embargo, esto solo se observó al comienzo de la maduración. A los 30 y 60 días no hubo diferencias debido a la adición de LPD probablemente debido al control que ejercen las BAL durante la maduración del queso. La presencia de la cepa Lr73 mejoró este control de coliformes hacia el final de la maduración.

**Tabla 37.** pH, composición global, rendimiento quesero y % de recuperación de proteínas y sólidos totales. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración, y la significancia estadística del ANOVA de dos vías de estos parámetros.

	Quesos						Significancia‡		
	C	C90	C73	P	P90	P73	F1	F2	F1xF2
pH									
12d	5,33 $\pm$ 0,13	5,28 $\pm$ 0,00	5,28 $\pm$ 0,09	5,19 $\pm$ 0,10	5,23 $\pm$ 0,02	5,23 $\pm$ 0,08	NS	NS	NS
30d	5,38 $\pm$ 0,13	5,35 $\pm$ 0,09	5,25 $\pm$ 0,09	5,28 $\pm$ 0,03	5,30 $\pm$ 0,05	5,18 $\pm$ 0,03	NS	NS	NS
60d	5,40 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	5,30 $\pm$ 0,15 <sup>ab</sup>	5,27 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	5,37 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	5,35 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	5,20 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	NS	*	NS
Composición global (12d) †									
Humedad (%)	52,1 $\pm$ 1,8	51,5 $\pm$ 0,8	51,2 $\pm$ 1,0	50,9 $\pm$ 1,1	51,2 $\pm$ 0,4	51,1 $\pm$ 0,3	NS	NS	NS
Grasa (%)	26,2 $\pm$ 1,8	25,6 $\pm$ 1,0	26,2 $\pm$ 0,7	26,0 $\pm$ 0,5	25,7 $\pm$ 0,9	26,2 $\pm$ 0,8	NS	NS	NS
Proteína (%)	18,6 $\pm$ 0,8	18,6 $\pm$ 1,2	18,9 $\pm$ 0,8	18,5 $\pm$ 0,6	18,9 $\pm$ 0,9	18,4 $\pm$ 0,1	NS	NS	NS
Rendimiento (%)‡	13,4 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>	13,5 $\pm$ 0,4 <sup>B</sup>	12,9 $\pm$ 0,2 <sup>B</sup>	19,2 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	19,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>	18,9 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>	*	NS	NS
Recuperación									
proteína (%)	75,0 $\pm$ 5,0	75,8 $\pm$ 6,6	76,5 $\pm$ 5,7	74,0 $\pm$ 0,1	78,9 $\pm$ 1,0	73,5 $\pm$ 0,1	NS	NS	NS
Recuperación									
sólidos totales (%)	51,6 $\pm$ 1,9	53,6 $\pm$ 0,6	51,9 $\pm$ 0,7	51,6 $\pm$ 0,6	53,9 $\pm$ 0,6	51,0 $\pm$ 1,1	NS	NS	NS

NS: No Significativo; \*p<0,05.

† Valores expresados como g/100g de queso.

‡ Valores expresados como kg/100 L leche

‡ F1 = adición de LPD; F2 = adición de un cultivo adjunto.

Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

<sup>A,B</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p<0,05) para F1.

<sup>a,b</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p<0,05) para F2.

La Tabla 38 presenta los recuentos de lactobacilos mesófilos. Como ya se fundamentó en la sección 4.2.2 del Capítulo 2, los recuentos de lactobacilos mesófilos de los quesos C90, P90, C73 y P73 representan el nivel alcanzado por los cultivos adjuntos, mientras que las colonias enumeradas en los quesos C y P representan las NSLAB adventicias.

Los lactobacilos adjuntos Lr73 y Lp90 fueron capaces de crecer y mantener altos niveles en todos los quesos durante la maduración. Ambos cultivos se mantuvieron entre 7,4 y 7,9 log UFC/g, lo que representa un incremento de 1,5-2 órdenes logarítmicos con respecto a lo inoculado en la leche de elaboración. La composición de la leche de elaboración no afectó la viabilidad de los adjuntos a los 12 y 30 días de maduración; por el contrario, a los 60 días de maduración se observaron mayores recuentos de lactobacilos en los quesos elaborados con leche enriquecida. Esta diferencia puede atribuirse al mayor nivel de carbohidratos fermentables disponibles, aportados por la LPD. En los quesos sin cultivos adjuntos, los niveles de NSLAB estuvieron entre 3,0 y 4,1 log UFC/g y fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) más altos en los quesos P que en los quesos C durante la maduración. El mayor nivel de NSLAB en quesos con el agregado de LPD, así como el aumento en los coliformes (sólo a los 12 días de maduración), puede atribuirse tanto a la mayor disponibilidad de lactosa como a la manipulación experimental ya que la preparación de la leche enriquecida es un paso adicional en la elaboración del queso. La diferencia en el nivel de NSLAB entre los quesos C y P, reportada en esta experiencia, no fue observada en la experiencia de quesos miniatura elaborados con leche enriquecida con LPD presentada en el capítulo 4 de la presente tesis, lo que se podría atribuir a la diferente escala de las elaboraciones: las elaboraciones a escala piloto presentan una mayor posibilidad de contaminación que las elaboraciones a escala laboratorio. Nuestros resultados se condicen con informes de fallos en calidad de quesos, especialmente por crecimiento de NSLAB, especialmente a partir de la semana 2 o 3 (comunicaciones personales de la industria, Quiberoni et al., 2008). No obstante, el agregado de polvos lácteos no es incompatible con la obtención de productos de buena calidad: en la presente tesis hemos demostrado que la calidad de la materia prima, correcta elaboración y el mantenimiento de la cadena de frío durante el almacenamiento y comercialización puede evitar el desarrollo de defectos aún en presencia de niveles significativos de NSLAB alterantes (Giménez et al., 2021). En este sentido, es importante mencionar que todos los quesos elaborados se mantuvieron a 4 °C durante todo el proceso de maduración, sin cortes en la cadena de frío. Otros investigadores también reportaron recuentos más altos de NSLAB en quesos Crescenza y Cheddar cuando se agregó LPD a la leche de elaboración (Moynihan, 2015; Oh et al., 2014). En particular, Moynihan (2015) atribuyó estos resultados a una protección de las NSLAB adventicias durante la pasteurización o a una disminución de la transferencia de calor debido al mayor contenido de sólidos totales y al aumento de la viscosidad de la leche.



**Tabla 38.** Recuentos de bacterias lácticas totales, coliformes y lactobacilos mesófilos (log UFC/g) en quesos a los 12, 30 y 60 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración y la significancia estadística del ANOVA de dos vías de estos parámetros.

	Quesos						Significancia‡		
	C	C90	C73	P	P90	P73	F1	F2	F1xF2
Bacterias lácticas totales†									
12d	9,68 $\pm$ 0,09	9,66 $\pm$ 0,16	9,54 $\pm$ 0,17	9,64 $\pm$ 0,16	9,59 $\pm$ 0,21	9,72 $\pm$ 0,34	NS	NS	NS
30d	9,49 $\pm$ 0,08	9,59 $\pm$ 0,12	9,55 $\pm$ 0,08	9,57 $\pm$ 0,06	9,56 $\pm$ 0,17	9,66 $\pm$ 0,11	NS	NS	NS
60d	9,59 $\pm$ 0,06	9,45 $\pm$ 0,14	9,53 $\pm$ 0,03	9,52 $\pm$ 0,10	9,49 $\pm$ 0,11	9,59 $\pm$ 0,07	NS	NS	NS
Coliformes†									
12d	1,56 $\pm$ 0,24 <sup>B</sup>	2,35 $\pm$ 0,59 <sup>B</sup>	2,31 $\pm$ 0,57 <sup>B</sup>	2,57 $\pm$ 1,00 <sup>A</sup>	3,09 $\pm$ 0,51 <sup>A</sup>	2,52 $\pm$ 0,38 <sup>A</sup>	*	NS	NS
30d	2,51 $\pm$ 0,06	1,89 $\pm$ 0,65	1,30 $\pm$ 0,43	2,75 $\pm$ 0,86	3,22 $\pm$ 0,77	1,97 $\pm$ 0,45	NS	NS	NS
60d	1,82 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	1,80 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	1,98 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	2,51 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	2,14 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	1,54 $\pm$ 0,76 <sup>b</sup>	NS	*	NS
Lactobacilos mesófilos†									
12d	3,07 $\pm$ 0,18 <sup>E</sup>	7,43 $\pm$ 0,26 <sup>C</sup>	7,51 $\pm$ 0,19 <sup>C</sup>	4,22 $\pm$ 0,14 <sup>D</sup>	7,60 $\pm$ 0,23 <sup>C</sup>	7,58 $\pm$ 0,36 <sup>C</sup>	*	*	*
30d	2,62 $\pm$ 0,56 <sup>E</sup>	7,88 $\pm$ 0,20 <sup>C</sup>	7,59 $\pm$ 0,20 <sup>C</sup>	4,10 $\pm$ 0,20 <sup>D</sup>	7,56 $\pm$ 0,27 <sup>C</sup>	7,79 $\pm$ 0,16 <sup>C</sup>	*	*	*
60d	3,20 $\pm$ 0,17 <sup>Bb</sup>	7,54 $\pm$ 0,24 <sup>Ba</sup>	7,59 $\pm$ 0,22 <sup>Ba</sup>	3,92 $\pm$ 0,24 <sup>Ab</sup>	7,69 $\pm$ 0,27 <sup>Aa</sup>	7,88 $\pm$ 0,06 <sup>Aa</sup>	*	*	NS

NS: No Significativo; \*p < 0,05.

† Valores expresados como log UFC/g.

‡ F1 = adición de LPD; F2 = adición de un cultivo adjunto.

Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número -sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

<sup>A,B</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) para F1.

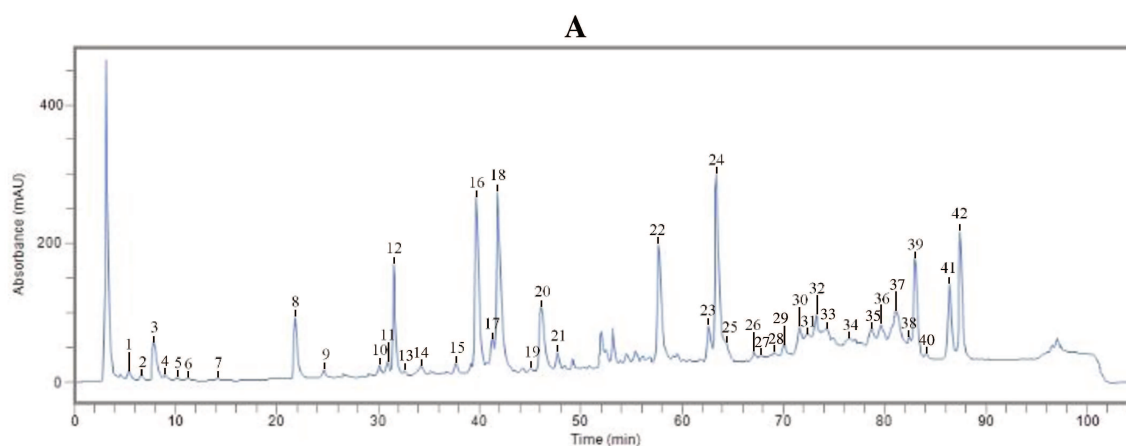
<sup>a,b</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) para F2.

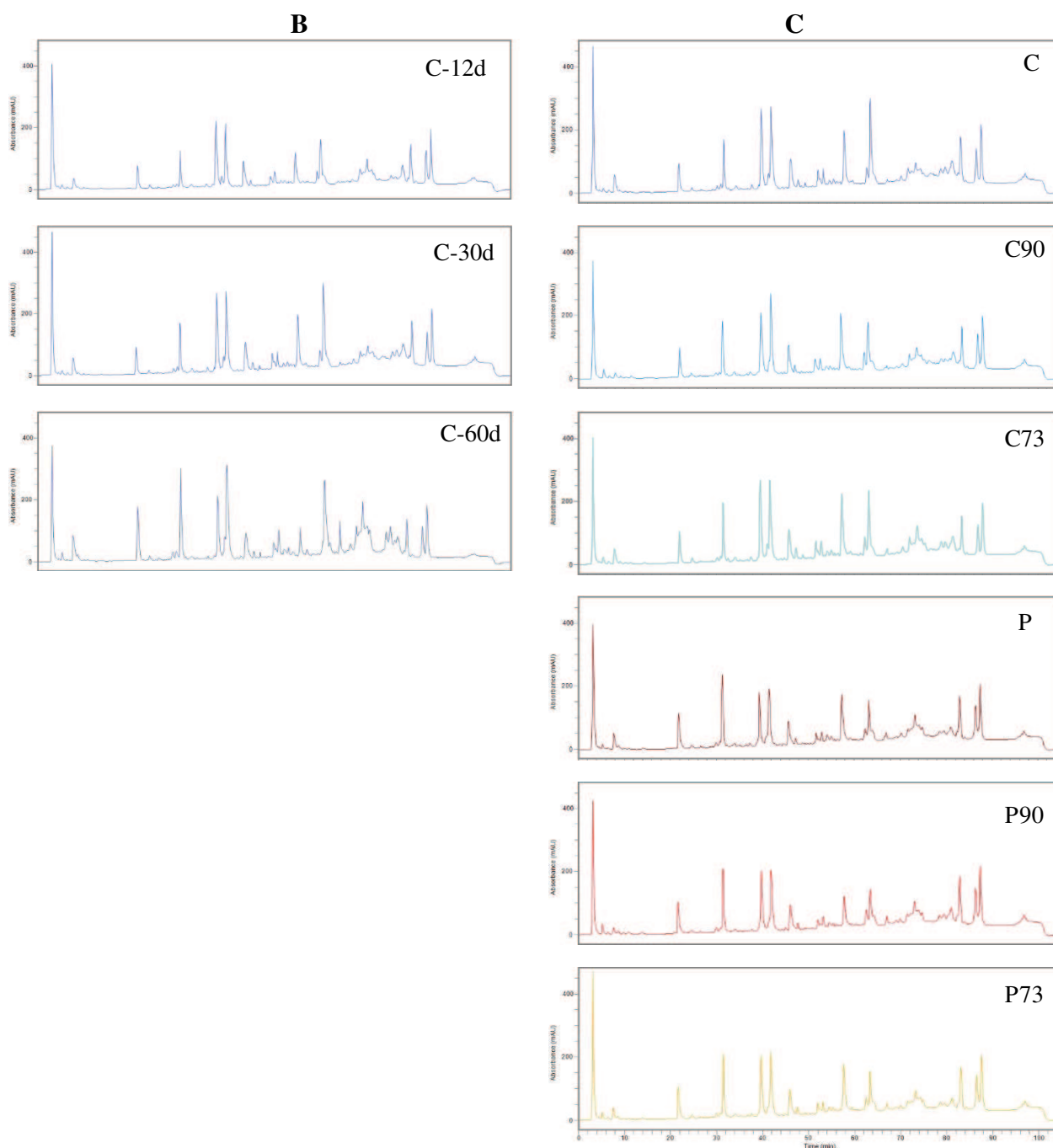
<sup>C,D,E</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05), cuando F1 x F2 es significativo.

## 4.2. Proteólisis

Los perfiles de péptidos de los extractos de queso solubles en agua se muestran en la Figura 63 y 65. Se identificaron un total de 42 picos en los cromatogramas. Aquellos picos con tiempos de retención alrededor de 82, 86 y 87 min (identificados con los números 39, 41 y 42, respectivamente, Figura 63), fueron identificados como las proteínas de suero  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina A y B, respectivamente. Varios picos aumentaron durante la maduración; estos perfiles reflejan el progreso típico de la proteólisis durante la maduración del queso Cremoso. Además, se observaron diferencias en los perfiles por comparación visual según ambos factores estudiados. En general, en los quesos con LPD se observó una disminución de los picos con tiempo de retención cercano a los 40 min, 58-64 min y 72-76 min, y un aumento de los picos en la zona del perfil de los 30 min y 82-87 min. La adición de cultivos adjuntos, principalmente Lp90, produjo una disminución de los picos con tiempos de retención de alrededor de 9 y 64 min, y un aumento del pico situado a los 5 min aproximadamente.

El área de los picos identificados se utilizó como variable en el ACP de los quesos para cada tiempo de maduración: 12, 30 y 60 días. Los primeros cuatro componentes principales (CP) explicaron el 77 % (12 días), el 71 % (30 días) y el 69 % (60 días) de la varianza total. Los gráficos de scores y loadings de CP1 frente a CP2 se muestran en la Figura 64. En todos los casos se observó una clara separación de los quesos según F1. Tres de los picos que caracterizaron a los quesos con LPD fueron los identificados como proteínas de suero (picos número 39, 41 y 42). En cuanto a la adición de cultivos adjuntos, se detectó principalmente en las muestras a los 30 días de maduración una tendencia a la separación de los quesos con Lp90 y Lr73 de sus respectivos quesos control. Los scores de las muestras en los primeros cuatro CP se analizaron mediante ANOVA de dos vías y los resultados se muestran en la Tabla 39. Se detectaron diferencias significativas en los scores de las muestras en el CP1 (a los 12, 30 y 60 días de maduración) y en el CP2 (a los 30 días de maduración) debido al F1. F2 tuvo una influencia significativa en los scores de las muestras solo en el CP4 (a los 30 y 60 días de maduración).





**Figura 63.** Perfiles peptídicos obtenidos por RP-HPLC de los quesos Cremoso: A- Cromatograma con los picos identificados y utilizados para el ACP; B- Cromatogramas de los quesos C a los 12, 30 y 60 días de maduración; C- Cromatogramas de los quesos C, C90, C73, P, P90 y P73 a los 30 días de maduración. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73). La figura muestra los perfiles de una de las tres réplicas de queso; todas las réplicas fueron similares.

Por otro lado, la incorporación de LPD aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) el área de los picos de las proteínas de suero,  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina A y B, mientras que los cultivos adjuntos no tuvieron ningún efecto (Tabla 39). La LPD proporcionó tanto caseínas como proteínas de suero y esto condujo a un mayor nivel de proteínas totales en la leche enriquecida, manteniendo la relación caseína:proteína de suero. Por este motivo, era esperable que la

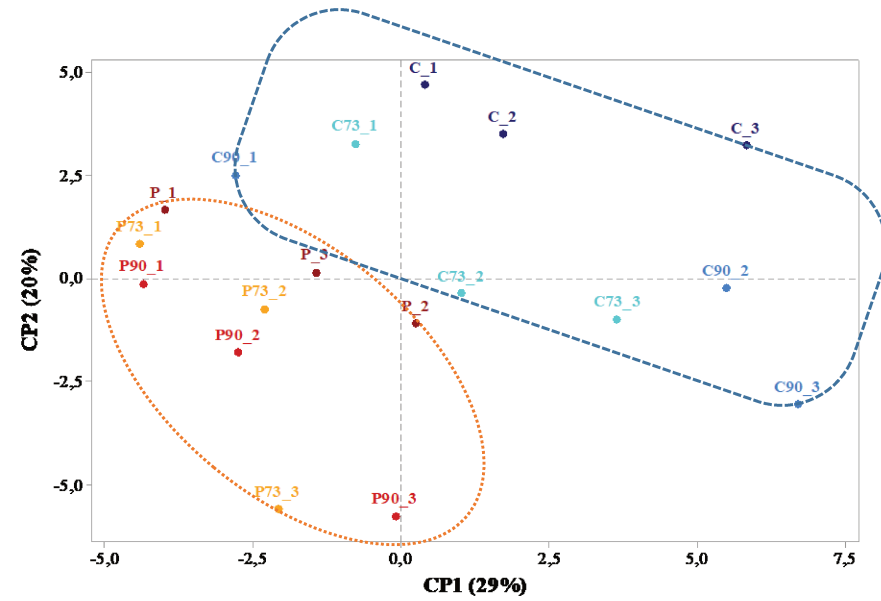
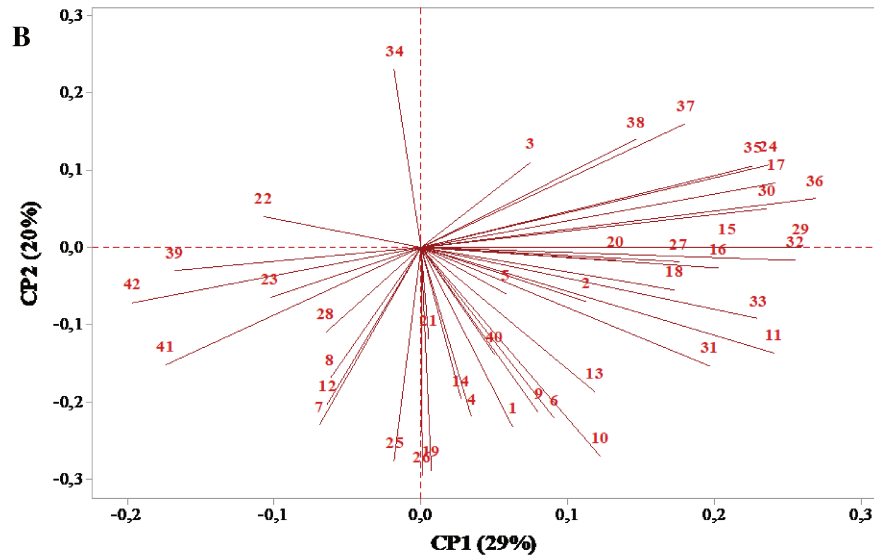
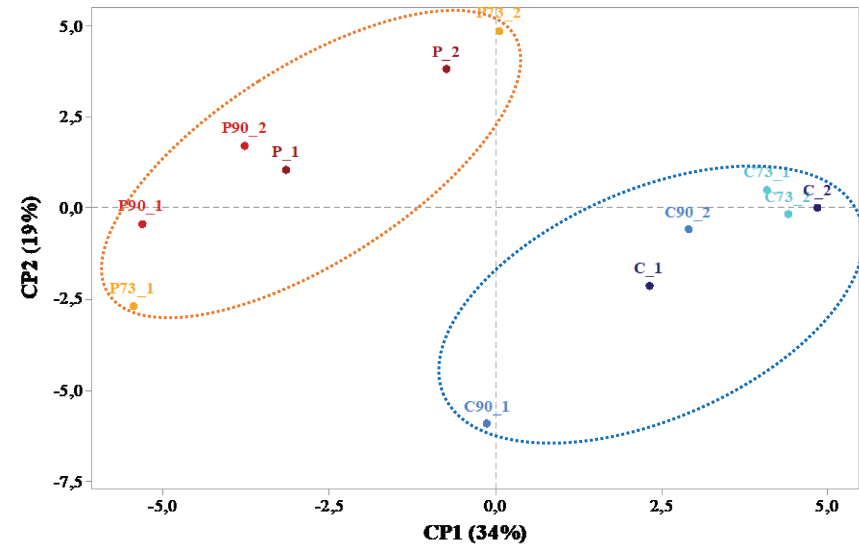
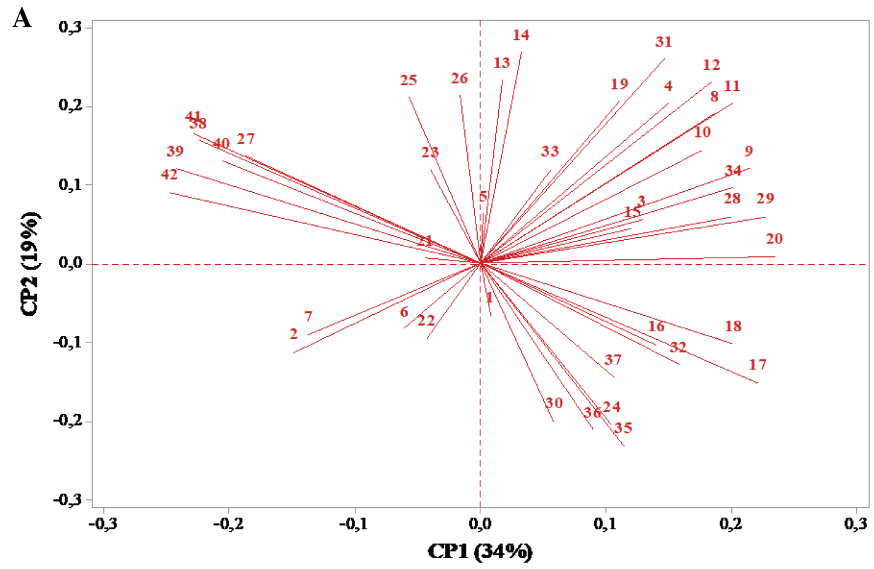
concentración de las proteínas de suero fuera mayor en la fase acuosa de los quesos elaborados con leche enriquecida que en los quesos control, lo que se confirmó experimentalmente.

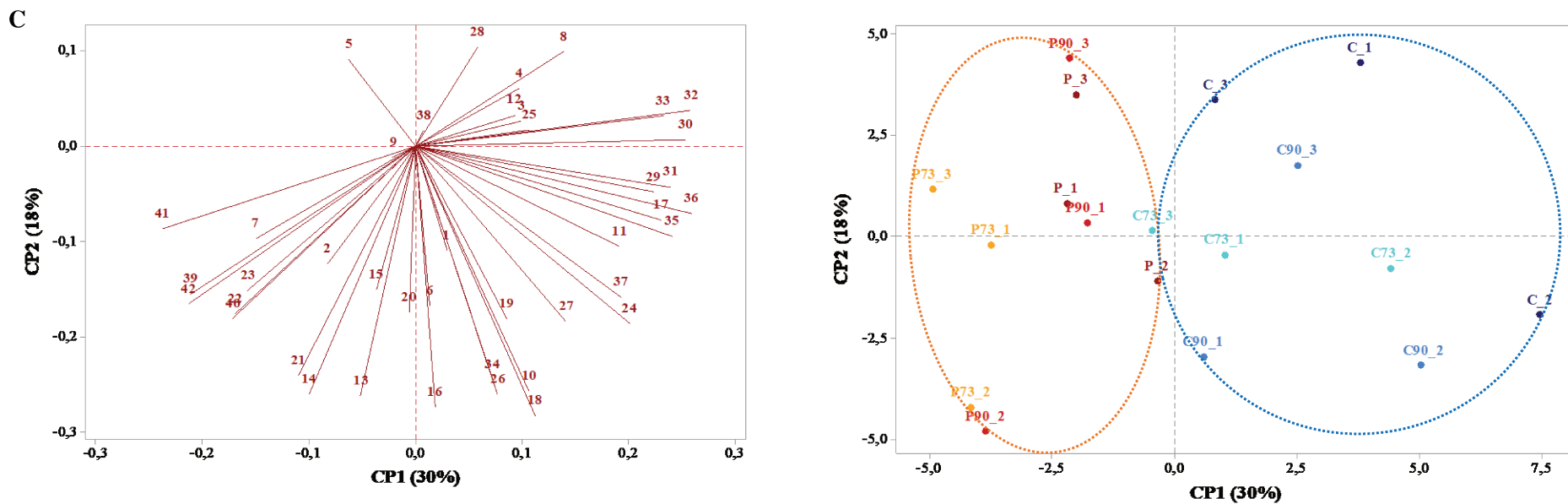
**Tabla 39.** Significancia estadística del ANOVA de dos vías de los primeros cuatro componentes principales (CP) del ACP de los perfiles peptídicos y del área de las proteínas del suero en los perfiles peptídicos obtenidos por RP-HPLC.

	Significancia‡		
	F1	F2	F1xF2
<b>CP1</b>			
12d	*	NS	NS
30d	*	NS	NS
60d	*	NS	NS
<b>CP2</b>			
12d	NS	NS	NS
30d	*	NS	NS
60d	NS	NS	NS
<b>CP3</b>			
12d	NS	NS	NS
30d	NS	NS	NS
60d	NS	NS	NS
<b>CP4</b>			
12d	NS	NS	NS
30d	NS	*	NS
60d	NS	*	NS
<b><math>\alpha</math>-lactoalbúmina</b>			
12d	*	NS	NS
30d	*	NS	NS
60d	*	NS	NS
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina A</b>			
12d	*	NS	NS
30d	*	NS	NS
60d	*	NS	NS
<b><math>\beta</math>-lactoglobulina B</b>			
12d	*	NS	NS
30d	*	NS	NS
60d	*	NS	NS

NS: No Significativo; \* $p < 0,05$ .

‡ F1 = adición de LPD; F2 = adición de cultivos adjuntos





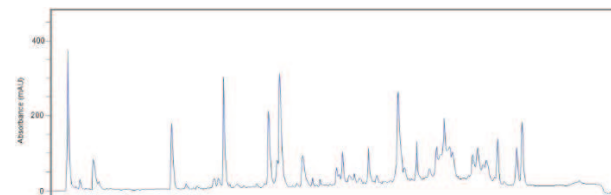
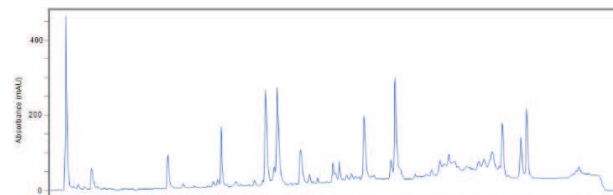
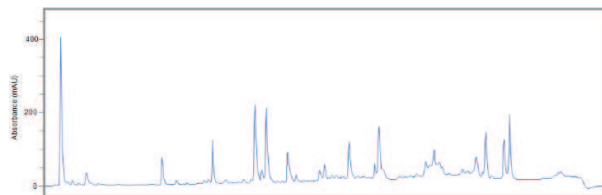
**Figura 64.** Análisis de Componentes Principales (ACP) de los perfiles peptídicos de los quesos Cremoso C(■), C90(■), C73(■), P(■), P90(■) y P73(■), a los 12 (A), 30 (B) y 60 (C) días de maduración. Gráficos de loading (izquierda) y scores (derecha) de las variables y muestras de quesos analizadas para CP1 vs. CP2. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73); el último número después del guion indica la réplica (1, 2 o 3). Las elipses encierran muestras de quesos elaborados con leche control (azul) y leche enriquecida (rojo).

A

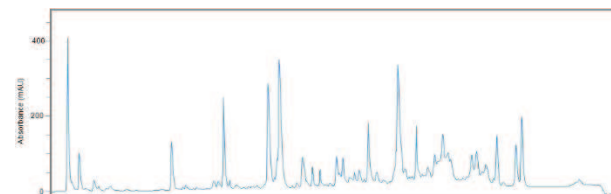
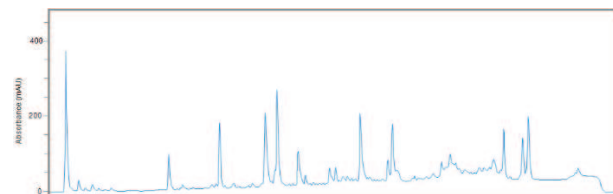
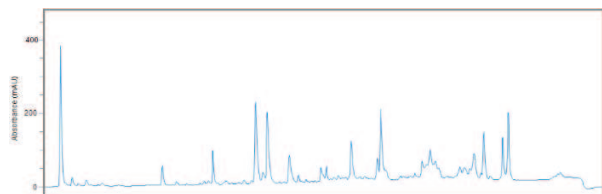
B

C

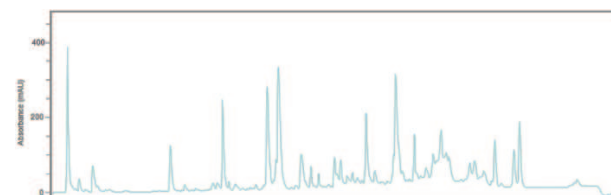
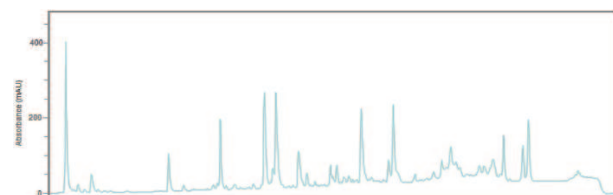
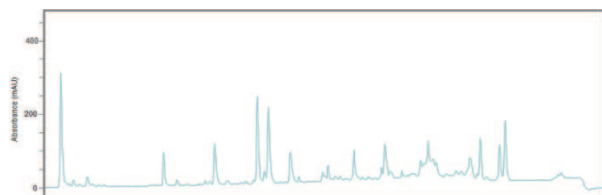
C

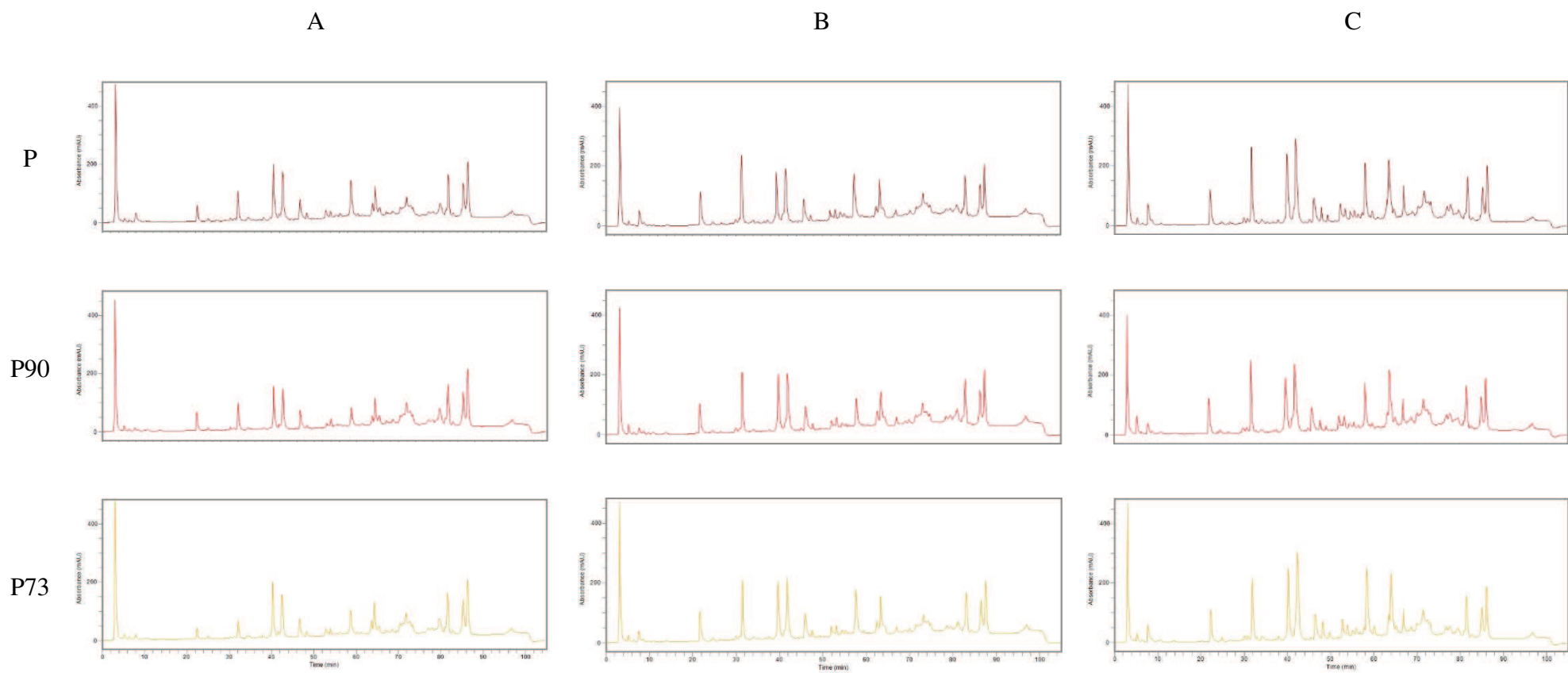


C90



C73



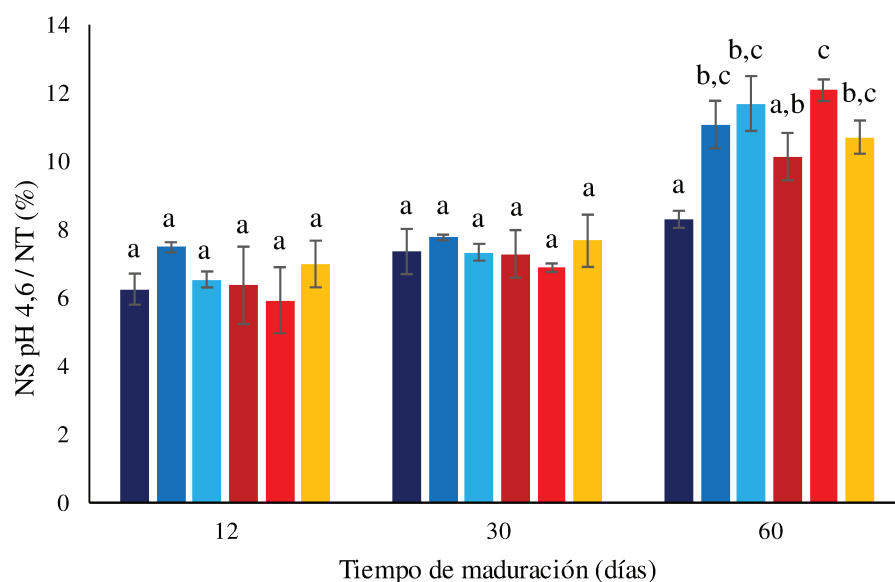


**Figura 65.** Perfiles peptídicos obtenidos por RP-HPLC de los quesos Cremoso a los 12 días (A), 30 días (B) y a los 60 días (C) de maduración. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73). La figura muestra los perfiles de una de las tres réplicas de queso; todas las réplicas fueron similares.



En la Figura 66 se presenta el contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 como proporción del nitrógeno total para las muestras de quesos a lo largo de la maduración. El tiempo de maduración influyó significativamente en el aumento del contenido de nitrógeno de esta fracción en todos los quesos, lo que indica el avance de la proteólisis durante la maduración. El agregado de fermentos adjuntos y LPD no influyeron en la proteólisis evidenciada por este índice a los 12 y 30 días de maduración ( $p \geq 0,05$ ). Sin embargo, la adición del cultivo adjunto produjo un aumento significativo a los 60 días de maduración ( $p < 0,05$ ). La actividad peptidolítica del adjunto, por lo tanto, puede profundizar la proteólisis en etapas tardías de la maduración.

En trabajos previos, la cepa Lp90, añadida como cultivo fresco o deshidratado por spray luego de su crecimiento en el medio comercial MRS, incrementó la liberación de péptidos solubles y aminoácidos libres en queso Cremoso (Milesi et al., 2009; 2010), y en quesos semiduros y duros (Cuffia et al., 2019; Milesi et al., 2009). Además, Lr73, añadido como cultivo fresco tras su crecimiento en MRS, también produjo un aumento de péptidos solubles y aminoácidos libres en queso Cremoso y Pategrás (Milesi et al., 2009). Estos estudios se llevaron a cabo en quesos elaborados con leche sin adición de LPD. En este capítulo, los resultados obtenidos destacan la robustez de la actividad bioquímica de las cepas Lp90 y Lr73, que pueden producir un impacto similar en la proteólisis del queso independientemente del medio de cultivo, el método de conservación aplicado y la composición de la leche de elaboración.

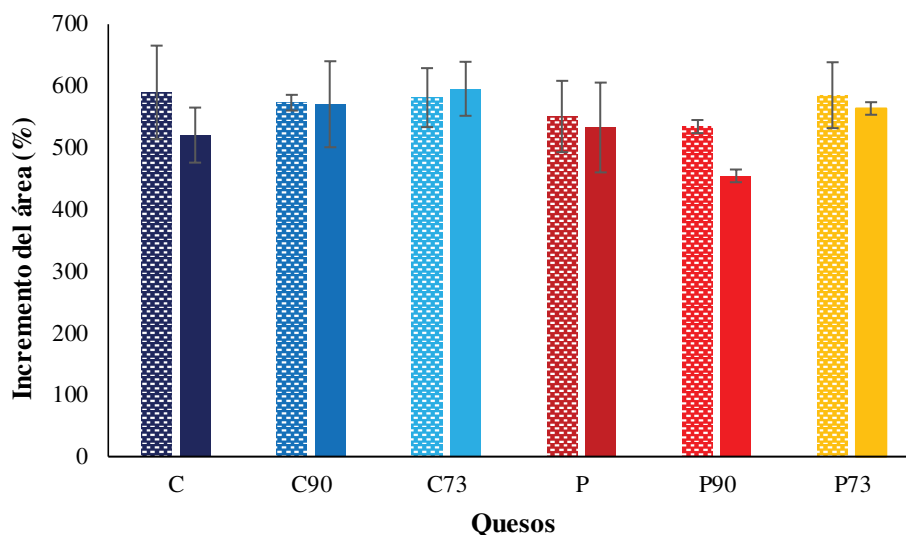


**Figura 66.** Contenido de nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-pH 4,6), expresado como porcentaje del nitrógeno total (NT) de los quesos C (■), C90 (■), C73 (■), P (■), P90 (■) y P73 (■) durante la maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73- adición de la cepa Lr73).

<sup>a,b,c</sup> Los valores con diferentes letras en cada tiempo de maduración difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) para F2.

### 4.3. Capacidad de fusión y textura de los quesos

La capacidad de fusión de los quesos (Figura 67) no se vio afectada por ninguno de los factores estudiados ( $p \geq 0,05$ ), aunque se observó un valor de fusión ligeramente inferior en los quesos elaborados con leche enriquecida con LPD. Esta misma tendencia también fue encontrada en los quesos miniatura elaborados con leche enriquecida con LPD, reportado en el capítulo 4.



**Figura 67.** Capacidad de fusión de los quesos C(■), C90(■), C73(■), P(■), P90(■) y P73(■), expresada como el aumento del área (%) de un disco de queso sometido a calentamiento en condiciones estandarizadas, a los 30 (trama) y 60 (sólido) días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

Diferentes factores pueden afectar la textura y la capacidad de fusión del queso, como la composición, el pH, el nivel de calcio, la proteólisis, entre otros (Lawrence et al., 1987). En este sentido, Lee et al., (2010) verificaron que los quesos Colby con valores de pH muy bajos ( $< 4,9$ ) presentaban una capacidad de fusión limitada durante la maduración, probablemente debido a una mayor atracción electrostática entre las caseínas. Además, el aumento de la proteólisis durante la maduración se ha relacionado con cambios en la textura del queso y una mayor capacidad de fusión (Dave et al., 2003; O'Mahony et al., 2005). Para el queso Cremoso, Candiotti et al. (2007) demostraron que la capacidad de fusión se vio afectada principalmente por la evolución del pH durante la maduración, mientras que el nivel de proteólisis no tuvo una influencia significativa. Además, el uso de LPD reconstituida para la elaboración de queso Mozzarella y Cheddar condujo a una menor capacidad de fusión. Este efecto se asoció con cambios en las moléculas de caseína y el balance de sal debido al proceso de secado de la leche, que afecta la estabilidad y dispersabilidad de las micelas y promueve la desmineralización (Li et al., 2020; Moiseev et al., 2017). Además, las interacciones (entrecruzamiento) entre las proteínas de suero y la caseína

aumentan debido a las altas temperaturas durante el proceso de secado de la LPD y, en consecuencia, disminuyen la capacidad de fusión del producto final (Kapoor & Metzger, 2008). Sin embargo, estos efectos dependen de las condiciones del tratamiento térmico usadas para elaborar la LPD (Moiseev et al., 2017). En el presente capítulo, se utilizó leche en polvo de bajo tratamiento térmico, que podría explicar que la capacidad de fusión fue sólo ligeramente disminuida en los quesos elaborados con leche enriquecida. Además, Acharya & Mistry (2004) encontraron que el uso de leche condensada por evaporación al vacío y ultrafiltrada para la fabricación de queso Cheddar disminuyó su capacidad de fusión, lo que se asoció principalmente con un mayor nivel de calcio, una proteólisis más lenta, un menor contenido de humedad y de relación grasa/caseína. Las diferencias observadas en la proteólisis de los quesos elaborados en el presente capítulo y las ligeras diferencias en los valores de pH en relación con los factores estudiados no fueron suficientes para influir significativamente en la capacidad de fusión del queso. Estos resultados indican que los factores estudiados no afectaron negativamente esta importante propiedad del queso Cremoso.

Los resultados del análisis de textura se muestran en la Tabla 40. La incorporación de LPD aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) la dureza y masticabilidad de los quesos y disminuyó el IRRER (índice de recuperación elástica retardada) a los 30 días de maduración. En los quesos miniatura elaborados con la adición de LPD presentados en el capítulo 4 también se encontró que el queso con mayor nivel proteico y lavado de la cuajada (similar al queso P de esta experiencia) presentó una dureza y masticabilidad superior que el resto. Estos resultados se pueden atribuir a las diferencias en la proteólisis observada en los perfiles peptídicos y a la mayor retención de proteínas de suero en el queso. En este sentido, Yun et al. (1998) encontraron que el queso Mozzarella fortificado con 3 % de LPD presentó valores de dureza ligeramente superiores, lo que se atribuyó a mayores niveles de calcio, menor humedad y proteólisis en comparación con quesos elaborados sin fortificación con LPD. Además, la obtención de un coágulo más rígido cuando se utilizan leches con un mayor nivel de proteínas condujo a una mayor dureza (Heino et al., 2010). Chevanan & Muthukumarappan (2007) encontraron una correlación inversa entre la capacidad de fusión y la dureza de los quesos Cheddar elaborados con diferentes niveles de calcio y fósforo, contenido de lactosa residual y sal en la humedad. En este capítulo, las diferencias en la dureza y en el IRRER de los quesos elaborados con leche control y leche enriquecida se nivelaron al final de la maduración. De la misma manera, Li et al. (2020) encontraron que las diferencias iniciales descritas para la dureza de los quesos Cheddar elaborados con diferentes leches se nivelaron durante la maduración.

**Tabla 40.** Parámetros de textura de los quesos a los 30 y 60 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración y la significancia estadística del ANOVA de dos vías de estos parámetros.

Parámetros	Quesos						Significancia‡		
	C	C90	C73	P	P90	P73	F1	F2	F1xF2
Dureza (N)									
30d	9,29 $\pm$ 1,46 <sup>B</sup>	9,70 $\pm$ 3,16 <sup>B</sup>	10,23 $\pm$ 2,09 <sup>B</sup>	11,98 $\pm$ 3,52 <sup>A</sup>	12,32 $\pm$ 2,41 <sup>A</sup>	13,23 $\pm$ 3,68 <sup>A</sup>	*	NS	NS
60d	7,95 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	6,65 $\pm$ 0,95 <sup>b</sup>	6,37 $\pm$ 0,51 <sup>ab</sup>	7,20 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	5,55 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	6,96 $\pm$ 2,08 <sup>ab</sup>	NS	*	NS
Adhesividad (J)									
30d	1,13 $\pm$ 0,42 <sup>D</sup>	1,99 $\pm$ 0,37 <sup>C</sup>	1,92 $\pm$ 0,45 <sup>C</sup>	1,91 $\pm$ 0,26 <sup>C</sup>	2,31 $\pm$ 0,49 <sup>C</sup>	1,76 $\pm$ 0,25 <sup>C,D</sup>	*	*	*
60d	1,61 $\pm$ 0,60	2,89 $\pm$ 1,37	2,56 $\pm$ 0,53	2,54 $\pm$ 0,88	2,59 $\pm$ 0,48	2,40 $\pm$ 0,72	NS	NS	NS
Cohesividad									
30d	0,67 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,02	NS	NS	NS
60d	0,65 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,03	NS	NS	NS
IREI									
30d	0,29 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,02	NS	NS	NS
60d	0,32 $\pm$ 0,04 <sup>D</sup>	0,38 $\pm$ 0,05 <sup>C,D</sup>	0,39 $\pm$ 0,02 <sup>C</sup>	0,36 $\pm$ 0,05 <sup>C,D</sup>	0,40 $\pm$ 0,03 <sup>C</sup>	0,35 $\pm$ 0,03 <sup>C,D</sup>	NS	*	*
IRER									
30d	0,37 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	0,36 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,35 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,35 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	0,35 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	0,35 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	*	NS	NS
60d	0,34 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,36 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>	0,36 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,36 $\pm$ 0,01 <sup>a,b</sup>	NS	*	NS
Masticabilidad (N)									
30d	1,94 $\pm$ 0,52 <sup>A</sup>	2,28 $\pm$ 0,71 <sup>A</sup>	2,35 $\pm$ 0,46 <sup>A</sup>	2,88 $\pm$ 0,83 <sup>B</sup>	2,81 $\pm$ 0,51 <sup>B</sup>	3,05 $\pm$ 0,91 <sup>B</sup>	*	NS	NS
60d	1,73 $\pm$ 0,44	1,66 $\pm$ 0,27	1,46 $\pm$ 0,19	1,77 $\pm$ 0,18	1,47 $\pm$ 0,13	1,58 $\pm$ 0,40	NS	NS	NS

NS: No Significativo; \*p < 0,05.

‡F1 = adición de LPD; F2 = adición de un cultivo adjunto

Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

<sup>A,B</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) para F1.

<sup>a,b</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) para F2.

<sup>C,D</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) cuando F1XF2 es significativo.

En cuanto al F2, la adición de Lp90 disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) la dureza y aumentó el IRER a los 60 días de maduración, lo que podría estar correlacionado con la influencia de esta cepa en la proteólisis. Finalmente, se observó una interacción de ambos factores sobre la adhesividad a los 30 días de maduración (los valores en los quesos C fueron inferiores en comparación al resto de los quesos, excepto el queso P73) y en el IREI (índice de recuperación elástica instantánea) a los 60 días (quesos C < C73 y P90).

Durante la maduración (30 a 60 días) la dureza y masticabilidad de los quesos disminuyó y la adhesividad aumentó, mientras que los demás parámetros permanecieron sin cambios

#### 4.4. Ácidos orgánicos y carbohidratos

Los ácidos orgánicos presentes en los quesos tienen dos propiedades funcionales: prevenir el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes actuando como conservantes naturales y mejorar las características sensoriales (Güler, 2014). Los ácidos presentes en la leche y los productos lácteos derivan del metabolismo bioquímico bovino (ácidos cítrico, orótico o hipúrico), de la lipólisis (como el ácido butírico), o del crecimiento bacteriano y la fermentación de carbohidratos (ácidos láctico, pirúvico, acético, propiónico, fórmico y benzoico) (Tormo & Izco, 2004).

En los quesos elaborados se detectaron lactosa, galactosa y cinco ácidos orgánicos: láctico, orótico, cítrico, hipúrico y benzoico (Tabla 41). Con el fin de contribuir a la interpretación de las tendencias a lo largo de la maduración los resultados también se presentan en forma gráfica (Figura 68).

La adición de LPD incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) el nivel de compuestos solubles naturalmente presentes en este polvo lácteo, como la lactosa, ácido cítrico y ácido orótico, los cuales fueron retenidos en la fase acuosa de los quesos. Asimismo, los quesos elaborados con leche adicionada de LPD presentaron mayores niveles ( $p < 0,05$ ) de galactosa a todos los tiempos de maduración. Una tendencia similar fue encontrada en los quesos miniatura con LPD del capítulo 4. Como ya fue mencionado en otros capítulos de esta tesis, en quesos elaborados con cultivos que sólo contienen *S. thermophilus*, la galactosa se acumula ya que la mayoría de las cepas de esta especie de bacterias lácticas no tienen la capacidad de utilizarla (Peralta et al., 2017). El mayor nivel de lactosa en los quesos con LPD condujo a una mayor producción de galactosa debido a la actividad microbiana. Los carbohidratos residuales son una de las fuentes de energía que pueden utilizar las NSLAB durante la maduración beneficiando su crecimiento (Blaya et al., 2018), como se observó en los recuentos de los quesos P.

Los cambios en los niveles de lactosa residual en el queso pueden afectar la formación de ácido láctico (Lee et al., 2010). De hecho, la concentración de ácido láctico fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en todos los quesos P (P, P90 y P73) a los 12 días de maduración, probablemente

debido al mayor nivel de carbohidratos fermentables en estos quesos. Sin embargo, los valores se nivelaron entre todos los quesos a los 30 días ( $p \geq 0,05$ ), mientras que al final de la maduración, los quesos con Lr73 alcanzaron niveles de ácido láctico superiores ( $p < 0,05$ ) en comparación con el resto de quesos. Este hecho se correlaciona con los valores de pH, que fueron ligeramente inferiores para los quesos con Lr73 al final de la maduración. Estos resultados reflejan una mayor actividad acidificante de Lr73 en comparación con Lp90, pero solo afectó el pH y el nivel de ácido láctico al final de la maduración.

Oh et al. (2014) también observaron un aumento de lactosa y ácido láctico en queso Cottage elaborado con leche enriquecida con LPD. De manera similar, el uso de leche concentrada por evaporación al vacío para el queso Cheddar condujo a niveles más altos de lactosa (Anderson et al., 1993). Por el contrario, la adición de otros polvos lácteos a la leche de elaboración, como fosfocaseína, concentrado de proteína de leche y retenido de ultrafiltración de leche, no tuvo impacto en los niveles de lactosa porque estos ingredientes contienen menos lactosa que la LPD (Guinee et al., 2006; Shakeel-Ur-Rehman et al., 2003a).

La adición de cultivos adjuntos no tuvo una influencia significativa en los niveles de carbohidratos o ácido cítrico, lo que indica que ninguna de las dos cepas utilizadas fue capaz de metabolizar significativamente estos compuestos en las condiciones ambientales del queso. Sin embargo, en otros modelos experimentales, estas cepas tuvieron un efecto diferente (Batistela, 2022; Cuffia et al., 2019; Peralta et al., 2017, 2020), sugiriendo la influencia de la composición de la matriz, la tecnología y la temperatura de incubación/maduración en la actividad metabólica microbiana. De esta forma, la presencia de carbohidratos afectó la capacidad de algunas cepas de lactobacilos para metabolizar el citrato (Medina de Figueroa et al., 2000). Además, el aumento de la temperatura de maduración por interrupciones de la cadena de frío condujo a una mayor metabolización de la galactosa por Lp90 (Peralta et al., 2020).

Por otro lado, los cultivos adjuntos mostraron un impacto en los niveles de ácido hipúrico y benzoico, los cuales disminuyeron y aumentaron ( $p < 0,05$ ), respectivamente, en los quesos con las dos cepas evaluadas (Lp90 y Lr73) en comparación con los quesos sin cultivos adjuntos. El metabolismo del ácido hipúrico por las bacterias lácticas puede generar ácido benzoico, que es un agente conservante (Sieber et al., 1995). Esta actividad metabólica también ha sido demostrada previamente para un cultivo liofilizado de la cepa Lp90 (tras su crecimiento en el medio comercial MRS) cuando se incorporó a quesos Cremoso miniatura como se describe en el Capítulo 2 sección 4.1.5. Asimismo, la incorporación de los cultivos adjuntos modificó significativamente el nivel de ácido orótico solo al final de la maduración, siendo menores los valores para quesos con Lp90.

El comportamiento de cada cultivo adjunto fue similar en los quesos elaborados con y sin adición de LPD a la leche.

**Tabla 41.** Niveles de carbohidratos y ácidos orgánicos en quesos a los 0, 12, 30 y 60 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar (expresados en mg/100 g queso) de tres réplicas de elaboración, y la significancia estadística del ANOVA de dos vías.

Ácidos orgánicos y carbohidratos	Tiempo de maduración (días)	Quesos						Significancia‡		
		C	C90	C73	P	P90	P73	F1	F2	F1xF2
Ácido cítrico	0	167,80 $\pm$ 5,69 <sup>B</sup>	161,39 $\pm$ 13,99 <sup>B</sup>	156,42 $\pm$ 16,18 <sup>B</sup>	217,95 $\pm$ 4,37 <sup>A</sup>	215,76 $\pm$ 2,29 <sup>A</sup>	221,44 $\pm$ 10,01 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	12	188,16 $\pm$ 5,55 <sup>B</sup>	188,93 $\pm$ 8,49 <sup>B</sup>	186,32 $\pm$ 10,91 <sup>B</sup>	228,07 $\pm$ 5,03 <sup>A</sup>	231,00 $\pm$ 4,88 <sup>A</sup>	233,71 $\pm$ 12,45 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	30	187,82 $\pm$ 6,36 <sup>B</sup>	185,41 $\pm$ 2,25 <sup>B</sup>	189,73 $\pm$ 9,58 <sup>B</sup>	210,30 $\pm$ 10,31 <sup>A</sup>	217,66 $\pm$ 9,03 <sup>A</sup>	214,36 $\pm$ 11,19 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	186,65 $\pm$ 12,42	194,89 $\pm$ 5,65	192,14 $\pm$ 1,37	184,61 $\pm$ 10,24	185,56 $\pm$ 8,46	197,21 $\pm$ 15,02	NS	NS	NS
Ácido orótico	0	13,63 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	12,82 $\pm$ 1,63 <sup>B</sup>	11,61 $\pm$ 2,09 <sup>B</sup>	17,11 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	17,14 $\pm$ 0,53 <sup>A</sup>	18,49 $\pm$ 0,95 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	12	10,37 $\pm$ 0,44 <sup>B</sup>	10,47 $\pm$ 0,77 <sup>B</sup>	10,08 $\pm$ 0,40 <sup>B</sup>	12,75 $\pm$ 0,43 <sup>A</sup>	12,68 $\pm$ 0,57 <sup>A</sup>	12,62 $\pm$ 0,78 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	30	10,18 $\pm$ 0,73 <sup>B</sup>	9,06 $\pm$ 0,47 <sup>B</sup>	9,75 $\pm$ 0,28 <sup>B</sup>	12,38 $\pm$ 0,43 <sup>A</sup>	12,19 $\pm$ 0,41 <sup>A</sup>	12,08 $\pm$ 0,55 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	9,69 $\pm$ 0,64 <sup>B,a</sup>	7,72 $\pm$ 0,63 <sup>B,b</sup>	8,27 $\pm$ 0,55 <sup>B,b</sup>	12,21 $\pm$ 0,43 <sup>A,a</sup>	11,04 $\pm$ 0,21 <sup>A,b</sup>	10,26 $\pm$ 0,63 <sup>A,b</sup>	*	*	NS
Ácido láctico	0	104,56 $\pm$ 12,40	143,25 $\pm$ 49,00	204,14 $\pm$ 50,32	135,21 $\pm$ 59,29	165,88 $\pm$ 23,90	143,54 $\pm$ 22,24	NS	NS	NS
	12	1235,68 $\pm$ 82,46 <sup>B</sup>	1325,20 $\pm$ 70,68 <sup>B</sup>	1209,88 $\pm$ 66,94 <sup>B</sup>	1377,50 $\pm$ 68,55 <sup>A</sup>	1363,00 $\pm$ 68,77 <sup>A</sup>	1394,00 $\pm$ 174,27 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	30	1257,44 $\pm$ 90,52	1297,15 $\pm$ 93,35	1271,81 $\pm$ 111,42	1305,18 $\pm$ 137,94	1297,69 $\pm$ 112,16	1458,34 $\pm$ 104,49	NS	NS	NS
	60	1305,79 $\pm$ 117,80 <sup>b</sup>	1370,15 $\pm$ 50,43 <sup>a,b</sup>	1443,77 $\pm$ 103,94 <sup>a</sup>	1342,02 $\pm$ 79,96 <sup>b</sup>	1429,10 $\pm$ 80,63 <sup>a,b</sup>	1561,48 $\pm$ 15,71 <sup>a</sup>	NS	*	NS
Ácido hipúrico	0	1,18 $\pm$ 0,00 <sup>B</sup>	0,69 $\pm$ 0,10 <sup>B</sup>	0,86 $\pm$ 0,13 <sup>B</sup>	1,54 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	1,00 $\pm$ 0,14 <sup>A</sup>	1,48 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	12	0,77 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,22 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,24 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	0,95 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	0,18 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,27 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	NS	*	NS
	30	0,73 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,80 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	NS	*	NS
	60	0,71 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,76 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,04 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	NS	*	NS
Ácido benzoico	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
	12	0,15 $\pm$ 0,01 <sup>B,b</sup>	0,43 $\pm$ 0,04 <sup>B,a</sup>	0,37 $\pm$ 0,01 <sup>B,a</sup>	0,16 $\pm$ 0,03 <sup>A,b</sup>	0,47 $\pm$ 0,07 <sup>A,a</sup>	0,54 $\pm$ 0,00 <sup>A,a</sup>	*	*	NS
	30	0,19 $\pm$ 0,02 <sup>B,b</sup>	0,27 $\pm$ 0,09 <sup>B,a</sup>	0,42 $\pm$ 0,02 <sup>B,a</sup>	0,41 $\pm$ 0,00 <sup>A,b</sup>	0,53 $\pm$ 0,09 <sup>A,a</sup>	0,52 $\pm$ 0,04 <sup>A,a</sup>	*	*	NS
	60	0,21 $\pm$ 0,07 <sup>E</sup>	0,47 $\pm$ 0,03 <sup>D</sup>	0,46 $\pm$ 0,05 <sup>D</sup>	0,22 $\pm$ 0,01 <sup>E</sup>	0,57 $\pm$ 0,03 <sup>C,D</sup>	0,65 $\pm$ 0,03 <sup>C</sup>	*	*	*
Lactosa	0	2801,74 $\pm$ 181,13 <sup>B</sup>	2436,42 $\pm$ 141,12 <sup>B</sup>	2100,84 $\pm$ 123,14 <sup>B</sup>	3705,61 $\pm$ 220,82 <sup>A</sup>	3738,12 $\pm$ 98,78 <sup>A</sup>	4178,37 $\pm$ 164,20 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	12	161,70 $\pm$ 81,62 <sup>B</sup>	183,250 $\pm$ 59,39 <sup>B</sup>	182,74 $\pm$ 50,81 <sup>B</sup>	635,26 $\pm$ 63,32 <sup>A</sup>	729,30 $\pm$ 123,12 <sup>A</sup>	654,50 $\pm$ 41,53 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	30	290,01 $\pm$ 66,00 <sup>B</sup>	154,26 $\pm$ 95,60 <sup>B</sup>	192,16 $\pm$ 66,87 <sup>B</sup>	713,50 $\pm$ 125,06 <sup>A</sup>	790,85 $\pm$ 160,42 <sup>A</sup>	708,42 $\pm$ 111,63 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	202,7 $\pm$ 94,5 <sup>B</sup>	168,78 $\pm$ 75,69 <sup>B</sup>	99,60 $\pm$ 52,92 <sup>B</sup>	634,46 $\pm$ 64,18 <sup>A</sup>	693,86 $\pm$ 122,69 <sup>A</sup>	585,74 $\pm$ 85,14 <sup>A</sup>	*	NS	NS

	0	118,13±3,72	170,52±21,92	211,32±80,43	134,94±22,42	150,83±36,10	136,07±28,15	NS	NS	NS
Galactosa	12	713,14±345,58 <sup>B</sup>	726,31±21,39 <sup>B</sup>	673,84±28,35 <sup>B</sup>	823,48±34,84 <sup>A</sup>	785,93±17,76 <sup>A</sup>	794,34±92,20 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	30	716,10±53,35 <sup>B</sup>	658,00±28,21 <sup>B</sup>	674,58±58,81 <sup>B</sup>	774,00±52,20 <sup>A</sup>	745,56±39,29 <sup>A</sup>	764,10±30,12 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	709,55±52,69 <sup>B</sup>	693,77±11,27 <sup>B</sup>	654,24±48,25 <sup>B</sup>	764,68±42,35 <sup>A</sup>	765,67±27,32 <sup>A</sup>	782,71±26,82 <sup>A</sup>	*	NS	NS

nd, no detectado; NS, No significativo; \*p < 0,05.

‡ F1 = adición de LPD; F2 = adición de un cultivo adjunto

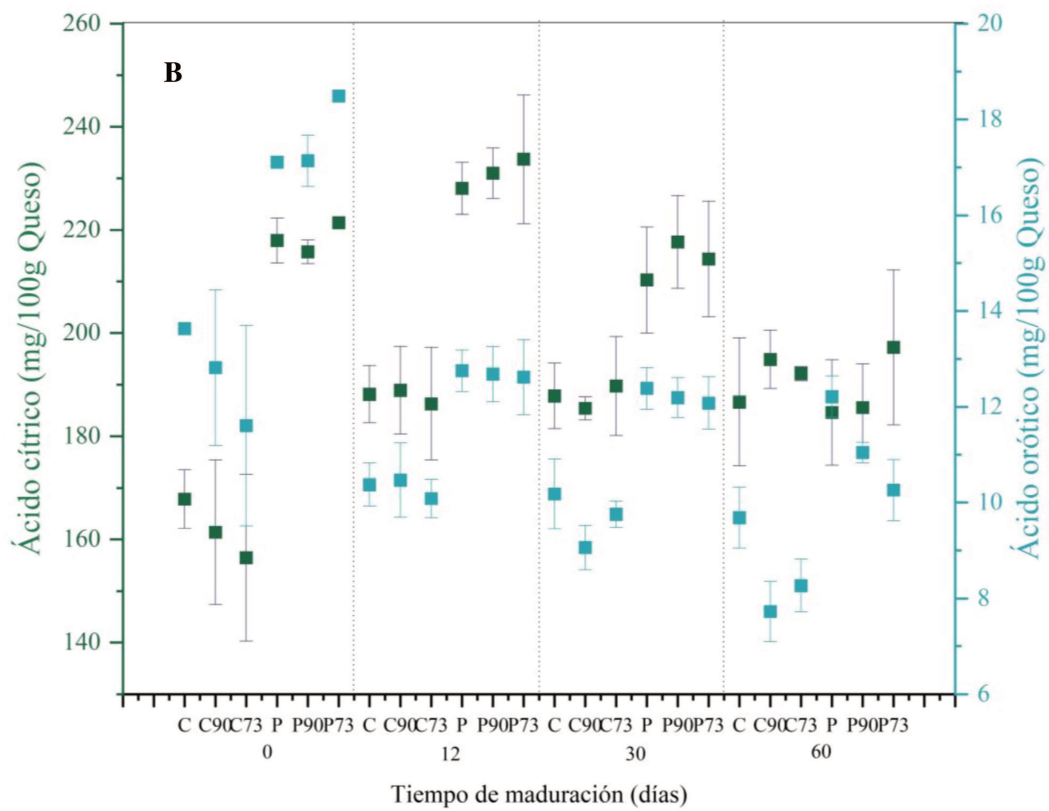
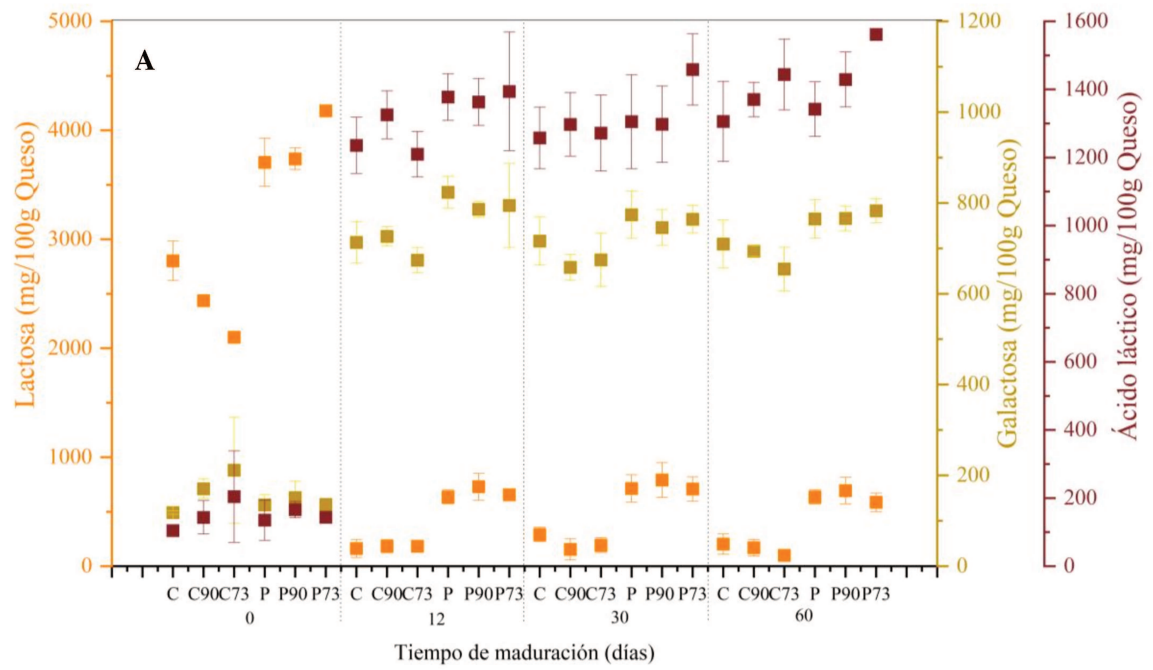
Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

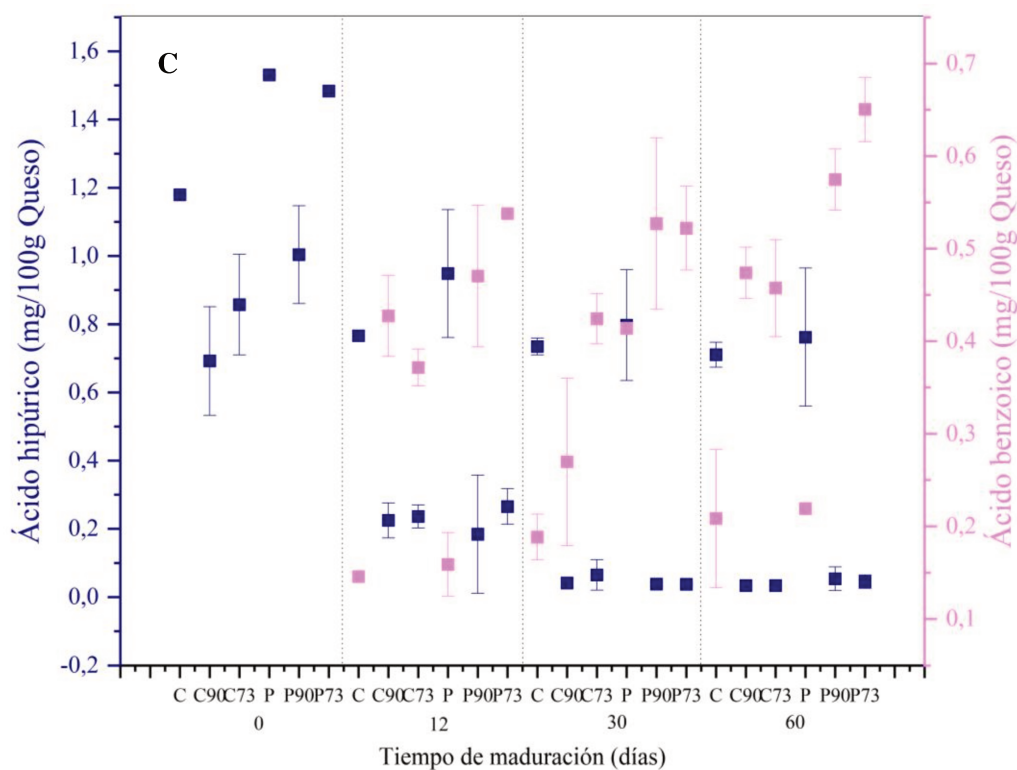
<sup>A,B</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) para F1.

<sup>a,b</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) para F2.

<sup>C,D,E</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05), cuando F1 x F2 es significativo







**Figura 68.** Niveles de carbohidratos (■, lactosa; ■, galactosa) y ácido láctico (■) (A), Ácidos cítrico (■), orótico (■) (B), hipúrico (■) y benzoico (■) (C) en quesos C, C90, C73, P, P90 y P73 a 0, 12, 30 y 60 días de maduración. Se presentan los valores medios  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas de elaboración, expresados en mg/100 g queso. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

<sup>A,B</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) para F1.

<sup>a,b</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) para F2.

<sup>C,D,E</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), cuando F1xF2 es significativo.

#### 4.5. Compuestos volátiles

Se identificaron un total de 24 y 20 compuestos volátiles en el espacio de cabeza de las muestras de queso a los 30 y 60 días de maduración, respectivamente. Los valores de área de los compuestos individuales se presentan en la Tabla 42. Estos compuestos se agruparon por familias químicas: cetonas, ésteres, aldehídos, alcoholes y ácidos. Se encontraron diferencias significativas para varios compuestos debido a los factores (F1 y F2) y su interacción (F1xF2). En particular, el uso de leche enriquecida con LPD condujo a un nivel más alto de la mayoría de los compuestos del grupo de los ácidos, algunos alcoholes y aldehídos, así como la mitad de las cetonas. Por otro lado, ambos cultivos adjuntos aumentaron 2-heptanona y 2-nonanona. Además, Lp90 aumentó el ácido acético, pero disminuyó los niveles de otros ácidos (hexanoico, octanoico) y aumentó la 2-hexanona. Por su parte, Lr73 incrementó los compuestos acetoína, 2-pentanol y 3-metilbutanal.

**Tabla 42.** Compuestos volátiles (expresados en unidades arbitrarias/1000) en queso Cremoso a los 30 y 60 días de maduración.

Compuestos volátiles	Tiempo de maduración (días)	Quesos						Significancia‡		
		C	C90	C73	P	P90	P73	F1	F2	F1xF2
<b>Cetonas†</b>	30	1296,3 <sup>B</sup>	1358,1 <sup>B</sup>	1305,6 <sup>B</sup>	1515,4 <sup>A</sup>	1538,2 <sup>A</sup>	1634,8 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	1006,8 <sup>D</sup>	881,1 <sup>D</sup>	994,6 <sup>D</sup>	940,8 <sup>D</sup>	991,3 <sup>D</sup>	1232,8 <sup>C</sup>	*	*	*
2-Propanona	30	57,6 <sup>A</sup>	52,4 <sup>A</sup>	67,4 <sup>A</sup>	47,2 <sup>B</sup>	51,3 <sup>B</sup>	50,4 <sup>B</sup>	*	NS	NS
	60	45,5	48,3	47,2	38,8	49,2	45,5	NS	NS	NS
2-Butanona	30	41,7	41,3	52,2	46,9	44,6	49,9	NS	NS	NS
	60	47,4	42,4	47,3	39,4	43,6	43,7	NS	NS	NS
2-Pentanona	30	75,6	81,8	70,2	101,5	113,1	115,2	NS	NS	NS
	60	157,1 <sup>C</sup>	37,1 <sup>E</sup>	49,3 <sup>E</sup>	103,3 <sup>D</sup>	50,3 <sup>E</sup>	47,2 <sup>E</sup>	*	*	*
2,3-Butanodiona	30	300,4 <sup>B</sup>	340,6 <sup>B</sup>	294,9 <sup>B</sup>	479,2 <sup>A</sup>	456,1 <sup>A</sup>	486,7 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	146,9 <sup>D</sup>	96,8 <sup>E</sup>	145,5 <sup>D</sup>	112,4 <sup>C,D</sup>	87,7 <sup>E</sup>	333,3 <sup>C</sup>	*	*	*
2-Hexanona	30	24,8	21,8	22,4	26,4	26,0	25,1	NS	NS	NS
	60	7,7 <sup>E</sup>	11,7 <sup>D</sup>	6,9 <sup>E</sup>	6,7 <sup>E</sup>	28,8 <sup>C</sup>	nd	*	*	*
2-Heptanona	30	20,9 <sup>B</sup>	20,2 <sup>B</sup>	19,8 <sup>B</sup>	27,3 <sup>A</sup>	23,8 <sup>A</sup>	27,7 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	15,3 <sup>B,b</sup>	22,9 <sup>B,a</sup>	23,3 <sup>B,a</sup>	27,5 <sup>A,b</sup>	34,6 <sup>A,a</sup>	36,6 <sup>A,a</sup>	*	*	NS
3-hidroxi 2-butanona	30	767,3	792,3	769,7	776,9	812,4	867,9	NS	NS	NS
	60	580,7 <sup>B,b</sup>	611,7 <sup>B,a,b</sup>	665,3 <sup>B,a</sup>	599,0 <sup>A,b</sup>	685,1 <sup>A,a,b</sup>	712,0 <sup>A,a</sup>	*	*	NS
2-Nonanona	30	7,9 <sup>B</sup>	8,0 <sup>B</sup>	9,1 <sup>B</sup>	10,1 <sup>A</sup>	11,0 <sup>A</sup>	11,8 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	6,3 <sup>E</sup>	10,2 <sup>D</sup>	9,8 <sup>D</sup>	13,8 <sup>C</sup>	12,0 <sup>D,C</sup>	14,4 <sup>C</sup>	*	*	*
<b>Ésteres†</b>	30	40,7	38,4	44,4	80,5	86,0	85,6	NS	NS	NS
	60	23,8 <sup>a</sup>	10,3 <sup>b</sup>	10,9 <sup>b</sup>	21,5 <sup>a</sup>	12,6 <sup>b</sup>	10,1 <sup>b</sup>	NS	*	NS
Butanoato de etilo	30	30,3	25,8	29,4	47,5	55,0	52,2	NS	NS	NS
	60	23,8 <sup>a</sup>	10,3 <sup>b</sup>	10,9 <sup>b</sup>	21,5 <sup>a</sup>	12,6 <sup>b</sup>	10,1 <sup>b</sup>	NS	*	NS
Hexanoato de etilo	30	10,4 <sup>B</sup>	12,6 <sup>B</sup>	15,0 <sup>B</sup>	18,8 <sup>A</sup>	15,6 <sup>A</sup>	18,4 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-
<b>Aldehídos†</b>	30	41,9	37,6	45,4	41,1	42,7	47,7	NS	NS	NS
	60	28,8 <sup>C</sup>	6,1 <sup>E</sup>	5,9 <sup>E</sup>	10,2 <sup>D</sup>	5,5 <sup>E</sup>	6,2 <sup>E</sup>	*	*	*
Acetaldehído	30	6,0 <sup>B</sup>	6,3 <sup>B</sup>	6,4 <sup>B</sup>	6,1 <sup>A</sup>	9,3 <sup>A</sup>	7,6 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	10,3 <sup>C</sup>	6,1 <sup>C,D</sup>	5,9 <sup>C,D</sup>	nd	5,5 <sup>D</sup>	6,2 <sup>C,D</sup>	*	*	*
3-metilbutanal	30	15,4 <sup>b</sup>	10,4 <sup>c</sup>	21,0 <sup>a</sup>	16,2 <sup>b</sup>	15,1 <sup>c</sup>	19,3 <sup>a</sup>	NS	*	NS

	60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-
Benzaldehído	30	20,5	20,9	18,0	18,8	18,3	20,8	NS	NS	NS
	60	18,5 <sup>C</sup>	nd	nd	10,2 <sup>D</sup>	nd	nd	*	*	*
<b>Alcoholes<sup>‡</sup></b>	30	51,9	42,5	46,4	56,4	56,6	60,7	NS	NS	NS
	60	15,3 <sup>E</sup>	12,2 <sup>E</sup>	17,6 <sup>E</sup>	109,9 <sup>C</sup>	19,3 <sup>E</sup>	48,9 <sup>D</sup>	*	*	*
Etanol	30	12,6	8,5	9,0	10,8	10,0	8,5	NS	NS	NS
	60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-
2-Butanol	30	23,3	19,6	23,8	25,2	22,2	29,2	NS	NS	NS
	60	nd	nd	nd	92,9 <sup>C</sup>	nd	24,9 <sup>D</sup>	*	*	*
1-Propanol	30	16,0 <sup>B</sup>	14,3 <sup>B</sup>	13,6 <sup>B</sup>	20,4 <sup>A</sup>	24,3 <sup>A</sup>	23,0 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	15,3	12,2	17,6	17,0	19,3	16,6	NS	NS	NS
2-Pentanol	30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-
	60	nd	nd	nd	nd	nd	7382 <sup>C</sup>	*	*	*
<b>Ácidos<sup>‡</sup></b>	30	379,8 <sup>B</sup>	360,5 <sup>B</sup>	357,7 <sup>B</sup>	661,6 <sup>A</sup>	685,6 <sup>A</sup>	705,7 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	417,7 <sup>E</sup>	493,5 <sup>E</sup>	458,1 <sup>E</sup>	872,4 <sup>C,D</sup>	803,2 <sup>D</sup>	923,1 <sup>C</sup>	*	NS	*
Acético	30	45,8	45,3	37,1	44,6	47,6	41,0	NS	NS	NS
	60	38,0 <sup>E</sup>	76,5 <sup>D</sup>	45,7 <sup>E</sup>	52,8 <sup>C,D</sup>	114,8 <sup>C</sup>	62,1 <sup>C,D</sup>	*	*	*
Butírico	30	106,8 <sup>B</sup>	102,3 <sup>B</sup>	113,5 <sup>B</sup>	204,3 <sup>A</sup>	203,6 <sup>A</sup>	208,4 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	180,2 <sup>E</sup>	193,1 <sup>E</sup>	200,2 <sup>E</sup>	328,6 <sup>C,D</sup>	281,4 <sup>D</sup>	339,5 <sup>C</sup>	*	*	*
Hexanoico	30	108,1 <sup>B</sup>	95,7 <sup>B</sup>	92,1 <sup>B</sup>	196,4 <sup>A</sup>	214,3 <sup>A</sup>	232,6 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	108,7 <sup>E</sup>	119,9 <sup>E</sup>	110,3 <sup>E</sup>	270,2 <sup>C</sup>	216,7 <sup>D</sup>	288,2 <sup>C</sup>	*	*	*
Octanoico	30	64,5 <sup>B</sup>	59,1 <sup>B</sup>	58,4 <sup>B</sup>	129,2 <sup>A</sup>	133,2 <sup>A</sup>	131,4 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	54,8 <sup>E</sup>	61,4 <sup>E</sup>	56,3 <sup>E</sup>	133,3 <sup>C</sup>	105,8 <sup>E</sup>	140,6 <sup>C</sup>	*	*	*
Decanoico	30	42,5 <sup>B</sup>	44,1 <sup>B</sup>	43,1 <sup>B</sup>	74,2 <sup>A</sup>	74,1 <sup>A</sup>	77,7 <sup>A</sup>	*	NS	NS
	60	27,8 <sup>B</sup>	33,6 <sup>B</sup>	33,9 <sup>B</sup>	72,2 <sup>A</sup>	67,1 <sup>A</sup>	76,8 <sup>A</sup>	*	NS	NS
Dodecanoico	30	12,1	14,1	13,5	12,9	12,8	14,6	NS	NS	NS
	60	8,2 <sup>B</sup>	9,1 <sup>B</sup>	11,6 <sup>B</sup>	15,3 <sup>A</sup>	17,3 <sup>A</sup>	15,9 <sup>A</sup>	*	NS	NS

nd, no detectado; NS, No significativo; \*p<0.05.

‡ F1 = adición de LPD; F2 = adición de cultivo adjunto

† Área total de cada familia química.

Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

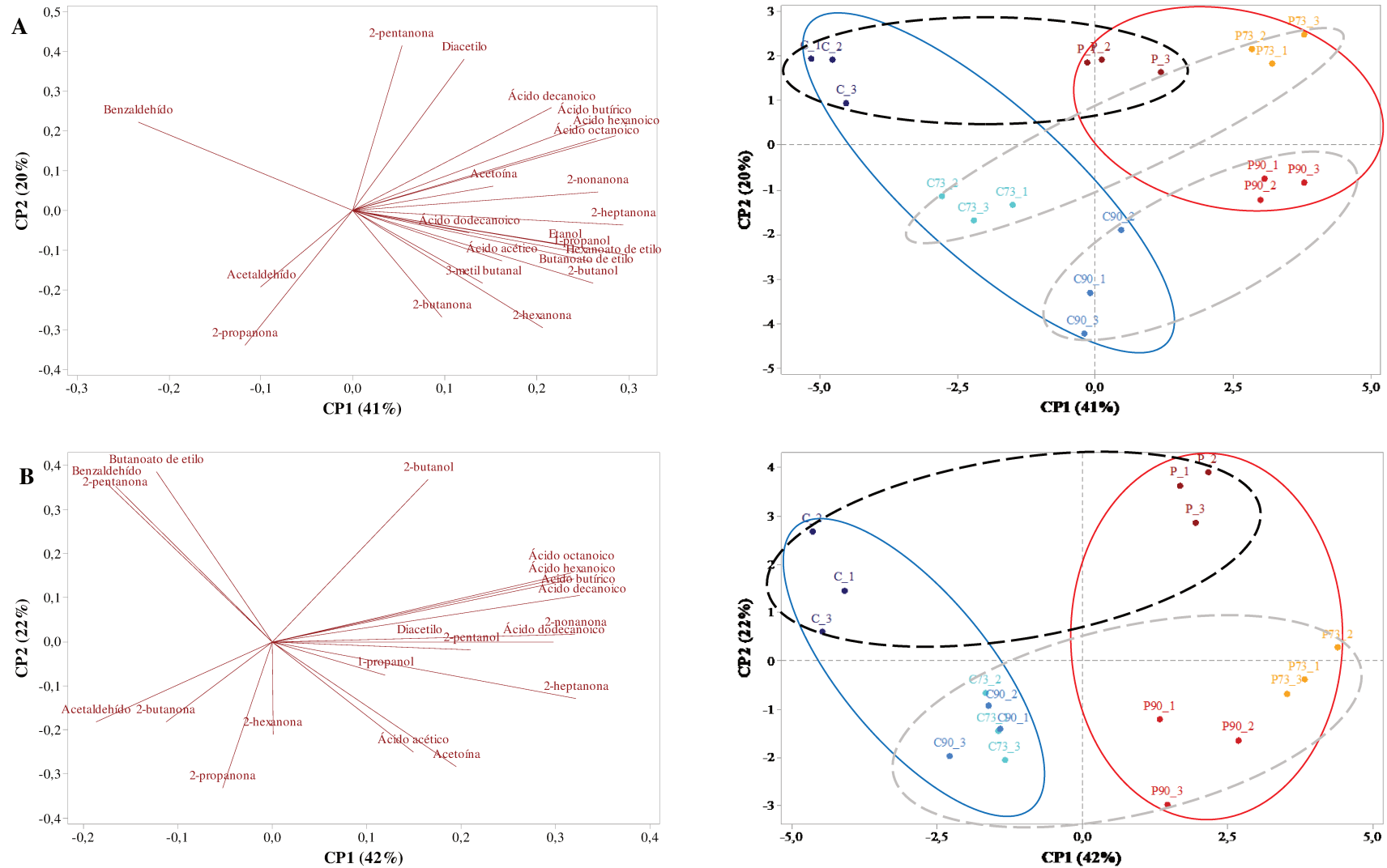
<sup>A,B</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) para F1.

<sup>a,b</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05) para F2.

<sup>C,D,E</sup> Los valores con diferente superíndice de una misma fila difieren significativamente (p < 0,05), cuando F1 x F2 es significativo.

Un ACP se aplicó a todos los compuestos volátiles y a todos los quesos en cada tiempo de maduración. Los primeros cuatro CP explicaron el 84% (30 días) y el 86% (60 días) de la varianza total. Los scores y loadings de CP1 vs. CP2 se muestran en la Figura 69. Se observó una clara separación de las muestras según el F1 (adición de LPD) a lo largo de CP1, tanto a los 30 como a los 60 días de maduración. Los quesos elaborados con leche enriquecida se caracterizaron por la mayoría de compuestos volátiles, mientras que una pequeña cantidad de compuestos, como benzaldehído, acetaldehído y 2-propanona, caracterizaron a los quesos elaborados sin adición de LPD. La incorporación de cultivos adjuntos (F2) también tuvo un impacto en la separación de los quesos a lo largo de CP1 y CP2 tanto a los 30 como a los 60 días de maduración.

La producción de compuestos volátiles depende principalmente de las propiedades enzimáticas de la microbiota del queso. Además, se ha informado que aproximadamente el 50% de los compuestos volátiles totales en los quesos derivan del catabolismo de aminoácidos (Yvon, 2006), algunos de los cuales fueron detectados en quesos con adición de cultivos adjuntos. En particular, Lr73 y Lp90 han demostrado actividades enzimáticas involucradas en el catabolismo de aminoácidos como glutamato deshidrogenasa y aminotransferasas hacia varios aminoácidos (Peralta et al., 2016b). Las diferencias en los perfiles de compuestos volátiles entre los quesos elaborados con y sin LPD podrían atribuirse a los diferentes niveles de algunos precursores de compuestos volátiles, como la lactosa, galactosa y citrato (Skeie et al., 2008). Esto también podría afectar las actividades enzimáticas de la microbiota del queso y la producción de compuestos volátiles derivados (Pedersen et al., 2013). Además, el tratamiento térmico de la leche durante el secado spray produce o libera varios compuestos y esto probablemente podría afectar los niveles de compuestos volátiles que se encuentran en los quesos elaborados con leche enriquecida con LPD (Karagül-Yüceer et al., 2001; Wolf et al., 2013).

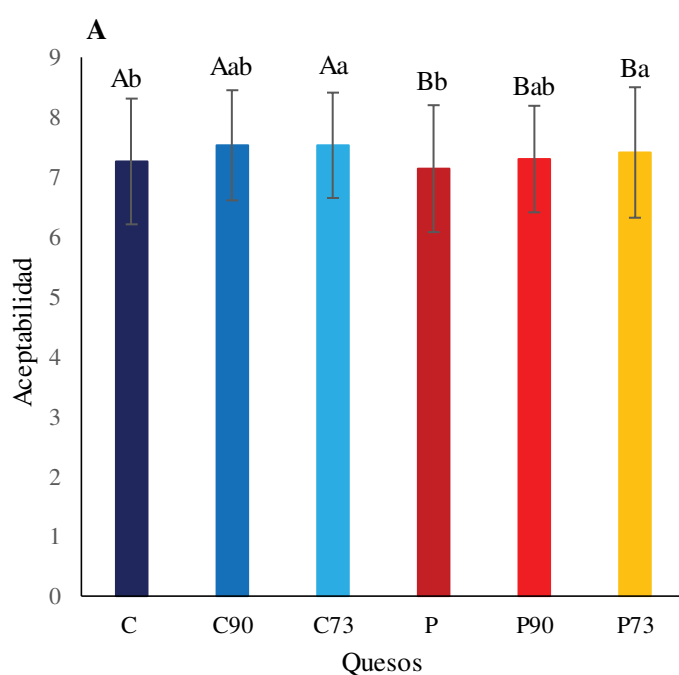


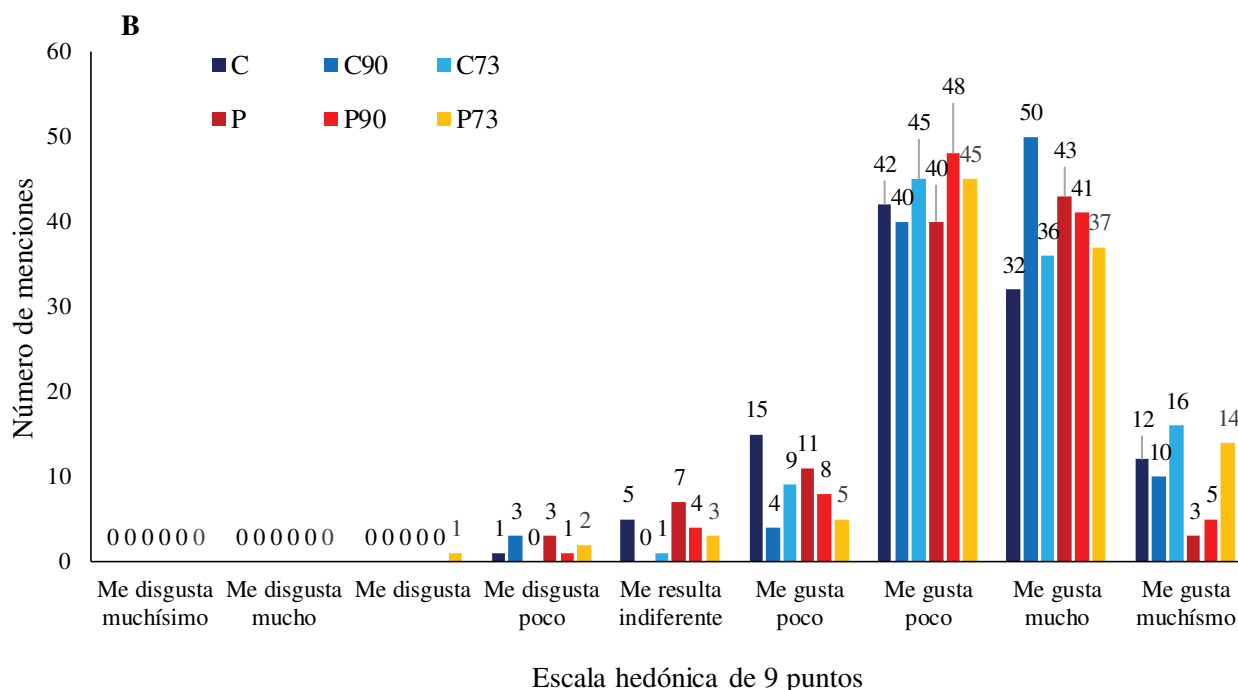
**Figura 69.** Análisis de Componentes Principales (ACP) de compuestos volátiles de los quesos Cremoso C(■), C90(■), C73(■), P(■), P90(■) y P73(■) a 30 (A) y 60 (B) días de maduración. Gráficos de loading (izquierda) y scores (derecha) de las variables y muestras de quesos analizadas para CP1 vs. CP2. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73); el último número después del guión indica el número de réplica. Las elipses encierran los quesos elaborados con (rojo) y sin adición de LPD (azul), y con (gris) y sin cultivos adjuntos (negro).

## 4.6. Análisis sensorial basado en consumidores

### 4.6.1. Aceptabilidad

Todos los quesos mostraron valores de aceptabilidad muy altos desde la perspectiva del consumidor; estos puntajes estuvieron entre 7,26 y 7,53 para todos los quesos (Figura 70A). Estos valores fueron superiores a los obtenidos previamente para este tipo de queso, lo que podría estar relacionado con algunas diferencias en la elaboración del queso y características de los mismos como el pH y la proteólisis (Burns et al., 2012). Además, el histograma de la escala hedónica fue muy similar para los seis tipos de queso (Figura 70B) y la mayoría de los valores estuvieron por encima de la indiferencia (puntuaciones > 5). Estos resultados indican que ambos factores estudiados (F1 y F2) permitieron mantener altos niveles de aceptabilidad por parte del consumidor, lo cual es fundamental desde el punto de vista comercial (Tugba, 2021). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los puntajes generales de aceptabilidad de los quesos (Figura 70A). Aquellos elaborados con leche enriquecida presentaron menor agrado general ( $p < 0,05$ ) que los que no tuvieron adición de LPD. Estos resultados podrían estar asociados a las diferencias en los quesos causadas por la adición de LPD a la leche de elaboración: aumento de carbohidratos y cambios en el perfil de compuestos volátiles, menor proteólisis y mayor retención de proteínas de suero, y aumento de la dureza. Anderson et al. (1993) observaron una disminución de los puntajes de textura y apariencia en quesos Cheddar elaborados con leche concentrada por evaporación al vacío, lo que se asoció con una menor proteólisis, un alto contenido de minerales y menores niveles de humedad, mientras que por el contrario la intensidad del sabor se incrementó ligeramente.





**Figura 70.** A) Gusto general de los quesos C(■), C90(■),C73(■),P(■),P90(■) y P73(■). Se presentan los valores medios ± desviación estándar. B) Histogramas de escala hedónica de 9 puntos correspondientes a las muestras de queso. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sinLPD y P-conLPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73- adición de la cepa Lr73).

<sup>A,B</sup> Los valores con letras diferentes difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) para F1.

<sup>a,b</sup> Los valores con letras diferentes difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) para F2.

F1: adición de LPD; F2: adición de un cultivo adjunto.

El impacto de los cultivos adjuntos en las características sensoriales de los quesos depende de sus actividades enzimáticas, que están involucradas en los cambios durante la maduración del queso (Thierry & Hannon, 2011). El gusto general de los consumidores por los quesos con la cepa Lr73 fue significativamente mayor en comparación con el queso sin cultivos adjuntos, lo que podría estar relacionado con la producción de compuestos volátiles de sabor y cambios en la producción de péptidos solubles. Por el contrario, la adición de Lp90 no tuvo efecto sobre la aceptabilidad del consumidor, teniendo valores similares a los encontrados para quesos sin cultivos adjuntos. Estos resultados reflejan que los cambios producidos por esta cepa en los quesos no afectaron las propiedades sensoriales desde la perspectiva del consumidor. Sin embargo, en trabajos anteriores, Lp90 demostró efectos tanto positivos como negativos sobre las características sensoriales de los quesos Cremoso. Se detectó una influencia positiva por medio de una prueba triangular de aroma por 12 panelistas no entrenados a los 30 días de maduración (Milesi et al., 2010), y por medio de un análisis sensorial cuantitativo por 10 panelistas entrenados a los 28 días de maduración (Peralta et al., 2020). Además, se encontró un efecto negativo mediante un análisis de aceptabilidad de consumidores a los 60 días de maduración (Burns et al.,



2012). Los resultados destacan que diferentes pruebas sensoriales podrían reflejar diferentes propiedades de los quesos y que el tiempo de maduración de los quesos analizados también es significativo. También es importante señalar que, en todos estos casos, Lp90 se cultivó y conservó de manera diferente en comparación con lo realizado en este capítulo, lo que también podría influir en la actividad metabólica de la cepa, como ha sido sugerido por otros investigadores (De Angelis et al., 2010). En efecto, en los trabajos anteriores, la cepa se adicionó luego de su crecimiento en el medio comercial MRS, tanto como cultivo fresco como deshidratado por spray en leche descremada, mientras que en el trabajo desarrollado en este capítulo ambas cepas se cultivaron en un medio formulado a partir de permeado de suero y luego se liofilizaron con maltodextrina/sacarosa.

#### 4.6.2. CATA

Se encontraron diferencias significativas entre las muestras en la frecuencia con que los consumidores eligieron 7 de los 27 términos incluidos en la pregunta CATA (Tabla 43). Los términos en los que las diferencias fueron significativas fueron: arricotado, pegajoso, sin sabor, brillante y poco agradable ( $p < 0,05$ ); y sabor extraño y sabor lácteo ( $p < 0,01$ ).

El Análisis de Correspondencias (AC) es un método de análisis de datos útil para visualizar las relaciones existentes entre los datos y la asociación entre dos variables. En este caso el AC se realizó sobre la matriz de frecuencias de mención de cada término. En la Figura 71 se muestra la representación de los atributos y las muestras en las primeras dos dimensiones del AC realizado sobre los resultados de la pregunta CATA. Las dos primeras dimensiones del análisis lograron explicar el 69,6 % de la inercia de los datos experimentales, representando el 35,7 % y 33,9 % de la variación, respectivamente. Las muestras se distribuyeron en cuatro grupos según sus similitudes en el AC (Figura 71): C73 y C90, asociados a los términos brillante, saludable, elástico, ácido, suave y salado; P y P73 asociados a dulce, amarillo, sabor lácteo y por ser consideradas agradables; P90 por su color blanco y textura pegajosa; y finalmente C por ser opaco, duro y amargo.

**Tabla 43.** Frecuencia relativa de la selección de cada uno de los 27 términos de la pregunta CATA para describir cada queso y los resultados del test Q de Cochran.

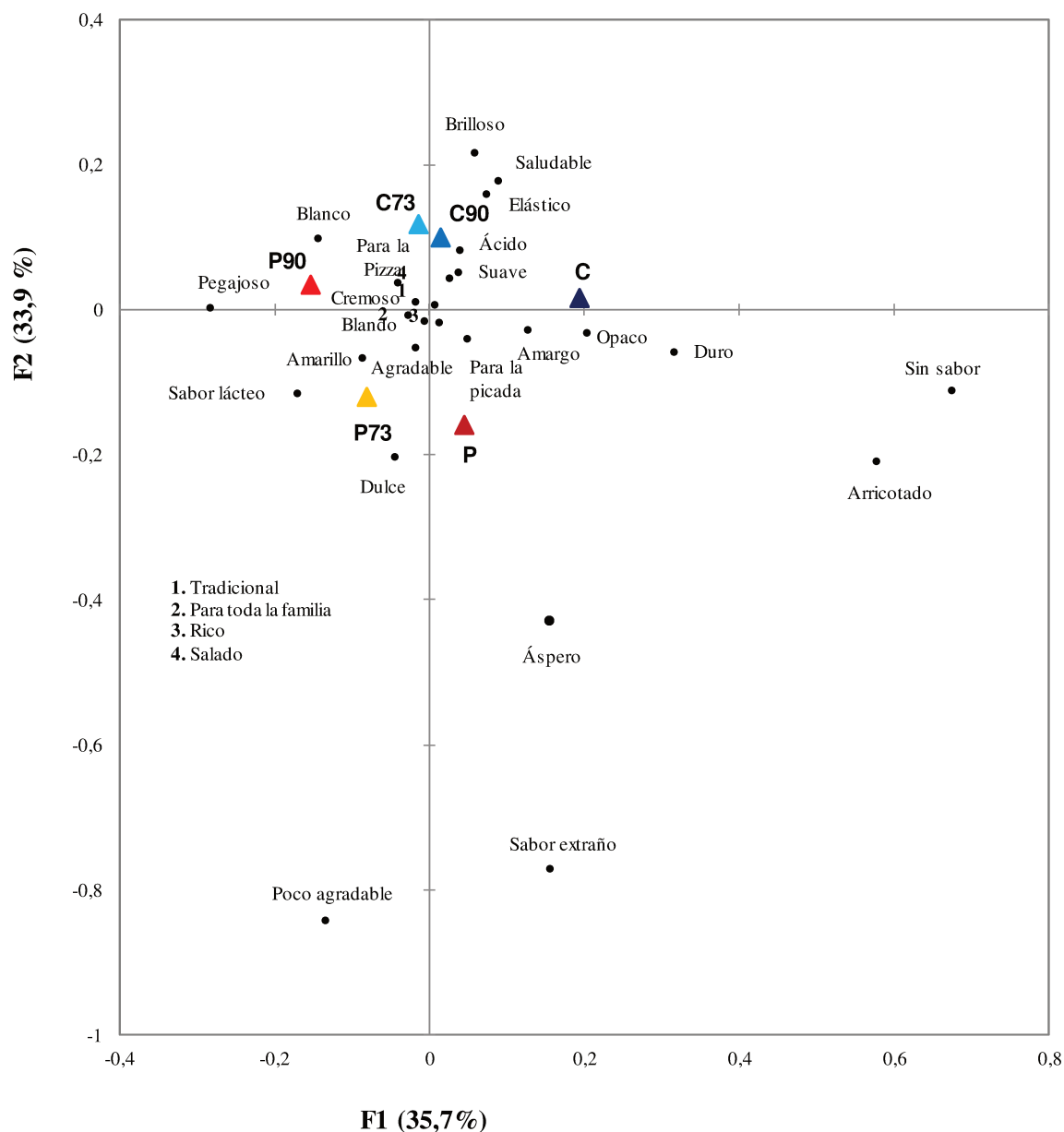
Términos	<i>p</i> - valores	Quesos						Significancia
		C	C90	C73	P	P90	P73	
Dulce	0,8774	0,028 <sup>a</sup>	0,009 <sup>a</sup>	0,028 <sup>a</sup>	0,028 <sup>a</sup>	0,028 <sup>a</sup>	0,037 <sup>a</sup>	NS
Blando	0,4813	0,598 <sup>a</sup>	0,710 <sup>a</sup>	0,682 <sup>a</sup>	0,664 <sup>a</sup>	0,701 <sup>a</sup>	0,673 <sup>a</sup>	NS
Elástico	0,0903	0,262 <sup>a</sup>	0,318 <sup>a</sup>	0,318 <sup>a</sup>	0,206 <sup>a</sup>	0,224 <sup>a</sup>	0,187 <sup>a</sup>	NS
Duro	0,5134	0,093 <sup>a</sup>	0,047 <sup>a</sup>	0,056 <sup>a</sup>	0,065 <sup>a</sup>	0,037 <sup>a</sup>	0,047 <sup>a</sup>	NS
Sabor extraño	0,0040	0,028 <sup>ab</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,009 <sup>a</sup>	0,103 <sup>b</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,047 <sup>ab</sup>	**
Para toda la familia	0,7807	0,393 <sup>a</sup>	0,449 <sup>a</sup>	0,449 <sup>a</sup>	0,467 <sup>a</sup>	0,449 <sup>a</sup>	0,402 <sup>a</sup>	NS
Sabor lácteo	0,0031	0,243 <sup>a</sup>	0,290 <sup>ab</sup>	0,271 <sup>ab</sup>	0,336 <sup>ab</sup>	0,439 <sup>b</sup>	0,411 <sup>ab</sup>	**
Amargo	0,4415	0,037 <sup>a</sup>	0,075 <sup>a</sup>	0,056 <sup>a</sup>	0,065 <sup>a</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,047 <sup>a</sup>	NS
Suave	0,3502	0,533 <sup>a</sup>	0,495 <sup>a</sup>	0,561 <sup>a</sup>	0,458 <sup>a</sup>	0,514 <sup>a</sup>	0,430 <sup>a</sup>	NS
Cremoso	0,0725	0,607 <sup>a</sup>	0,785 <sup>a</sup>	0,738 <sup>a</sup>	0,701 <sup>a</sup>	0,701 <sup>a</sup>	0,673 <sup>a</sup>	NS
Tradicional	0,9255	0,346 <sup>a</sup>	0,308 <sup>a</sup>	0,355 <sup>a</sup>	0,299 <sup>a</sup>	0,346 <sup>a</sup>	0,336 <sup>a</sup>	NS
Áspero	0,3734	0,037 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,047 <sup>a</sup>	0,028 <sup>a</sup>	0,028 <sup>a</sup>	NS
Rico	0,2882	0,561 <sup>a</sup>	0,654 <sup>a</sup>	0,495 <sup>a</sup>	0,551 <sup>a</sup>	0,570 <sup>a</sup>	0,579 <sup>a</sup>	NS
Arricotado	0,0219	0,084 <sup>ab</sup>	0,056 <sup>a</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,075 <sup>a</sup>	0,009 <sup>a</sup>	0,028 <sup>a</sup>	*
Para la picada	0,9947	0,243 <sup>a</sup>	0,234 <sup>a</sup>	0,215 <sup>a</sup>	0,234 <sup>a</sup>	0,215 <sup>a</sup>	0,234 <sup>a</sup>	NS
Pegajoso	0,0103	0,075 <sup>a</sup>	0,178 <sup>ab</sup>	0,178 <sup>ab</sup>	0,178 <sup>ab</sup>	0,271 <sup>b</sup>	0,168 <sup>ab</sup>	*
Ácido	0,5426	0,093 <sup>a</sup>	0,112 <sup>a</sup>	0,150 <sup>a</sup>	0,093 <sup>a</sup>	0,075 <sup>a</sup>	0,103 <sup>a</sup>	NS
Sin sabor	0,0181	0,093 <sup>b</sup>	0,028 <sup>ab</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,047 <sup>ab</sup>	0,019 <sup>a</sup>	0,019 <sup>a</sup>	*
Salado	0,1595	0,318 <sup>a</sup>	0,308 <sup>a</sup>	0,393 <sup>a</sup>	0,252 <sup>a</sup>	0,262 <sup>a</sup>	0,346 <sup>a</sup>	NS
Blanco	0,3624	0,103 <sup>a</sup>	0,103 <sup>a</sup>	0,140 <sup>a</sup>	0,075 <sup>a</sup>	0,159 <sup>a</sup>	0,121 <sup>a</sup>	NS
Para la pizza	0,2433	0,486 <sup>a</sup>	0,589 <sup>a</sup>	0,598 <sup>a</sup>	0,523 <sup>a</sup>	0,617 <sup>a</sup>	0,505 <sup>a</sup>	NS
Saludable	0,1191	0,215 <sup>a</sup>	0,187 <sup>a</sup>	0,243 <sup>a</sup>	0,121 <sup>a</sup>	0,168 <sup>a</sup>	0,140 <sup>a</sup>	NS
Agradable	0,6150	0,598 <sup>a</sup>	0,589 <sup>a</sup>	0,598 <sup>a</sup>	0,607 <sup>a</sup>	0,636 <sup>a</sup>	0,692 <sup>a</sup>	NS
Opaco	0,7109	0,084 <sup>a</sup>	0,075 <sup>a</sup>	0,084 <sup>a</sup>	0,084 <sup>a</sup>	0,037 <sup>a</sup>	0,065 <sup>a</sup>	NS
Amarillo	0,7416	0,084 <sup>a</sup>	0,121 <sup>a</sup>	0,121 <sup>a</sup>	0,140 <sup>a</sup>	0,131 <sup>a</sup>	0,121 <sup>a</sup>	NS
Brilloso	0,0300	0,187 <sup>ab</sup>	0,252 <sup>b</sup>	0,196 <sup>ab</sup>	0,140 <sup>ab</sup>	0,196 <sup>ab</sup>	0,093 <sup>a</sup>	*
Poco agradable	0,0320	0,009 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	0,009 <sup>ab</sup>	0,019 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>	0,047 <sup>b</sup>	*

NS: No Significativo ( $p \geq 0,05$ ) según el test Q de Cochran.

\*\* Indica diferencia significativa a  $p < 0,01$  según el test Q de Cochran.

\* Indica diferencia significativa a  $p < 0,05$  según el test Q de Cochran.

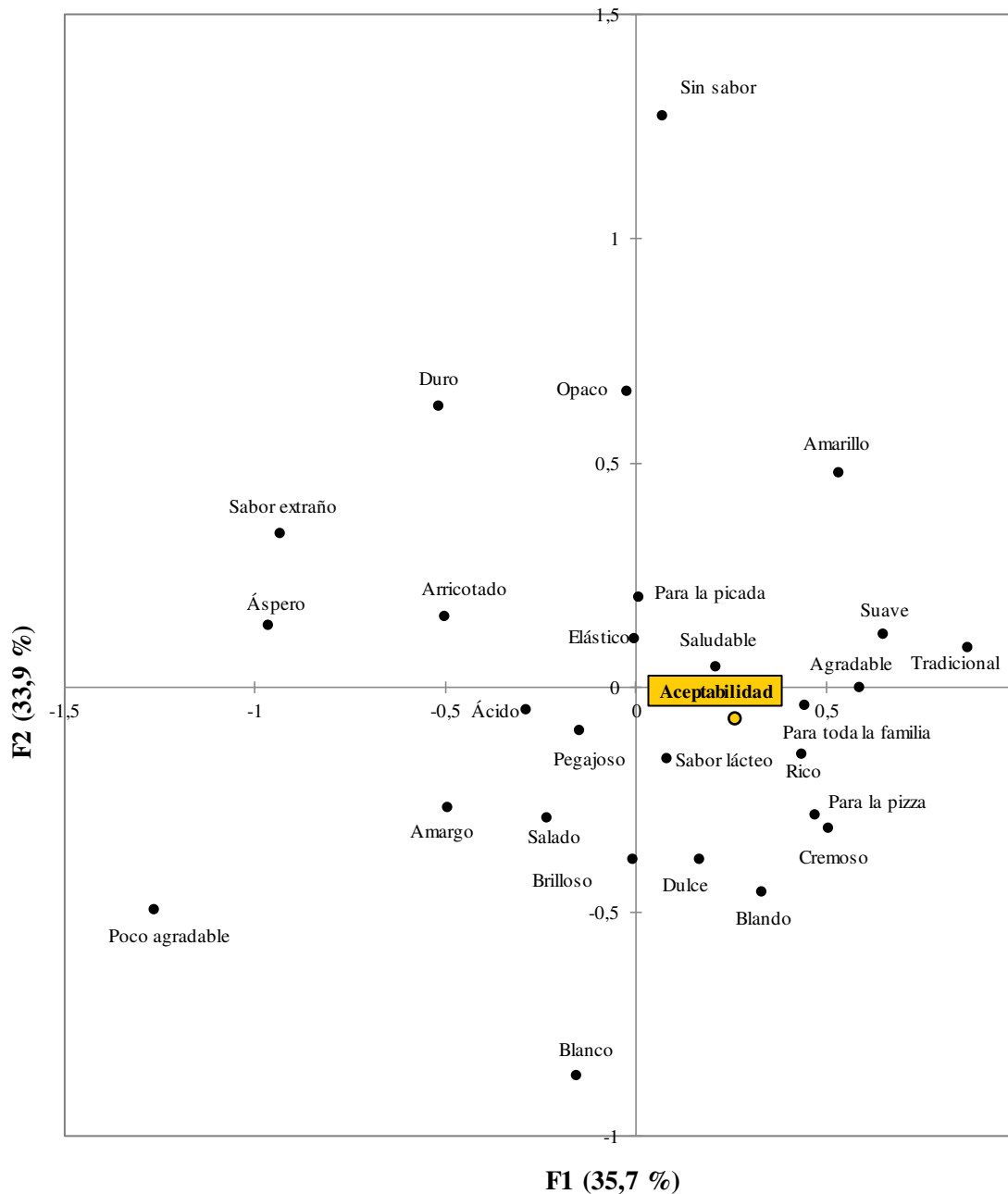
Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).



**Figura 71.** Representación de los atributos y las muestras en las primeras dos dimensiones correspondientes al Análisis de Correspondencia (AC) realizado sobre la tabla de contingencia de los resultados CATA obtenidos del análisis de todos los quesos: C, C90, C73, P, P90 y P73. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

Por su parte, el ACoP es un método para representar, visualizar y analizar en un gráfico objetos descritos por una matriz generada en este caso por las puntuaciones y los términos. En este caso, este análisis nos permite entender qué atributos estuvieron relacionados con la aceptabilidad de los consumidores, es decir, que los datos sensoriales de la pregunta CATA se estudiaron en combinación con los datos de aceptabilidad ya que es posible que los consumidores utilicen los términos CATA de manera distinta lo que conlleva a posibles diferencias en la percepción de los quesos, provocando diferencias en la aceptabilidad de los mismos. El ACoP mostró que el gusto de los consumidores se caracterizó por los términos: rico, para toda la familia y saludable (Figura

72), términos todos con inercia positiva en las características sensoriales de los quesos, como se describe más adelante en el Análisis de Penalización.

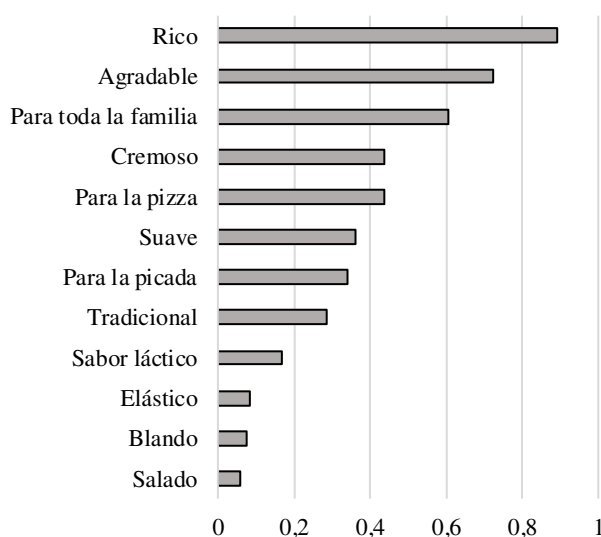


**Figura 72.** Representación de los ejes F1 y F2 del Análisis de Coordenadas Principales (ACO-P) aplicado a la pregunta CATA y a la aceptabilidad realizada en todos los quesos: C, C90, C73, P, P90 y P73. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

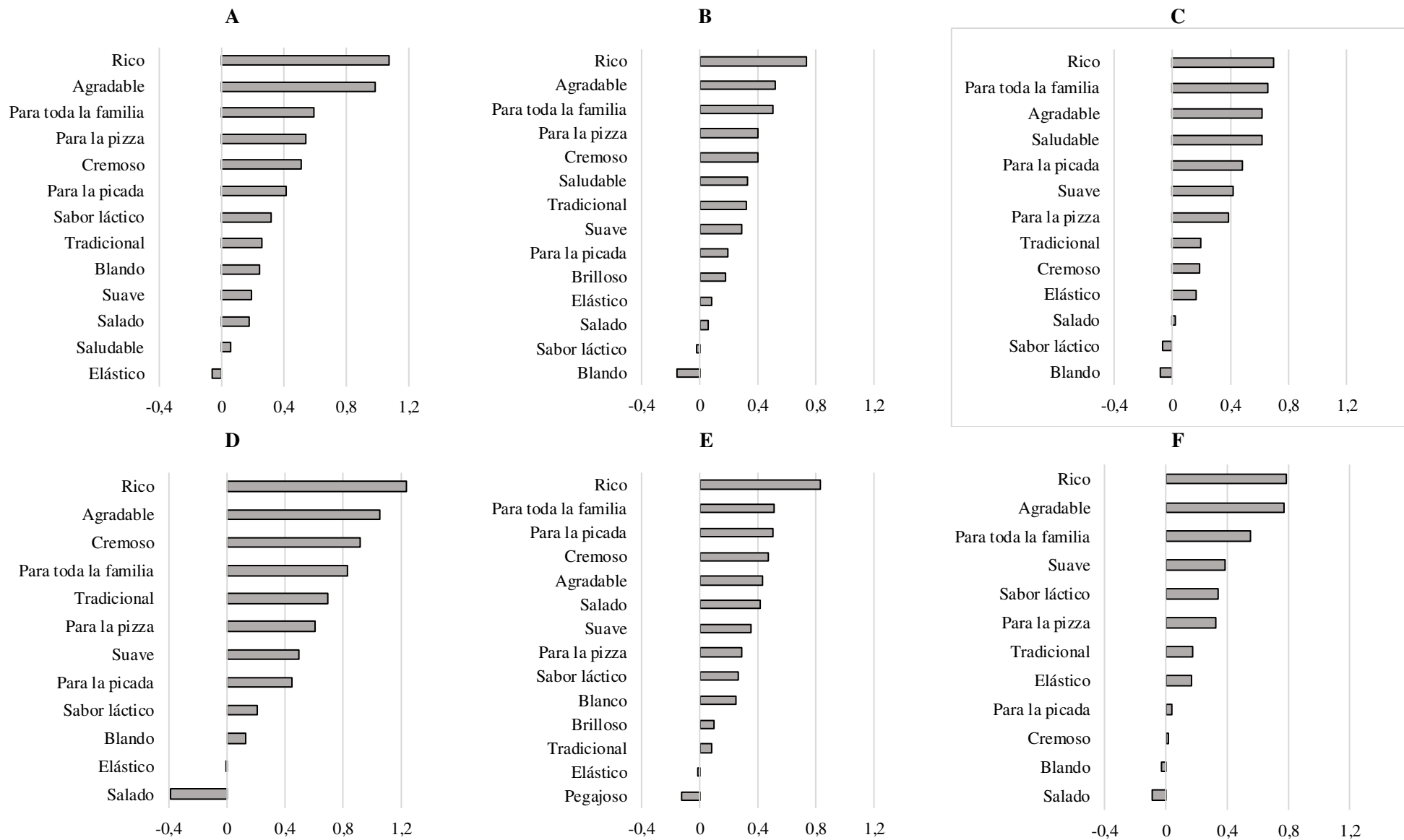
### 4.6.3. Análisis de Penalizaciones

Los términos que tuvieron mayor impacto positivo global fueron: rico, agradable, para toda la familia, cremoso y para la pizza (Figura 73). Esto se corresponde con la mayor inercia positiva dada por los términos: rico, agradable y para toda la familia para todos los quesos (Figura 74A a

74E). Además, también se encontró un impacto positivo por los términos cremoso y para la pizza para quesos C y C90 (Figura 74A y 74B), saludable y para la picada para el queso C73 (Figura 74C), cremoso, tradicional y para la pizza para el queso P (Figura 74D), cremoso y para la picada para el queso P90 (Figura 74E). El Cremoso es uno de los quesos con mayor nivel de producción y de consumo en nuestro país; tiene un sabor lácteo y suave. Diferentes texturas son aceptadas y preferidas por diferentes consumidores, que varían desde una textura ligeramente elástica hasta una consistencia cremosa y pegajosa (López Morales et al., 2017). Estas características concuerdan con los términos que mostraron un impacto positivo en el análisis de penalización. Cabe destacar que no se detectaron términos con un impacto negativo importante; el único término con una inercia negativa baja fue salado para el queso P (Figura 74D). El queso Cremoso se caracteriza por tener un nivel intermedio de sal; en este sentido, se ha asociado el salado con un impacto negativo en las características sensoriales de este queso (Ramonda, 2009). Zalazar et al. (2002) reportaron una influencia negativa de niveles altos de ácido láctico en el sabor y aroma de quesos Cremoso bajos en grasa. Sin embargo, en este capítulo, aunque se encontraron mayores niveles de ácido láctico en los quesos elaborados con fermentos adjuntos, no influyó negativamente en sus propiedades sensoriales. Probablemente otros compuestos de aroma y sabor producidos por los cultivos añadidos enmascararon la influencia negativa del ácido lácteo. En efecto, el sabor del queso depende de un delicado equilibrio de varios compuestos (Singh et al., 2003).



**Figura 73.** Análisis de penalización aplicado a los resultados globales de todas las muestras de queso: C, C90, C73, P, P90 y P73. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sin LPD y P-con LPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).



**Figura 74.** Análisis de penalización aplicado a las muestras de queso. A) C, B) C90, C) C73, D) P, E) P90, F) P73. Quesos: el primer carácter indica el nivel de F1 (C-sinLPD y P-conLPD); el número de la etiqueta de cada queso indica el nivel de F2 (sin número-sin adjunto, 90- adición de la cepa Lp90, 73-adición de la cepa Lr73).

## 5. Conclusiones

La adición de 5,2 % de LPD a la leche de elaboración podría aumentar la capacidad de la planta quesera en alrededor de un 50 %, sin afectar en gran medida la calidad y aceptabilidad del queso. En este sentido, se observaron algunos cambios leves, como niveles más altos de NSLAB, cambios en los perfiles peptídicos y en las propiedades de textura, y una mayor retención de proteínas de suero. La adición de LPD no afectó la capacidad de fusión, una propiedad importante para el queso Cremoso ya que se utiliza en muchas ocasiones para la pizza.

El aumento de los carbohidratos fermentables debido a la adición de LPD a la leche de elaboración podría favorecer el desarrollo de microorganismos adventicios y potencialmente perjudiciales. Sin embargo, esto puede ser evitado con la incorporación de los cultivos adjuntos Lp90 y Lr73, que mostraron un desempeño adecuado, tanto en quesos elaborados con leche control como enriquecida. En efecto, estas cepas produjeron cambios favorables en los quesos como el aumento de compuestos con propiedades conservantes y aromáticas. Estos cambios son positivos para controlar la microbiota adventicia y mejorar las propiedades sensoriales de los quesos. En particular, las propiedades sensoriales se mejoraron con la inclusión de la cepa Lr73. Ambas cepas Lp90 y Lr73 también aumentaron la proteólisis y disminuyeron la dureza y masticabilidad del queso al final de la maduración. Finalmente, los cultivos adjuntos no provocaron defectos comunes que se pueden presentar en este tipo de queso, como post-acidificación o formación de ojos no deseados. Los resultados del presente capítulo destacan la robustez de las características tecnológicas de estas cepas, que mantuvieron sus propiedades independientemente de la composición de la leche de elaboración.

A su vez, los quesos Cremoso elaborados con leche enriquecida con LPD tuvieron muy buena aceptabilidad por parte de los consumidores. En este capítulo se verificó la importancia del análisis sensorial para evaluar el impacto de las diferentes estrategias estudiadas en quesos. Además, se identificaron términos con impacto positivo y negativo en la aceptabilidad del queso Cremoso, los cuales son importantes para futuros estudios sobre este tipo de queso.

De esta manera, la elaboración de queso Cremoso con leche enriquecida mediante la adición de leche descremada en polvo sería una buena alternativa para alcanzar una mayor producción quesera diaria sin afectar significativamente la calidad del producto final. Además, el uso de cualquiera de los cultivos adjuntos ensayados es recomendable.

## Conclusiones

---



En este trabajo de tesis se identificaron estrategias para mejorar la calidad de quesos y aumentar el rendimiento. Las intervenciones estuvieron basadas en el uso de fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos pertenecientes a la colección del INLAIN y la aplicación de tecnologías de membranas e incorporación de polvos lácteos a la leche de elaboración.

En primer lugar, se implementaron y optimizaron metodologías, y se puso en marcha instrumental y equipamiento indispensable para el desarrollo de la tesis. Estas herramientas quedaron disponibles y aumentaron el patrimonio analítico y tecnológico de nuestro Instituto. Se demostró la factibilidad y utilidad del análisis de la formación de ojos en quesos mediante tomografía computarizada. En nuestro país, no hay antecedentes sobre el uso de esta herramienta analítica en muestras de alimentos. El seguimiento de la formación de ojos durante la maduración mediante una metodología no destructiva aporta datos que facilitan el planteo de ajustes en el proceso en el caso que aparezcan defectos. También se puso en marcha y se establecieron protocolos de uso del equipo de membranas para obtener leche concentrada y del instrumento Optigraph para analizar la influencia de diferentes parámetros en las propiedades de coagulación de la leche de quesería.

Las experiencias realizadas con el Optigraph permitieron conocer el comportamiento de la leche concentrada frente a diferentes niveles de algunas variables de elaboración y, en base a los resultados obtenidos, optimizar la tecnología casearia antes de llevar adelante las elaboraciones con leche con diversas modificaciones en su composición. El uso de leche concentrada mediante UF o por la incorporación de polvos lácteos (LPD y PSM) modificó los parámetros de coagulación, en forma variable según la dosis de coagulante utilizada y la adición o no de calcio. Se determinó que, en general, el uso de una dosis de coagulante estandarizada por volumen de leche da como resultado un gel de características similares al control de leche sin concentrar, y por lo tanto permite una manipulación similar de la cuajada en la tina quesera. Los quesos obtenidos a partir de leche concentrada mostraron diferencias de textura y comportamiento de fusión, dependiendo del nivel y método de concentración y, en el caso particular de la leche UF, de la dosis de coagulante utilizada, y también incrementaron significativamente el rendimiento.

En cuanto al uso de fermentos adjuntos, se verificó que las distintas cepas autóctonas estudiadas poseen propiedades específicas, lo que las hace adecuadas para objetivos particulares, tales como acelerar la maduración, incrementar la producción de compuestos de flavour, consumir azúcares residuales, ya sea en forma individual o en un mix para provocar un efecto aditivo de las características deseables. Además de otorgar cualidades de aroma y flavour, la adición de fermentos adjuntos como estrategia de mejora de la calidad quesera se basa principalmente en inhibir defectos; en este sentido, hallamos que la cepa Lp90 fue capaz de evitar la producción de ojos no deseados por bacterias adventicias, incluso cuando se presentaron episodios de corte de

cadena de frío. Si bien este hallazgo destaca la robustez del fermento, la cadena de frío debe mantenerse correctamente para todos los productos.

La filtración de la leche de quesería mediante filtro bolsa de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro no fue útil para evitar la formación de ojos no deseados en el queso, por lo que esta propuesta se descartó en las experiencias subsiguientes. Interpretamos que el tipo de filtración no fue suficiente para evitar la presencia de partículas núcleo de ojos en la masa del queso, y la adopción de otros dispositivos de filtrado como membranas cerámicas no es una solución efectiva desde el punto de vista económico para las empresas queseras pequeñas y medianas.

La formulación de leche de quesería concentrada mediante el agregado de LPD combinada con el uso de fermentos adjuntos permitieron obtener productos aceptables para los consumidores, con diferencias menores con respecto a los quesos tradicionales, e incrementar además el rendimiento quesero alrededor de un 50 %.

Las líneas de trabajo iniciadas en este trabajo de tesis abren posibilidades de nuevas investigaciones. El diseño de fermentos con varias cepas complementarias, y la factibilidad de la aplicación de tecnologías de membrana o incorporación de polvos lácteos en otras tecnologías son algunos ejemplos.

## Bibliografía

---

- Acharya, M. R., & Mistry, V. V. (2004). Comparison of effect of vacuum-condensed and ultrafiltered milk on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4004-4012. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73541-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73541-9)
- Agrawal, P., & Hassan, A. N. (2007). Ultrafiltered milk reduces bitterness in reduced-fat Cheddar cheese made with an exopolysaccharide-producing culture. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3110-3117. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0049>
- Aitken, B., Agustin, M. A., & Clarke, P. T. (1999). *Recombined milk and milk products: New special milk powders for recombined and reconstituted evaporated milk*. Special issue of the International Dairy Federation SI-9902 (pp.87–89). Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Alencar, N. M. M., Ribeiro, T. G., Barone, B., Barros, A. P. A., Marques, A. T. B., & Behrens, J. H. (2019). Sensory profile and check-all-that-apply (cata) as tools for evaluating and characterizing syrah wines aged with oak chips. *Food Research International*, 124, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.052>
- Anderson, D. L., Mistry, V. V., Brandsma, R. L., & Baldwin, K. A. (1993). Reduced fat Cheddar cheese from condensed milk. 1. Manufacture, composition, and ripening. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 2832–2844. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77622-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77622-5)
- Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, 50(1), 45-55. <https://doi.org/10.1017/S0022029900032519>
- Anema, S. G. (2009). Effect of milk solids concentration on the pH, soluble calcium and soluble phosphate levels of milk during heating. *Dairy Science and Technology*, 89(5), 501-510. <https://doi.org/10.1051/dst/2009026>
- Anema, S. G., & Li, Y. (2003). Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*, 70(1), 73-83. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005903>
- ANMAT (2020). Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Código Alimentario Argentino. Cap. VIII: Alimentos lácteos. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo\\_viii\\_lacteos\\_actualiz\\_2020-01.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteos_actualiz_2020-01.pdf)
- Annibaldi, S.; Ferri, F., & Mora, R. (1977). Nuovi orientamenti nella valutazione tecnica del latte: Tipizzazione lattodinamografica. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 28, 115–126.
- Antonsson, M.; Molin, G., & Ardö, Y. (2003). Lactobacillus strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology*. 85(1-2), 159-169. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00536-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00536-6)
- Ardisson-Korat, A. V., & Rizvi, S. S. H. (2004). Vatless manufacturing of low-moisture part-skim Mozzarella cheese from highly concentrated skim milk microfiltration retentates. *Journal of Dairy Science*, 87(11), 3601-3613. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73498-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73498-0)
- Ardö, Y. (1999). Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions. En Y. Ardö (Ed.), *Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation Part 2* (pp. 4-9). Bulletin. IDF/FIL, 337.
- Ardö, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* 24(2), 238-242. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.005>

- Ares, G., Alcaire, F., Antúnez, L., Vidal, L., Giménez, A., & Catsura, J. (2017). Identification of drivers of (dis) liking based on dynamic sensory profiles: Comparison of Temporal Dominance of Sensations and Temporal Check-all-that-apply. *Food Research International*, 92, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.12.016>
- Ares, G., Etchemendy, E., Antúnez, L., Vidal, L., Giménez, A., & Jaeger, S. R. (2014). Visual attention by consumers to check-all-that-apply questions: Insights to support methodological development. *Food Quality and Preference*, 32, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.10.006>
- Aryana, K. J., & Haque, Z. U. (2001). Effect of commercial fat replacers on the microstructure of low-fat Cheddar cheese. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(2), 169-177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00446.x>
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Gaya, P., & Garde, S. (2020). Effect of a nisin-producing lactococcal starter on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(10), 3343-3349. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14598>
- Bacher, T., & Kønigsfeldt, P. (2000). WPI by microfiltration of skim milk. *European Dairy Magazine*, 12(5), 14-16.
- Bachmann, H.-P., Fröhlich-Wyder, M.-T., Jakob, E., Roth, E., Wechsler, D., Beuvier, E., & Buchin, S. (2011). Cheese | Raw Milk Cheeses. En J. W. Fuquay, P. J. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 652–660). Academic Press. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00519-7>
- Bancalari, E., Montanari, C., Levante, A., Alinovi, M., Neviani, E., Gardini, F., & Gatti, M. (2020). *Lactobacillus paracasei* 4341 as adjunct culture to enhance flavor in short ripened Caciotta-type cheese. *Food Research International*, 135, 109284. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109284>
- Bancalari, E., Sardaro, M. L. S., Levante, A., Marseglia, A., Caligiani, A., Lazzi, C. ... & Gatti, M. (2017). An integrated strategy to discover *Lactobacillus casei* group strains for their potential use as aromatic starters. *Food Research International*, 100, 682-690. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.066>
- Banks, J. M. (2007). Ultrafiltration of cheesemilk. En P. L. H. McSweeney. (Ed.) *Cheese Problems Solved*, (pp. 30-33). Woodhead Publishing Limited. Cambridge. England. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.30>
- Banks, J. M., Law, A. J. R., Leaver, J., & Horne, D. S. (1994). The inclusion of whey proteins in cheese. An overview. En D. B. Emmons (Ed.), *Cheese yield and factors affecting its control*, (pp. 387-401). IDF seminar in Cork (Ireland), International Dairy Federation.
- Banks, J. M., Muir, D. D., & Williams, A. G. (1998). Manipulation of the NSLAB population in cheddar cheese--effect on sensory character. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(2), 126.
- Bansal, N., Fox, P. F., & McSweeney, P. L. (2007). Factors affecting the retention of rennet in cheese curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9219-9225. <https://doi.org/10.1021/jf071105p>

- Batistela, M. E. (2022) *Desarrollo de un medio de cultivo económico para la producción de biomasa de Lactocaseibacillus rhamnosus 73: potencial metabólico y aplicación en quesería*. (Tesis de grado) Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Bautista-Gallego, J., Alessandria, V., Fontana, M., Bisotti, S., Taricco, S., Dolci, P. ... & Rantsiou, K. (2014). Diversity and functional characterization of *Lactobacillus* spp. isolated throughout the ripening of a hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.020>
- Bencini, R. (2002). Factors affecting the clotting properties of sheep milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(7), 705-719. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1101>
- Benfeldt, C. (2006). Ultrafiltration of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 16, 600-608. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.016>
- Beresford, T. (2007). What factors affect microbial growth in cheese? En P.L.H. McSweeney (Ed.), *Cheese Problem Solved* (pp. 119-123). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Beresford, T. P. (2003). Non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and cheese quality. En G. Smit. (Ed.). *Dairy processing: Improving quality* (pp. 448-469). CRC Press, Cambridge, Inglaterra.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 259-274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
- Beresford, T., & Williams, A. (2004). The microbiology of cheese ripening. En P. Fox., P.L. McSweeney, T. Cogan, & T. Guinee (Eds.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects* (pp. 287-318). Academic Press. Elsevier.
- Bergamini, C, Giménez, P., Meinardi, C., Wolf, V., George, G., Zacarías, M. F., ... & Hynes, E. (2022). Los quesos argentinos de mayor difusión. Pasta semidura. En J Reinheimer, C Meinardi, E Hynes, MC Perotti, VB Suárez. (Eds.), *Los quesos argentinos. Producción, características y nuevas propuestas*. (pp. 97-132). Ediciones UNL, Santa Fe, Argentina.
- Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Quiberoni, A., Suárez, V. B., & Zalazar, C. A. (2005). Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*, 38(5), 597-604. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.11.013>
- Bergamini, C. V., Hynes, E., & Zalazar, C. A. (2006). Influence of probiotic bacteria in the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16(8), 856-866. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.004>
- Blakesley, R. W., & Boezi, J. A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry*, 82(2), 580-582. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90197-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90197-X)
- Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3611-3629. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>
- Bodmer, S., Imark, C., & Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Research*, 48, 296-300. DOI:10.1007/s000110050463

- Boor, K., & Fromm, H. (2006). Managing microbial spoilage in the dairy industry. *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 171-193. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.2.171>
- Børsting, M. W., Qvist, K. B., & Ardö, Y. (2014). Influence of pH on retention of camel chymosin in curd. *International Dairy Journal*, 38(2), 133-135. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.001>
- Bouton, Y., Buchin, S., Duboz, G., Pochet, S., & Beuvier, E. (2009). Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Food Microbiology*, 26(2), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.09.002>
- Bradley, R. L., Arnold, E., Barbano, D. M., Semerad, R. G., Smith, D. E., & Vines, B. K. (1992). Chemical and physical methods. En R. Marshall (Ed.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Product* (pp. 433-531). Washington, DC, USA: American Public Health Association.
- Brans, G. B. P. W., Schroën, C. G. P. H., Van der Sman, R. G. M., & Boom, R. M. (2004). Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of Membrane Science*, 243(1-2), 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2004.06.029>
- Briggiler-Marcó, M., Capra, M. L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J. A., & Hynes, E. (2007). Nonstarter Lactobacillus strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4532-4542. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0180>
- Brito, C., Astete, M. A., Pinto, M., & Molina, L. H. (2000). Maribo cheese manufactured with concentrated milk: Characteristics, maturation and yield. *International Journal of Dairy Technology*, 53(1), 6-12. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2000.tb02649.x>
- Broadbent J. R., Budinich M. F., & Steele, J. L. (2011) Cheese | Non-Starter Lactic Acid Bacteria. En: J. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2<sup>nd</sup> ed., pp. 639-644). San Diego, USA: Academic Press: Elsevier.
- Broadbent, J. R., Gummalla, S., Hughes, J. E., Johnson, M. E., Rankin, S. A., & Drake, M. A. (2004). Overexpression of *Lactobacillus casei* D-hydroxyisocaproic acid dehydrogenase in cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4814-4820. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4814-4820.2004>
- Broadbent, J. R., Houck, K., Johnson, M. E., & Oberg, C. J. (2003). Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nonstarter bacteria in reduced-fat Cheddar-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2773-2782. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73874-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73874-0)
- Broome, M. C., Tan, S. E., Alexander, M. A., & Manser, B. (1998). Low-concentration-ratio ultrafiltration for Cheddar cheese manufacture: part 1: effect on seasonal cheese composition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(1), 5.
- Bruzzone, F., Vidal, L., Antúnez, L., Giménez, A., Deliza, R., & Ares, G. (2015). Comparison of intensity scales and CATA questions in new product development: Sensory characterisation and directions for product reformulation of milk desserts. *Food Quality and Preference*, 44, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.04.017>

- Bude-Ugarte M., Guglielmotti D.M., Giraffa G., Reinheimer J., & Hynes E. R. (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. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.12.2983>
- Burns, P., Cuffia, F., Milesi, M., Vinderola, G., Meinardi, C., Sabbag, N., & Hynes, E. (2012). Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. *Food Microbiology*, 30(1), 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.015>
- Bylund, G. (2015). *Dairy processing handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund.
- Bynum, D. G., & Olson, N. F. (1982). Influence of curd firmness at cutting on yield and recovery of milk constituents. *Journal of Dairy Science*, 65(12), 2281-2290. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82498-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82498-3)
- Cadena, R. S., Caimi, D., Jaunarena, I., Lorenzo, I., Vidal, L., Ares, G., ... & Giménez, A. (2014). Comparison of rapid sensory characterization methodologies for the development of functional yogurts. *Food Research International*, 64, 446-455. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.027>
- Cadwallader, K., & Singh, T. (2009). Flavours and Off-Flavours in Milk and Dairy Products. En: P. McSweeney, P. Fox. (Eds.) *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-84865-5_14)
- Candioti, M. C., Alonso, M. J., & Hynes, E. (2007). Influence of residual milk-clotting enzyme and proteolysis on melting properties of soft cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 60(3), 175-181. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00333.x>
- Caplan, Z., & Barbano, D. M. (2013). Shelf life of pasteurized microfiltered milk containing 2% fat. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 8035-8046. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6657>
- Cardamone, L., Quiberoni, A., Mercanti, D. J., Fornasari, M. E., Reinheimer, J. A., & Guglielmotti, D. M. (2011). Adventitious dairy *Leuconostoc* strains with interesting technological and biological properties useful for adjunct starters. *Dairy Science & Technology*, 91(4), 457-470. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0022-9>
- Carles, C., & Dumas, B. R. (1985). Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine  $\alpha$ 1-casein: Comparison of the behaviour of this substrate with that of  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins. *FEBS letters*, 185(2), 282-286. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80923-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80923-6)
- Casanova, F., Silva, N. F. N., Gaucheron, F., Nogueira, M. H., Teixeira, A. V., Perrone, I. T., ... & de Carvalho, A. F. (2017). Stability of casein micelles cross-linked with genipin: A physicochemical study as a function of pH. *International Dairy Journal*, 68, 70-74. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.006>
- Catarino, I., Martins, A. P., Duarte, E., Prudêncio, E. S., & de Pinho, M. N. (2013). Rennet coagulation of sheep milk processed by ultrafiltration at low concentration factors. *Journal of Food Engineering*, 114(2), 249-254. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.013>
- Chen, G. Q., Leong, T. S., Kentish, S. E., Ashokkumar, M., & Martin, G. J. (2019). Membrane separations in the dairy industry. En: C. M. Galanakis (Ed.), *Separation of functional molecules in food by membrane technology*. (pp. 267-304). Academic Press.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. CRC press.



- Chevanan, N., & Muthukumarappan, K. (2007). Effect of calcium and phosphorus, residual lactose, and salt-to-moisture ratio on the melting characteristics and hardness of Cheddar cheese during ripening. *Journal of Food Science*, 72(4), E168-E176. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00330.x>
- Christen, G. L.; Davidson, P. M.; McAllister, J. S. & Roth, L. A. (1993). Coliform and other indicator bacteria. En T. T. Marshall. (Ed.), *Standard Methods for the Examination of dairy products*. (pp. 247-269) Washington: American Public Health Association (APHA).
- Christensen T. M. I. E., Kristiansen K R & Werner H (1991) Casein hydrolysis in cheese manufactured traditionally and by ultrafiltration technique. *Milchwissenschaft*, 46, 279–283.
- Cicotello, J., Wolf, I. V., D'Angelo, L., Guglielmotti, D. M., Quiberoni, A., & Suárez, V. B. (2018). Response of *Leuconostoc* strains against technological stress factors: Growth performance and volatile profiles. *Food Microbiology*, 73, 362-370. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.010>
- Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., Penasa, M., & Bittante, G. (2012). Comparison between mechanical and near-infrared methods for assessing coagulation properties of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6806-6819. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5551>
- Clark, E. C. S. (2009). Swiss cheese and related products. *The Sensory Evaluation of Dairy Products*, 427-457. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-77408-4\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-77408-4_14)
- Cogan, T. M., Beresford, T. P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N. P., & Ustunol, Z. (2007). Invited review: advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*, 90(9), 4005-4021. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-765>
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., & Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841-866. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00304-0)
- Creamer, L. K., M. Iyer, & J. Lelievre. (1987). Effect of various levels of rennet addition on characteristics of Cheddar cheese made from ultrafiltered milk. *New Zealand journal of dairy science and technology*, 22, 205-214.
- Crow, V., Curry, B., Christison, M., Hellier, K., Holland, R., & Liu, S. Q. (2002). Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2), 99-105.
- Crow, V., Curry, B., & Hayes, M. (2001). The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 275-283. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00057-7)
- Cuffia, F. (2016). *Biogeneración de aroma en quesos duros por fermentos primarios y adjuntos de bacterias lácticas*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina.
- Cuffia, F., Bergamini, C. V., Hynes, É. R., Wolf, I. V., & Perotti, M. C. (2020). Evaluation of autochthonous cultures to improve the cheese flavor: A case study in hard cheese model. *Food Science and Technology International*, 26(2), 173-184. <https://doi.org/10.1177/1082013219881512>
- Cuffia, F., Bergamini, C. V., Wolf, I. V., Hynes, E. R., & Perotti, M. C. (2019). Influence of the culture preparation and the addition of an adjunct culture on the ripening profiles of hard

- cheese. *Journal of Dairy Research*, 86(1), 120-128. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000870>
- Cunha, C. R., Viotto, L. A., & Viotto, W. H. (2004). Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced-fat Minas Frescal cheese manufacture: effect on yield and sensory properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57(4), 231-236. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00129.x>
- Cunha, C. R., Viotto, W. H., & Viotto, L. A. (2006). Use of low concentration factor ultrafiltration retentates in reduced fat "Minas Frescal" cheese manufacture: Effect on composition, proteolysis, viscoelastic properties and sensory acceptance. *International Dairy Journal*, 16(3), 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.03.004>
- da Conceição Jorge, É., Mendes, A. C. G., Auriema, B. E., Cazedey, H. P., Fontes, P. R., Ramos, A. D. L. S., & Ramos, E. M. (2015). Application of a check-all-that-apply question for evaluating and characterizing meat products. *Meat Science*, 100, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.002>
- Dalgleish, D. G. (1980). Effect of milk concentration on the rennet coagulation time. *Journal of Dairy Research*, 47(2), 231-235. <https://doi.org/10.1017/S0022029900021105>
- Dalgleish, D. G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. En: P.F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (2<sup>nd</sup> ed, pp. 69-100). Elsevier Appl. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_3)
- Düsterhöft, E. M., Engels, W., & van den Berg, G. (2011). Cheese e Dutch-type cheeses. En J. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (2<sup>nd</sup> ed, pp. 721-727). San Diego, CA, USA: Academic Press: Elsevier.
- Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 449-467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
- Daly, D., McSweeney, P. L. H., & Sheehan, J. J. (2010). Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses-A review. *Dairy Science & Technology*, 90(1), 3-26. <https://doi.org/10.1051/dst/2009036>
- D'Angelo, L., Cicotello, J., Zago, M., Guglielmotti, D., Quiberoni, A., & Suárez, V. (2017). *Leuconostoc* strains isolated from dairy products: response against food stress conditions. *Food Microbiology*, 66, 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.001>
- Dave, R. I., McMahon, D. J., Oberg, C., & Broadbent, J. R. (2003). Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of Mozzarella cheeses made using direct acidification. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 114-126. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73590-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73590-5)
- Daviau, C., Famelart, M. H., Pierre, A., Goudéranche, H., & Maubois, J. L. (2000). Rennet coagulation of skim milk and curd drainage: Effect of pH, casein concentration, ionic strength and heat treatment. *Le Lait*, 80(4), 397-415. <https://doi.org/10.1051/lait:2000134>
- De Angelis, M., Calasso, M., Di Cagno, R., Siragusa, S., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2010). NADP-glutamate dehydrogenase activity in nonstarter lactic acid bacteria: effects of temperature, pH and NaCl on enzyme activity and expression. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1763-1774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04804.x>

- De Angelis, M., Di Cagno, R., Huet, C., Crecchio, C., Fox, P. F., & Gobbetti, M. (2004). Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1336-1346. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1336-1346.2004>
- De Kruif, C.G., & Holt, C. (2003). Casein Micelle Structure, Functions and Interactions. En: P.F. Fox & P.L.H. McSweeney (Eds) *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. (pp. 223-276). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_5)
- De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2019). Use of autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making Pecorino Crotonese cheese: Effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. *Food Research International*, 116, 1344-1356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.024>
- Dejmek P., & Walstra P. (2004).. The syneresis of rennet-coagulated curd. En: P.F. Fox, P. McSweeney, T. Cogan, T. Guinee (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology. Vol. 1. General Aspects* (pp. 71-104). Elsevier, London.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273-285. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.002>
- Di Cagno, R., De Pasquale, I., De Angelis, M., Buchin, S., Rizzello, C. G., & Gobbetti, M. (2014). Use of microparticulated whey protein concentrate, exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus*, and adjunct cultures for making low-fat Italian Caciotta-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 72-84. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7078>
- Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., & Gobbetti, M. (2006). Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *International Dairy Journal*, 16(2), 119-130. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.01.012>
- Domínguez, M., Kleiman, E., Vaudagna, V, Gutierrez, J.A., & Masana, M. (2016). *Diagnóstico de la situación actual de los requerimientos de calidad e inocuidad alimentaria y ambientales para las materias primas y productos procesados en argentina* (pp.15-93). Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- Downey, W. K., & Murphy, R. F. (1970). The temperature-dependent dissociation of  $\beta$ -casein from bovine casein micelles and complexes. *Journal of Dairy Research*, 37(3), 361-372. <https://doi.org/10.1017/S002202990001339X>
- Dudley, E. G., & Steele, J. L. (2005). Succinate production and citrate catabolism by Cheddar cheese nonstarter lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 14-23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02440.x>
- Düsterhöft, E. M., Engels, W., & van den Berg, G. (2011). Cheese e Dutch-type cheeses. En J. Fuquay, P. F. Fox, & P. L. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (2<sup>nd</sup> ed, pp. 721-727). San Diego, CA, USA: Academic Press: Elsevier.
- El Soda, M.; Madkor, S. A., & Tong, P. S. (2000). Adjunct cultures: recent developments and potential significance to cheese industry. A review. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 609-619. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74920-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74920-4)
- El-Alfy, M. B., Shenana, M. E., Hassaan, H. M., Sania, M. A., & Nasr, W. I. (2008). Using ultrafiltered (UF) retentate in Mozzarella cheese making. *Alexandria Journal of Food*

- Science and Technology Special Volume Conference*, 45-60.  
<https://doi.org/10.1533/9781845693534.30>
- Elwell, M. W., & Barbano, D. M. (2006). Use of microfiltration to improve fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, 89, E20-E30. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72361-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72361-X)
- Engels, W., Hazelwood, L., & Düsterhöft, E. M. (2012). Efficient and versatile model systems for innovations in cheese. *DMZ, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*, 133(Special Edition), 16-21.
- Farkye, N. Y. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 91-98. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00146.x>
- Fedorov, A., Beichel, R., Kalpathy-Cramer, J., Finet J., Fillion-Robin, J. C., Pujol, S., ..., & Kikinis, R. (2012). 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magnetic Resonance Imaging*, 30(9), 1323-1341. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.05.001>
- Foguel, A., Neves Rodrigues Ract, J., & Claro da Silva, R. (2021). Sensory characterization of commercial cream cheese by the consumer using check-all-that-apply questions. *Journal of Sensory Studies*, 36(4), e12658. <https://doi.org/10.1111/joss.12658>
- Fontaneto Apoca, A. (2017). *Defectos gasógenos en quesos provocados por microorganismos*. Trabajo Final Integrador, Especialización en Ciencia y Tecnología de la Leche y Productos Lácteos (UNL).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2021). Dairy market review: Overview of global dairy market developments in 2020, April 2021. Rome. <http://www.fao.org/>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2022). FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Forde, A., & Fitzgerald, G. F. (2000). Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 484-489. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00130-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00130-0)
- Fox, P. F. (1988). Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 10(6), 522-535.
- Fox, P. F., & Brodtkorb, A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18(7), 677-684. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.002>Get rights and content
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017a). Principal families of cheese. En P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, P. L. McSweeney. (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 27-69). Boston, MA.: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_3)
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017b). Enzymatic Coagulation of Milk. En P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, P. L. McSweeney. (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 185-229). Boston, MA: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7)

- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., & McSweeney, P.L.H. (2017c). Cheese Yield. En: P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, P. L. McSweeney. (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 279-331). Boston, MA.: Springer, [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_10)
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., & McSweeney, P.L.H. (2017d). Cheese Structure, Rheology and Texture. En: P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, P. L. McSweeney. (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 475-532). Boston, MA: Springer, [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_14)
- Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (Eds.). (2004). *Cheese: chemistry, physics and microbiology, Volume 1: General Aspects*. Elsevier.
- Francolino, S., Locci, F., Ghiglietti, R., Iezzi, R., & Mucchetti, G. (2010). Use of milk protein concentrate to standardize milk composition in Italian citric Mozzarella cheese making. *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 310-314.
- Frank, J. F.; Christen, G. L. & Bullerman, L. B. (1993). Tests for groups of microorganisms. En R. T. Marshall. (Ed.) *Standard Methods for the Examination of dairy products*. (pp. 271-286) Washington: American Public Health Association (APHA).
- Fröhlich-Wyder, M.T., & Bachmann H. P. (2007). Swiss cheese. What factors affect eye development in Swiss cheese? En P.L.H. McSweeney (Ed.), *Cheese Problems Solved* (pp. 248-249). Cambridge: UK: Woodhead Publishing.
- Fröhlich-Wyder, M. T., Bisig, W., Guggisberg, D., Jakob, E., Turgay, M., & Wechsler, D. (2017). Cheeses with propionic acid fermentation. En P. L. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotter, D.W. Everett (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, (pp. 889-910). Academic Press: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00035-1>
- Furtado M. M. (2007). Principais defeitos dos Queijos de estilo suíço. En Furtado M. (Ed.), *Queijos com olhaduras*. (pp 143-158) Fonte Comunicações e Editora Ltda.
- Furtado M. M. (2008). Formación de ojos en quesos: aspectos cruciales. 1 §. parte. *Tecnología Láctea Latinoamericana*. 51, 8-15.
- Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., & Biavati, B. (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 22, S58-S66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.003>
- Galli, B. D., Baptista, D. P., Cavalheiro, F. G., & Gigante, M. L. (2019). *Lactobacillus rhamnosus* GG improves the sensorial profile of Camembert-type cheese: An approach through flash-profile and CATA. *LWT*, 107, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.077>
- Gan, H. H., Yan, B., Linforth, R. S., & Fisk, I. D. (2016). Development and validation of an APCI-MS/GC-MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity. *Food Chemistry*, 190, 442-447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.096>
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45(4), 473-483. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>
- Gauna, A. (2005). Elaboración de quesos de pasta semidura con ojos. *Cuaderno Tecnológico N° 3. Lácteos*. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Proyecto Mejora de la Eficiencia y de la Competitividad de la Economía Argentina. <https://www.inti.gov.ar/lacteos/pdf/cuadernotecnologico3.pdf>

- Giménez, P., Peralta, G. H., Guglielmotti, D., Audero, G., Páez, R., Hynes, E. R., & Bergamini, C. V. (2021). Preventing undesired eye formation in soft cheese. *International Dairy Journal*, *116*, 104958. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104958>
- Giménez, P., Peralta, G. H., Hynes, E. R., & Bergamini, C. V. (2018). Contenido de aminos biógenas en quesos argentinos. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, *102*, 42-47.
- Glover, F. A. (1985). *Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry* (pp. 141-151). Reading, England: National Institute for Research in Dairying.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., & Fox, P. F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*, *45*(2), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.016>
- Gobbetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P. F., & De Angelis, M. (2018). Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, *78*, 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010>
- Gómez-Ruiz, J. Á., Cabezas, L., Martínez-Castro, I., González-Viñas, M. Á., & Poveda, J. M. (2008). Influence of a defined-strain starter and *Lactobacillus plantarum* as adjunct culture on volatile compounds and sensory characteristics of Manchego cheese. *European Food Research & Technology*, *227*, 181-190. DOI: 10.1007/s00217-007-0708-7
- Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Bostley, A. L., Johnson, M. E., & Lucey, J. A. (2004). Standardization of milk using cold ultrafiltration retentates for the manufacture of Parmesan cheese. *Journal of Dairy Science*, *87*(9), 2789-2799. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73406-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73406-2)
- Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., Wang, T., & Lucey, J. A. (2005). Use of cold ultrafiltered retentates for standardization of milks for pizza cheese: Impact on yield and functionality. *International Dairy Journal*, *15*(6-9), 941-955. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.017>
- Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Martinelli, C., Johnson, M. E., & Lucey, J. A. (2011). Standardization of milk using cold ultrafiltration retentates for the manufacture of Swiss cheese: Effect of altering coagulation conditions on yield and cheese quality. *Journal of Dairy Science*, *94*(6), 2719-2730. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3842>
- Goy, D., Guggisberg, D., Haldemann, J., Jakob, E., Wechsler, D. (2014). Formation d'ouverture indésirable dans le Gruyère AOP. *Agroscope Transfer*, *23*, 1-16.
- Gripon, J. C.; Desmazeaud, M. J.; Le Bars, D., & Bergère, J. L. (1975). Etude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, *55*(548), 502-516. <https://doi.org/10.1051/lait:197554828>
- Guggisberg, D., Fröhlich-Wyder, M.T., Irmeler, S., Greco, M., Wechsler, D., & Schuetz, P. (2013). Eye formation in semi-hard cheese: X-ray computed tomography as a non-invasive tool for assessing the influence of adjunct lactic acid bacteria. *Dairy Science & Technology*, *93*(2), 135-149. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0105-2>
- Guggisberg, D., Loosli, S., Blaser, C., Badertscher, R., & Schmidt, R. (2022). Impact of cheese milk cold storage on milk coagulation properties, calcium contents, and cheese yield. *International Dairy Journal*, *134*, 105465. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105465>

- Guggisberg, D., Schuetz, P., Winkler, H., Amrein, R., Jakob, E., Fröhlich-Wyder, M.T., ... , & Wechsler, D. (2015). Mechanism and control of the eye formation in cheese. *International Dairy Journal*, 47, 118-127. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.03.001>.
- Guglielmotti, D. M., Suárez, V. B., Binetti, A. G., Mercanti, D. J., Quiberoni, A. D. L., Lloréns, R. D., ... & Reinheimer, J. A. (2021). Microorganismos alterantes en la industria láctea: Incidencia regional en los últimos 20 años. En: J. A. Reinheimer (Ed.) *Avances y tendencias en la industria láctea. La contribución argentina desde el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)* (pp-196-208). Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.
- Guinee, T. P., Gorry, C. B., O'Callaghan, D. J., O'Kennedy, B. T., O'Brien, N., & Fenelon, M. A. (1997). The effects of composition and some processing treatments on the rennet coagulation properties of milk. *International Journal of Dairy Technology*, 50(3), 99-106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01747.x>
- Guinee, T. P., Mulholland, E. O., Kelly, J., & Callaghan, J. O. (2007). Effect of protein-to-fat ratio of milk on the composition, manufacturing efficiency, and yield of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(1), 110-123. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72613-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72613-9)
- Guinee, T. P., O'Kennedy, B. T., & Kelly P. M. (2006). Effect of milk protein standardization using different methods on the composition and yields of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 468-482. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72110-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72110-5)
- Guinee, T. P., Pudja, P. D., & Mulholland, E. O. (1994). Effect of milk protein standardization, by ultrafiltration, on the manufacture, composition and maturation of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 61(1), 117-131. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028119>
- Guinee, T.P., O'Callaghan, D.J., Pudja, P.D., & O'Brien, N. (1996) Rennet coagulation properties of retentates obtained by ultrafiltration of skim milks heated to different temperatures. *International Dairy Journal*, 6(6), 581-596. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00061-5](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00061-5)
- Guinee, T. P., Pudja, P. D., Reville, W. J., Harrington, D., Mulholland, E. O., Cotter, M., & Cogan, T. M. (1995). Composition, microstructure and maturation of semi-hard cheeses from high protein ultrafiltered milk retentates with different levels of denatured whey protein. *International Dairy Journal*, 5(6), 543-568. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)00021-G](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)00021-G)
- Güler, Z. (2014). Profiles of organic acid and volatile compounds in acid-type cheeses containing herbs and spices (surk cheese). *International Journal of Food Properties*, 17(6), 1379-1392. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.697957>
- Hannon J. A., Deutsch S. M., Madec M. N., Gassi J. Y., Chapot-Chartier M. P., & Lortal S. (2006) Lysis of starters in UF cheeses: Behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. *International Dairy Journal*, 16(4), 324-334. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.04.003>
- Hannon, J. A., Lortal, S., Tissier, J. P., & Famelart, M. H. (2009). Limited ripening of low-fat UF-cheese due to CaPO<sub>4</sub> barrier? *Dairy Science & Technology*, 89(6), 555-568. <https://doi.org/10.1051/dst/2009035>
- Harboe, M., Broe, M. L., & Qvist, K. B. (2010). The production, action and application of rennet and coagulants. En B. A. Law, A. Y. Tamime. (Eds.) *Technology of cheesemaking* (pp. 98-129). Estados Unidos: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444323740>

- Hayaloglu, A. A. (2016). Cheese: Microbiology of cheese. *Reference Module in Food Science*, 1, 1-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00675-2>
- Heino, A., Uusi-Rauva, J., & Outinen, M. (2010). Pre-treatments methods of Edam cheese milk. Effect on cheese yield and quality. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 640-646. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.11.004>
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>
- Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M. C.... & Alvarez, M. A. (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002>
- Herreros, M. A., Arenas, R., Sandoval, M. H., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadizo, M. E. (2007). Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. *International Dairy Journal*, 17(4), 328-335. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.04.005>
- Hesari, J., Ehsani, M. R., Khosroshahi, A., & McSweeney, P. L. H. H. (2006). Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese. *Le Lait*. 86(4), 291-302. <https://doi.org/10.1051/lait:2006011>
- Hesari, J., Ehsani, M. R., Mosavi, M. A., & McSweeney, P. L. (2007). Proteolysis in ultra-filtered and conventional Iranian white cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 60(3), 211-220. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00337.x>
- Hinrichs, J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 495-503. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00071-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00071-1)
- Hoffmann, W., Kiesner, C., Clawin-Rädecker, I., Martin, D., Einhoff, K., Lorenzen, P. C.,.... & Teufel, P. (2006). Processing of extended shelf life milk using microfiltration. *International Journal of Dairy Technology*, 59(4), 229-235. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2006.00275.x>
- Holmes, D. G., Duersch, J. W., & Ernstrom, C. A. (1977). Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheese making. *Journal of Dairy Science*, 60(6), 862-869. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83955-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83955-6)
- Horne, D. S. (2020). Casein micelle structure and stability. En M. Boland & H. Singh. (Eds.), *Milk proteins* (pp. 213-250). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00006-2>
- Horne D.S., Banks J.M. (2004). Rennet-induced coagulation of milk. En: P.F. Fox, P. McSweeney, T. Cogan, T. Guinee (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology. Vol. 1. General Aspects* (pp. 47-70). Academic Press. Elsevier
- Hou, J., Hannon, J. A., McSweeney, P. L., Beresford, T. P., & Guinee, T. P. (2014). Effect of curd washing on cheese proteolysis, texture, volatile compounds, and sensory grading in full fat Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 34(2), 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.08.008>



- Hovjecki, M., Miloradovic, Z., Barukčić, I., Blažić, M., & Miocinovic, J. (2022). Rheological Properties of Goat Milk Coagulation as Affected by Rennet Concentration, pH and Temperature. *Fermentation*, 8(6), 291. <https://doi.org/10.3390/fermentation8060291>
- Hsu, J. P., & Liu, B. T. (1998). Effect of particle size on critical coagulation concentration. *Journal of Colloid and Interface Science*, 198(1), 186-189. <https://doi.org/10.1006/jcis.1997.5275>
- Hu, K., & Dickson, J. (Eds.). (2015). *Membrane processing for dairy ingredient separation*. John Wiley & Sons.
- Huc, D., Roland, N., Grenier, D., Challos, S., Michon, C., & Mariette, F. (2014). Influence of salt content on eye growth in semi-hard cheeses studies using magnetic resonance imaging and CO<sub>2</sub> production measurements. *International Dairy Journal*, 35(2), 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.010>
- Huppertz, T., Hinz, K., Zobrist, M. R., Uniacke, T., Kelly, A. L., & Fox, P. F. (2005). Effects of high pressure treatment on the rennet coagulation and cheese-making properties of heated milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(3), 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.03.005>
- Hurt, E., Zulewska, J., Newbold, M., & Barbano, D. M. (2010). Micellar casein concentrate production with a 3X, 3-stage, uniform transmembrane pressure ceramic membrane process at 50 C. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5588-5600. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3169>
- Hynes, E. R., Bergamini, C. V., Suárez, V. B., & Zalazar, C. A. (2003a). Proteolysis on Reggiano Argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 86(12), 3831-3840. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73990-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73990-3)
- Hynes, E., Delacroix-Buchet, A., Meinardi, C. A., & Zalazar, C. A. (1999). Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheeses. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54(1), 24.
- Hynes, E., Meinardi, C., Candioti, M., Sabbag, N., Zualet, G., Zalazar, C., & Costa, S. (1998). Elaboración y Maduración de queso cremoso argentino adicionado con proteínas de suero. *Revista Argentina de Lactología*, 10, 13-23.
- Hynes, E. R.; Meinardi, C. A; Sabbag, N.; Cattaneo, T.; Candioti, M. C., & Zalazar, C. A. (2001b). Influence of milk clotting enzyme concentration on the  $\alpha$ s1-casein hydrolysis during soft cheeses ripening. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1335-1340. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70163-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70163-4)
- Hynes, E. R., Ogier, J. C., & Delacroix-Buchet, A. (2001a). Proteolysis during ripening of miniature washed-curd cheeses manufactured with different strains of starter bacteria and a *Lactobacillus plantarum* adjunct culture. *International Dairy Journal*, 11(8), 587-597. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00094-2)
- Hynes, E.; Ogier, J. C., & Delacroix-Buchet, A. (2000). Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, 10(10), 733-737. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00102-3)
- Hynes, E. R., Ogier, J. C., Son, O., & Delacroix-Buchet, A. (2003b). Influence of starter and adjunct lactobacilli culture on ripening of miniature washed-curd cheeses. *Le Lait*, 83(1), 17-29. <https://doi.org/10.1051/lait:2002047>

- Ipsen, R. (2017). Microparticulated whey proteins for improving dairy product texture. *International Dairy Journal*, 67, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.009>
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>
- Ismail, B., & Nielsen, S. S. (2011). Enzymes Indigenous to Milk: Plasmin System in Milk. En H. Rogisnski, J. Fuquay, & P. Fox (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences. Vol 2* (pp. 308-313). Academic Press. Elsevier.
- ISO (2004). *Cheese and processed cheese – determination of the total solids content. (Reference method)*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO 5534-IDF 4. <https://www.iso.org/standard/35249.html>
- ISO. (2007). *Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms*. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardization. ISO Standard 8589. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:8589:ed-2:v1:en>
- ISO (2008a). *Milk and milk products – Guidance on sampling*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO 707-IDF 50. <https://www.iso.org/standard/37882.html>
- ISO (2008b). *Cheese – determination of fat content – Van Gulik method*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO 3433-IDF 222. <https://www.iso.org/standard/46336.html>
- ISO (2010). *Fermented milk products—bacterial starter cultures—standard of identity*. Geneva, Switzerland. International Organization for Standardization. ISO 27205-IDF 149: 2010. <https://www.iso.org/standard/44069.html>
- ISO. (2014). *Milk and milk products e determination of nitrogen content e part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation*. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization. ISO 8968-IDF 20. <https://www.iso.org/standard/61020.html>
- Izco, J. M., Tormo, M., & Jiménez-Flores, R. (2002). Development of a CE method to analyze organic acids in dairy products: Application to study the metabolism of heat-shocked spores. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1765-1773. <https://doi.org/10.1021/jf010929i>
- Janhøj, T., & Qvist, K. B. (2010). The formation of cheese curd. Technology of cheesemaking. En B. A. Law., A. Y. Tamime. (Eds.) *Technology of cheesemaking* (pp. 130-165). Estados Unidos: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444323740>
- Johnson, M. E., & Lucey, J. A. (2006). Major technological advances and trends in cheese. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1174-1178. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72186-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72186-5)
- Johnson, M. E., & Olson, N. F. (1985). Nonenzymatic browning of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3143-3147. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81219-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81219-4)
- Johnson, M. E., Chen, C. M., & Jaeggi, J. J. (2001). Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 84(5), 1027-1033. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74562-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74562-6)

- Johnston, K. A., Barclay, A. B., & Honoré, C. (2010). A brief history of innovation in New Zealand cheesemaking. *Australian Journal of Dairy Technology*, 65(3), 122-127.
- Joshi, N. S., Muthukumarappan, K., & Dave, R. I. (2003). Effect of calcium on physicochemical properties of fat-free Mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 68(7), 2289-2294. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05761.x>
- Jost, R., Brandsma, R., & Rizvi, S. (1999). Protein composition of micellar casein obtained by cross-flow micro-filtration of skimmed milk. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 389-390. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00101-6)
- Kaminarides, S., Stamou, P., & Massouras, T. (2007). Changes of organic acids, volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. *Food Chemistry*, 100(1), 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.039>
- Kapoor, R., & Metzger, L. E. (2008). Process cheese: Scientific and technological aspects – A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(2), 194-214. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00040.x>
- Karagül-Yüceer, Y., Drake, M., & Cadwallader K. R. (2001). Aroma-active components of nonfat dry milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2948-2953. <https://doi.org/10.1021/jf0009854>
- Karametsi, K., Kokkinidou, S., Ronningen, I., & Peterson, D. G. (2014). Identification of bitter peptides in aged cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(32), 8034-8041. <https://doi.org/10.1021/jf5020654>
- Karami, M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Rezaei, K., & Safari, M. (2009). Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening. *Food chemistry*, 112(3), 539-544. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.003>
- Karlsson, A. O., Ipsen, R., & Ardö, Y. (2007). Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal*, 17(6), 674-682. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.08.002>
- Katsiari, M. C., Voutsinas, L. P., Kondyli, E., & Alichanidis, E. (2002). Flavour enhancement of low-fat Feta-type cheese using a commercial adjunct culture. *Food Chemistry*, 79(2), 193-198. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00131-0)
- Kelly, A. L., Huppertz, T., & Sheehan, J. J. (2008). Pre-treatment of cheese milk: principles and developments. *Dairy Science & Technology*, 88, 549-572. <https://doi.org/10.1051/dst:2008017>
- Kelly, A. L., O'connell, J. E., & Fox, P. F. (2003). Manufacture and properties of milk powders. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A/Part B*, 1027-1061. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_29)
- Kethireddipalli, P., & Hill, A. R. (2015). Rennet coagulation and cheesemaking properties of thermally processed milk: Overview and recent developments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43), 9389-9403. <https://doi.org/10.1021/jf504167v>
- Kethireddipalli, P., Hill, A. R., & Dalgleish, D. G. (2010). Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. *International Dairy Journal*, 20(12), 838-843. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.06.003>

- Khatab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., & Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 343-360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Le Bars, D., & Yvon, M. (2004). The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. *International Dairy Journal*, 14(3), 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.001>
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Olsen, K., & Langsrud, T. (2001). Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 217-224. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00051-6)
- Kieronczyk, A.; Skeie, S.; Langsrud, T., & Yvon, M. (2003). Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 734-739. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.734-739.2003>
- Koca, N., & Metin, M. (2004). Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14(4), 365-373. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.08.006>
- Kosikowski, F. (1986). New cheese-making procedures utilizing ultrafiltration. *Food Technology* 40, 71-77.
- Kubantseva, N., Hartel, R. W., & Swearingen, P. A. (2004). Factors affecting solubility of calcium lactate in aqueous solutions. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 863-867. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73230-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73230-0)
- Kübarsepp, I. V. I., Henno, M., Kärt, O., & Tupasela, T. (2005). A comparison of the methods for determination of the rennet coagulation properties of milk. *Acta Agriculturae Scand Section A*, 55(4), 145-148. <https://doi.org/10.1080/09064700500453377>
- Kumar, P., Sharma, N., Ranjan, R., Kumar, S., Bhat, Z. F., & Jeong, D. K. (2013). Perspective of membrane technology in dairy industry: A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(9), 1347. doi: 10.5713/ajas.2013.13082
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & Alvarez, M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156. <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>
- Laleye, L. C., Simard, R. E., Lee, B. H., Holley, R. A., & Giroux, R. N. (1987). Involvement of heterofermentative lactobacilli in development of open texture in cheeses. *Journal of Food Protection*, 50(12), 1009-1012. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.12.1009>
- Lawrence, R. C., Creamer, L. K., & Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70, 1748-1760. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80207-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80207-2)
- Le Bars, D., & Yvon, M. (2008). Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), 171-177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03539.x>

- Ledenbach, L.H., & Marshall, R.T. (2009). Microbiological Spoilage of Dairy Products. En: W. Sperber, M. Doyle. (Eds.) *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Food Microbiology and Food Safety*. (pp. 41-67). Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_2)
- Lee, B. H., Laleye, L. C., Simard, R. E., Holley, R. A., Emmons, D. B., & Giroux, R. N. (1990). Influence of homofermentative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 55(2), 386-390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06770.x>
- Lee, M. R., Johnson, M. E., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., & Lucey, J. A. (2010). Insoluble calcium content and rheological properties of Colby cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 93(5), 1844-1853. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2734>
- Lee, Y., Findlay, C., & Meullenet, J. F. (2013). Experimental consideration for the use of check-all-that-apply questions to describe the sensory properties of orange juices. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(1), 215-219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03165.x>
- Lemieux, L., & Simard, R. E. (1992). Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Le Lait*, 72(4), 335-385. <https://doi.org/10.1051/lait:1992426>
- Li, B., Waldron, D. S., Tobin, J. T., Subhir, S., Kelly, A. L., & McSweeney, P. L. H. H. (2020). Evaluation of production of Cheddar cheese from micellar casein concentrate. *International Dairy Journal*, 107, 104711. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104711>
- Li, Y., & Corredig, M. (2014). Calcium release from milk concentrated by ultrafiltration and diafiltration. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5294-5302. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7567>
- Lin, M. J., Grandison, A. S., & Lewis, M. J. (2015). Partitioning of calcium and magnesium (total divalent cations) during membrane filtration of milk. *Journal of Food Engineering*, 149, 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.10.018>
- Lin, Y., Kelly, A. L., O'Mahony, J. A., & Guinee, T. P. (2018). Effect of heat treatment, evaporation and spray drying during skim milk powder manufacture on the compositional and processing characteristics of reconstituted skim milk and concentrate. *International Dairy Journal*, 78, 53-64. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.10.007>
- Lipnizki, F. (2010). Cross-flow membrane applications in the food industry. *Membrane Technology: Volume 3: Membranes for Food Applications*, 3, 1-24. <https://doi.org/10.1002/9783527631384>
- Liu, K., Stieger, M., van der Linden, E., & van de Velde, F. (2016). Effect of microparticulated whey protein on sensory properties of liquid and semi-solid model foods. *Food Hydrocolloids*, 60, 186-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.036>
- Liu, S. Q. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83(2), 115-131. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00366-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00366-5)
- Lo, C. G., & Bastian, E. D. (1998). Incorporation of native and denatured whey proteins into cheese curd for manufacture of reduced fat, Havarti-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 81(1), 16-24. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75545-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75545-6)

- Lomholt, S. B., & Qvist, K. B. (1999). Gel firming rate of rennet curd as a function of rennet concentration. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 417-418. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00114-4)
- López Morales, M. B., Bintsis, T., Alichanidis, E., Herian, K., Jelen, P., Hynes, E. R., ..., & Xavier Malcata, F.X. (2017). Soft cheeses (with rennet). En: P. Papademas, T. Bintsis (Eds.), *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics* (pp. 301-325), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9781119046165.ch4>
- Lucey, J. A. (2002). Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 281-294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2)
- Lucey, J. A., & Fox, P. F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1714-1724. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77504-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77504-9)
- Lucey, J. A., & Horne, D. S. (2018). Perspectives on casein interactions. *International Dairy Journal*, 85, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.010>
- Lucey, J. A., Johnson, M. E., & Horne, D. S. (2003). Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2725-2743. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73869-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73869-7)
- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998). Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65(4), 555-567. <https://doi.org/10.1017/S0022029998003057>
- Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M., & Drinan, F. D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, 6(8-9), 851-867. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(96\)00019-2](https://doi.org/10.1016/0958-6946(96)00019-2)
- Madkor, S. A., Tong, P. S., & El Soda, M. (2000). Ripening of Cheddar cheese with added attenuated adjunct cultures of lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 83(8), 1684-1691. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75037-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75037-5)
- MAGyP (2016). *Informes de cadenas de valor*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspe\\_cadena\\_de\\_valor\\_lactea.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspe_cadena_de_valor_lactea.pdf)
- MAGyP (2019). *Estado de situación de la industria láctea argentina para la definición de políticas públicas 2016-2018*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss\\_lecheria/industria/estado/estado.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/ss_lecheria/industria/estado/estado.pdf)
- Maijala, R. L., Eerola, S. H., Aho, M. A., & Hirn, J. A. (1993). The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, 56(2), 125-129. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.2.125>
- Marilley, L., & Casey M. G. (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90(2), 139-159. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00304-0)
- Martin, G. J., Williams, R. P. W., & Dunstan, D. E. (2007). Comparison of casein micelles in raw and reconstituted skim milk. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 4543-4551. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0166>

- Martley, F. G., & Crow, V. L. (1996). Open texture in cheese: the contribution of gas production by microorganisms and cheese manufacturing practices. *Journal of Dairy Research*, 63(3), 489-507. <https://doi.org/10.1017/S0022029900032015>
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytè, M., & De Noni, I. (2017). Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 102-114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.007>
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytè, M., Pica, V., & De Noni, I. (2020). Analytical advances in the determination of calcium in bovine milk, dairy products and milk-based infant formulas. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 348-360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.013>
- Massart, D. L., Vandeginste, B. G., Deming, S. N.; Michote, Y., & Kaufman, L. (1988). Regression Methods En D. L. Massart (Ed.), *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics part B*. (pp. 165-189). Amsterdam, Holanda: Elsevier.
- Matia-Merino, L., & Singh, H. (2007). Acid-induced gelation of milk protein concentrates with added pectin: Effect of casein micelle dissociation. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 765-775. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.007>
- Maubois, J. L., & Brulé, G. (1982). Utilisation des techniques à membrane pour la séparation, la purification et la fragmentation des protéines laitières. *Le Lait*, 62(617-620), 484-510. <https://doi.org/10.1051/lait:1982617-62030>
- Maubois, J. L., Fauquant, J., Famelart, M. H., & Caussin, F. (2001). Milk microfiltrate, a convenient starting material for fractionation of whey proteins and derivatives. *Proteins*, 96, 46.
- Maubois, J. L., Mocquot, G., & Vassal, L. (1969). Procédé de traitement du lait et de sous-produits laitiers. *Patent Française*, 2, 121.
- Maubois, J. L., Mocquot, G., Thapon, J. L., Humilier, M. C., Chopin, A., Goudédranche, H.,... & Fauquant, J. (1971). Préparation de fromage à partir de "pré-fromage liquide" obtenu par ultrafiltration du lait. *Le lait*, 51(508), 495-533 <https://doi.org/10.1051/lait:197150825>
- McGregor, J. U., & White, C. H. (1990). Effect of enzyme treatment and ultrafiltration on the quality of lowfat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 73(3), 571-578. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78704-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78704-8)
- McMahon, D. J., Brown, R. J., Richardson, G. H., & Ernstrom, C. A. (1984). Effects of calcium, phosphate, and bulk culture media on milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 67(5), 930-938. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81391-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81391-0)
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. En P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. Cogan, & T. Guinee (Eds.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects. Vol. 1*: (pp. 347-360). Academic Press. Elsevier.
- McSweeney, P. L. H. (2007) What processing variables affect syneresis? En P.L.H., McSweeney (Ed.), *Cheese Problem Solved* (pp. 75-76). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- McSweeney, P.L.H. (2011). Biochemistry of cheese ripening. En J. Fuquay, P. Fox., P.L.H. & McSweeney (Eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 667-675). United Kingdom: Academic Press. Elsevier.

- McSweeney, P. L. H., & Fox (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. En P. F. Fox, P. L. McSweeney, T. Cogan, & T. Guinee (Eds.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects. Vol. 1*: (pp. 361-371). Academic Press. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00016-8>
- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Lucey, J. A., Jordan, K. N., & Cogan, T. M. (1993). Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3(7), 613-634. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(93\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0958-6946(93)90104-8)
- McSweeney, P. L. H., Olson N. F., Fox, P. F., & Healy, A. (1994) Proteolysis of Bovine  $\alpha$  s2-Casein by Chymosin. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 199, 429-432. <https://doi.org/10.1007/BF01193267>
- McSweeney, P. L. H., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait* 80(3), 293-324. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
- McSweeney, P. L. H., Walsh, E. M., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F. D., & Castelo-Gonzalez, M. (1994). A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 33(2), 183-192.
- Medina de Figueroa, R., Alvarez, F., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G., & Sesma, F. (2000). Citrate utilization by homo-and heterofermentative lactobacilli. *Microbiological Research*, 154(4), 313-320. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80005-1)
- Mehaia, M. A. (2002). Manufacture of fresh soft white cheese (Domiaty-type) from ultrafiltered goats' milk. *Food Chemistry*, 79(4), 445-452. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00195-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00195-4)
- Meinardi, C. A., Hynes, E., Garnero, D., & Zalazar, C. A. (1998). Methodology and equipment for making rennet-free cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(3), 149.
- Meinardi, C., Venica, C., Giménez, P., Mercanti, D., Vélez, A., George, G., Perotti M.C., & Bergamini, C. (2022). Leche destinada a quesería. En J. Reinheimer, C. Meinardi, E. Hynes, M. C. Perotti, & V. B. Suárez (Eds.), *Los quesos argentinos. Producción, características y nuevas propuestas* (pp. 27-67). Ediciones UNL. Santa Fe, Argentina:
- Meinardi, C.; Zalazar, C.; Hynes, E., & Candiotti, M. (2004). Incremento del rendimiento del queso cremoso argentino por tratamiento de la leche a temperaturas y tiempos superiores a los de pasteurización. *Revista Argentina de Lactología*, 22, 45-54.
- Mercanti, D. J., Wolf, I. V., Meinardi, C. A., Candiotti, M. C., & Zalazar, C. A. (2004). Influencia del contenido graso y de otras variables sobre la capacidad de fusión del queso Cremoso Argentino. *Grasas y aceites*, 55(3), 296-302.
- Merchán, A. V., Ruiz-Moyano, S., Vázquez Hernández, M., Martín, A., Lorenzo, M. J., & Benito, M. J. (2022). Characterization of autochthonal *Hafnia* spp. strains isolated from Spanish soft raw ewe's milk PDO cheeses to be used as adjunct culture. *International Journal of Food Microbiology*, 373, 109703. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109703>
- Mercier, S., Villeneuve, S., Mondor, M., & Uysal, I. (2017). Time-temperature management along the food cold chain: A review of recent develop. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(4), 647-667. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12269>



- Méthot-Hains, S., Benoit, S., Bouchard, C., Doyen, A., Bazinet, L., & Pouliot, Y. (2016). Effect of transmembrane pressure control on energy efficiency during skim milk concentration by ultrafiltration at 10 and 50 °C. *Journal of Dairy Science*, *99*(11), 8655-8664. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11504>
- Meyners, M., & Castura, J. C. (2016). Randomization of CATA attributes: Should attribute lists be allocated to assessors or to samples? *Food Quality and Preference*, *48*, 210-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.09.014>
- Milesi, M. (2008) *Desarrollo de fermentos adjuntos para quesería a partir de bacterias lácticas no pertenecientes al ferment.* (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Milesi, M. M., Candiotti, M., & Hynes, E. (2007). Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheese-making and ripening. *LWT-Food Science & Technology*, *40*(8), 1427-1433. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.08.003>
- Milesi, M. M., McSweeney, P. L. H. H., & Hynes, E. R. (2008). Impact of chymosin- and plasmin-mediated primary proteolysis on the growth and biochemical activities of lactobacilli in miniature Cheddar-type cheeses. *Journal of Dairy Science*, *91*(9), 3277-3290. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1197>
- Milesi, M. M., Vinderola, G., Sabbag, N., Meinardi, C., & Hynes, E. (2009). Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. *Food Research International*, *42*(8), 1186-1196. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.005>
- Milesi, M. M., Wolf, I. V., Bergamini, C. V., & Hynes, E. R. (2010). Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *Journal of Dairy Science*, *93*(11), 5020-5031. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-3043>
- Mistry, V. V., & Kasperson, K. M. (1998). Influence of salt on the quality of reduced fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, *81*(5), 1214-1221. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75681-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75681-4)
- Mistry, V. V., & Maubois, J. L. (1993). Application of Membrane Separation Technology to Cheese Production. En: P. F. Fox, (Ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1 General Aspects* (pp. 493-522). Academic Press. Elsevier. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_13)
- Mistry, V. V., & Maubois, J. L. (2017). Application of membrane separation technology to cheese production. En P. L. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, D. W. Everett (Eds.). *Cheese* (pp. 677-697). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00027-2>
- Moiseev, N., Suchkova, E., & Iakovchenko, N. (2017). Possibility of using reconstituted milk in manufacture of cheese with Cheddaring and cheese curd stretching. *Agronomy Research*, *15*, 1358-1368.
- Morea, M., Matarante, A., Di Cagno, R., Baruzzi, F., & Minervini, F. (2007). Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese. *International Dairy Journal*, *17*(5), 525-534. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.05.010>
- Morgan, F., Léonil, J., Mollé, D., & Bouhallab, S. (1997). Nonenzymatic lactosylation of bovine  $\beta$ -lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the

- glycoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 413-417. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6955>
- Mortensen, B. K. (1985). Recent developments in the utilization of milk proteins in dairy products. *Milk Proteins*, 84.
- Moskowitz, H., & Hartmann, J. (2008). Consumer research: creating a solid base for innovative strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 19(11), 581-589. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.01.016>
- Moynihan, A. C. (2015). *Studies on the texture, functionality, rheology and sensory properties of Cheddar and Mozzarella cheeses*. (Tesis doctoral). University College Cork.
- Moynihan, A. C., Govindasamy-Lucey, S., Molitor, M., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., McSweeney, P. L. H., & Lucey, J. A. (2016). Effect of standardizing the lactose content of cheesemilk on the properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7791-7802. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11215>
- Müller-Buschbaum, P., Gebhardt, R., Roth, S. V., Metwalli, E., & Doster, W. (2007). Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophysical Journal*, 93(3), 960-968. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.106385>
- Muthukumarappan, K., Wang, Y.C., & Gunasekarant, S. (1999). Short Communication: Modified Schreiber test for evaluation of Mozzarella cheese meltability. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1068-1071. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75328-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75328-2)
- Nájera, A. I., De Renobales, M., & Barron, L. J. R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345-352. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00270-4)
- Nantet, B. (1994). *Le goût du fromage*. París, France: Flammarion
- Nelson, B. K., & Barbano, D. M. (2005). A microfiltration process to maximize removal of serum proteins from skim milk before cheese making. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1891-1900. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72865-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72865-4)
- Neocleous, M., Barbano, D. M., & Rudan, M. A. (2002). Impact of low concentration factor microfiltration on the composition and aging of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2425-2437. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74325-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74325-7)
- O'Callaghan, D. J., O'Donnell, C. P., & Payne, F. A. (2002). Review of systems for monitoring curd setting during cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology*, 55(2), 65-74. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00043.x>
- O'Mahony, J. A., Lucey, J. A., & McSweeney, P. L. H. H. (2005). Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3101-3114. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72992-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72992-1)
- OCLA (2021). *Observatorio de la Cadena Láctea*. <http://www.ocla.org.ar>
- OECD/FAO (2020). OECD-FAO AGRICULTURAL OUTLOOK 2020-2029. Dairy and dairy products. Cap. 7 (pp. 174-183). <http://www.fao.org/3/ca8861en/Dairy.pdf>
- Oh, N. S., Lee, H. A., Myung, J. H., Joung, J. Y., Lee, J. Y., Shin, Y. K., & Baick, S. C. (2014). Effects of temperature and supplementation with skim milk powder on microbial and

- proteolytic properties during storage of cottage cheese. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(6), 795-802. <https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02007>
- Oliveira, E. W., Esmerino, E. A., Carr, B. T., Pinto, L. P. F., Silva, H. L. A., Pimentel, T. C. ... , & Freitas, M. Q. (2017). Reformulating Minas Frescal cheese using consumers' perceptions: Insights from intensity scales and check-all-that-apply questionnaires. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6111-6124. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12335>
- Oneca, M., Ortigosa, M., Irigoyen, A., & Torre, P. (2007). Proteolytic activity of some *Lactobacillus paracasei* strains in a model ovine-milk curd system: Determination of free amino acids by RP-HPLC. *Food Chemistry*, 100(4), 1602-1610. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.056>
- Ong, L., Dagastine, R. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2013). Microstructure and composition of full fat Cheddar cheese made with ultrafiltered milk retentate. *Foods*, 2(3), 310-331. <https://doi.org/10.3390/foods2030310>
- On-Nom, N., Grandison, A. S., & Lewis, M. J. (2010). Measurement of ionic calcium, pH, and soluble divalent cations in milk at high temperature. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 515-523. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2634>
- Ortakci, F., Broadbent, J.R., Oberg, C.J., & McMahon, D.J. (2015). Late blowing of Cheddar cheese induced by accelerated ripening and ribose and galactose supplementation in presence of a novel obligatory heterofermentative nonstarter *Lactobacillus wasatchensis*. *Journal of Dairy Science*, 98, 7460-7472.
- Osaili, T. M., Ayyash, M. M., Al-Nabulsi, A. A., Shaker, R. R., & Shah, N. P. (2010). Effect of Curd Washing Level on Proteolysis and Functionality of Low-Moisture Mozzarella Cheese Made with Galactose-Fermenting Culture. *Journal of Food Science*, 75(5), C406-C412. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01641.x>
- Osorio, A. E., Corradini, M. G., & Dewi, G. (2017). In-store cold chain failures: Food safety considerations. *Journal of Marketing Channel*, 24(3), 153-170. <https://doi.org/10.1080/1046669X.2017.1393233>
- O'Sullivan, D. J., McSweeney, P. L. H., Cotter, P. D., Giblin L. , & Sheehan, J. J. (2016). Compromised *Lactobacillus helveticus* starter activity in the presence of facultative heterofermentative *Lactobacillus casei* DPC6987 results in atypical eye formation in Swiss-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2625-2640. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10503>
- Özer, B., & Tamime, A. Y. (2013). Membrane processing of fermented milks. *Membrane Processing: Dairy and Beverage Applications*. <https://doi.org/10.1002/9781118457009.ch7>
- Ozturk, M., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., & Lucey, J. A. (2015). Low-sodium Cheddar cheese: Effect of fortification of cheese milk with ultrafiltration retentate and high-hydrostatic pressure treatment of cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6713-6726. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9549>
- Palles, P., Beresford, B., Condon, C., & Cogan, C. (1998). Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), 147-154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00486.x>

- Panthi, R. R., Kelly, A. L., Sheehan, J. J., Bulbul, K., Vollmer, A. H., & McMahon, D. J. (2019). Influence of protein concentration and coagulation temperature on rennet-induced gelation characteristics and curd microstructure. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 177-189. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15039>
- Papadatos, A., Neocleous, M., Berger, A. M., & Barbano, D. M. (2003). Economic feasibility evaluation of microfiltration of milk prior to cheesemaking. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1564-1577. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73742-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73742-4)
- Parente, E., Cogan, T. M., & Powell, I. B. (2017). Starter cultures: general aspects. En P. L. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, D. W. Everett (Eds.) *Cheese* (pp. 201-226). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008-9>
- Patel, H. A., Anema, S. G., Holroyd, S. E., Singh, H., & Creamer, L. K. (2007). Methods to determine denaturation and aggregation of proteins in low-, medium-and high-heat skim milk powders. *Le Lait*, 87(4-5), 251-268. <https://doi.org/10.1051/lait:2007027>
- Pazzola, M., Stocco, G., Dettori, M. L., Bittante, G., & Vacca, G. M. (2019). Effect of goat milk composition on cheesemaking traits and daily cheese production. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 3947-3955. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15397>
- Pedersen, T., Ristagno, D., McSweeney, P. L. H., Vogensen, F. K., & Ardö, Y. (2013). Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. *International Dairy Journal*, 33(2), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.003>
- Pellegrino, L., Cattaneo, S., Masotti, F., & Psathas, G. (2010). Detection of milk powder and caseinates in Halloumi cheese. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3453-3460. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2923>
- Peralta, G. H. (2014). *Bioformación de flavour en quesos via metabolismo de aminoácidos por fermentos lácticos primarios y adjuntos*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., Audero, G., Páez, R., Wolf, I. V., Perotti, M. C., & Hynes, E. R. (2017). Spray-dried adjunct cultures of autochthonous non-starter lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.014>
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., Costabel, L., Audero, G., Ale, E. C., Binetti, A. G., ... , & Hynes, E. R. (2020). Performance of *Lactobacillus paracasei* 90 as an adjunct culture in soft cheese under cold chain interruption. *International Dairy Journal*, 109, 104779. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104779>
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., & Hynes, E. R., (2016b). Aminotransferase and glutamate dehydrogenase activities in lactobacilli and streptococci. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 741-748. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.005>
- Peralta, G. H., Bergamini, C. V., Wolf, I. V., Candiotti, M. C., Audero, G. M., Paez, R. B., ... & Hynes, E. R. (2021). Cultivos adjuntos de quesería a partir de cepas de origen NSLAB. En J. Reinheimer (Ed.) *Avances y tendencias en la industria láctea. La contribución argentina desde el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN)* (pp-135-148). Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.
- Peralta, G., Hynes, E., Meinardi, C., Bergamini, C., Puntillo, M., Quiberoni, A., Guglielmotti, D., Wolf, I. V., & Vénica, C. (2022). Los quesos argentinos de mayor difusión. *Pasta Blanda*.

- En J. Reinheimer, C. Meinardi, E. Hynes, M.C. Perotti, & V.B. Suárez (Eds.). *Los quesos argentinos. Producción, características y nuevas propuestas* (pp. 68-96). Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.
- Peralta, G. H., Wolf, I. V., Bergamini, C. V., Perotti, M. C., & Hynes, E. R. (2014). Evaluation of volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* I90 in a hard-cooked cheese model using solid-phase microextraction. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 73-81. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0143-4>
- Peralta, G. H., Wolf, I., Perotti, M. C., Bergamini, C. V., & Hynes, E.R. (2016a). Formation of volatile compounds, peptidolysis and carbohydrate fermentation by mesophilic lactobacilli and streptococci cultures in a cheese extract. *Dairy Science & Technology*, 96(5), 603-621. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0291-4>
- Pierre, A., & Brule, G. (1981). Mineral and protein equilibria between the colloidal and soluble phases of milk at low temperature. *Journal of Dairy Research*, 48(3), 417-428. <https://doi.org/10.1017/S0022029900021890>
- Piraino P, Parente E., & McSweeney P. H. (2004) Processing of chromatographic data for chemometric analysis of peptide profiles from cheese extracts: a novel approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 6904-6911. <https://doi.org/10.1021/jf049606n>
- Piveteau, P. (1999). Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: a review. *Le Lait*, 79(1), 23-41. <https://doi.org/10.1051/lait:199912>
- Pogačić, T., Maillard, M. B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Valence, F., & Thierry, A. (2016). *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatilomes in cheese conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2335-2346. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7227-4>
- Polychroniadou, A. (2001). Eyes in cheese: a concise review. *Milchwissenschaft*, 56(2), 74-77.
- Porcellato, D., Johnson, M. E., Houck, K., Skeie, S. B., Mills, D. A., Kalanetra, K. M., & Steele, J. L. (2015). Potential of *Lactobacillus curvatus* LFC1 to produce slits in Cheddar. *Food Microbiology*, 49, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.015>
- Pouliot, Y. (2008). Membrane processes in dairy technology-From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, 18(7), 735-740. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.005>
- Pouliot, Y., Boulet, M., & Paquin, P. (1989). Observations on the heat-induced salt balance changes in milk I. Effect of heating time between 4 and 90 C. *Journal of Dairy Research*, 56(2), 185-192. <https://doi.org/10.1017/S0022029900026406>
- Poveda, J. M., Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Chicón, R., Castro, L., Palop, L., & Cabezas, L. (2014). Volatile composition and improvement of the aroma of industrial Manchego cheese by using *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. *European Food Research and Technology*, 238(3), 485-494. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2127-2>
- Pretto, D., Kaart, T., Vallas, M., Jõudu, I., Henno, M., Ancilotto, L., ... & Pärna, E. (2011). Relationships between milk coagulation property traits analyzed with different methodologies. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4336-4346. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4267>
- Pripp, A. H., Shakeel-Ur-Rehman, McSweeney, P. L. H. H., Sørhaug, T., & Fox, P. F. (2000). Comparative study by multivariate statistical analysis of proteolysis in a sodium caseinate

- solution under cheese-like conditions caused by strains of *Lactococcus*. *International Dairy Journal*, 10(1-2), 25-31. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00016-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00016-9)
- Punidades, P., Feirtag, J., & Tung, M. A. (1999). Incorporating whey proteins into mozzarella cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 52(2), 51-55. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1999.tb02070.x>
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D., & Reinheimer, J. (2008). New and classical spoilage bacteria causing widespread blowing in Argentinean soft and semihard cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 61(4), 358-363. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00431.x>
- Qvist, K. B., Thomsen, D., & Høier, E. (1987). Effect of ultrafiltered milk and use of different starters on the manufacture, fermentation and ripening of Havarti cheese. *Journal of Dairy Research*, 54(3), 437-446. <https://doi.org/10.1017/S0022029900025620>
- Ramonda, M. B. (2009). *Desarrollo de un modelo basado en métodos estadísticos para la predicción del tiempo de maduración de Quesos Argentinos*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Randazzo, C. L., Liotta, L., Angelis, M. D., Celano, G., Russo, N., Hoorde, K. V. ... & Caggia, C. (2021). Adjunct culture of non-starter lactic acid bacteria for the production of Provolone cheese: In vitro screening and pilot-scale cheese-making. *Microorganisms*, 9(1), 179. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010179>
- Rashidi, H., Mazaheri-Tehrani, M., Razavi, S. M. A., & Ghods-Rohany, M. (2015). Improving Textural and Sensory Characteristics of Low-Fat UF Feta Cheese Made with Fat Replacers. *Journal of Agricultural Science & Technology*, 17(1), 121-132.
- Ratnayake, W., & Jelen P. (1996). Protein standardization of milk and dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 7(7), 227-234. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(96\)10024-8](https://doi.org/10.1016/0924-2244(96)10024-8)
- Rehn, U., Vogensen, F. K., Persson, S. E., Saedén, K. H., Nilsson, B. F., & Ardö, Y. (2011). Influence of microflora on texture and contents of amino acids, organic acids, and volatiles in semi-hard cheese made with DL-starter and propionibacteria. *Journal of Dairy Science*, 94(3), 1098-1111. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3146>
- Reinheimer, J. A., Suarez, V. B., Bailo, N. B., & Zalazar, C. A. (1995). Microbiological and technological characteristics of natural whey cultures for Argentinian hard-cheese production. *Journal of Food Protection*, 58(7), 796-799. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.7.796>
- Rodrigues, J. F., Siman, I. B., de Oliveira, L. E. A., Barcelos, A. D. F., Arriel, R. A., Silva, R., & da Cruz, A. G. (2021). Dairy and CATA approaches: A complementary study assessing Canastra cheese consumption. *Journal of Sensory Studies*, 36(4), e12662. <https://doi.org/10.1111/joss.12662>
- Rohart, A., Michon, C., Confiac, J., & Bosc, V. (2016). Evaluation of ready-to-use SMLS and DWS devices to study acid-induced milk gel changes and syneresis. *Dairy Science & Technology*, 96(4), 459-475. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0281-6>
- Romeih, E. A., Michaelidou, A., Biliaderis, C. G., & Zerfiridis, G. K. (2002). Low-fat white-brined cheese made from bovine milk and two commercial fat mimetics: chemical, physical and sensory attributes. *International Dairy Journal*, 12(6), 525-540. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00043-2)

- Saboya, L. V., Goudédranche, H., Maubois, J. L., Lerayer, A. L. S., & Lortal, S. (2001). Impact of broken cells of lactococci or propionibacteria on the ripening of Saint-Paulin UF-cheeses: extent of proteolysis and GC-MS profiles. *Le Lait*, 81(6), 699-713. <https://doi.org/10.1051/lait:2001158>
- Saboyainsta, L. V., & Maubois, J. L. (2000). Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Le Lait*, 80(6), 541-553.
- SAGPyA (2009). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. [http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/valorAr/sello/SAA016\\_Tybo\\_y\\_Holanda\\_v14.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/valorAr/sello/SAA016_Tybo_y_Holanda_v14.pdf)
- Sahan, N., Yasar, K., Hayaloglu, A. A., Karaca, O. B., & Kaya, A. (2008). Influence of fat replacers on chemical composition, proteolysis, texture profiles, meltability and sensory properties of low-fat Kashar cheese. *Journal of Dairy Research*, 75(1), 1-7. <https://doi.org/10.1017/S0022029907002786>
- Sandra, S., Cooper, C., Alexander, M., & Corredig, M. (2011). Coagulation properties of ultrafiltered milk retentates measured using rheology and diffusing wave spectroscopy. *Food Research International*, 44(4), 951-956. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.018>
- Sandra, S., & Corredig, M. (2013). Rennet induced gelation of reconstituted milk protein concentrates: The role of calcium and soluble proteins during reconstitution. *International Dairy Journal*, 29(2), 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.10.011>
- Schädle, C. N., Eisner, P., & Bader-Mittermaier, S. (2020). The combined effects of different fat replacers and rennet casein on the properties of reduced-fat processed cheese. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 3980-3993. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17694>
- Schäfer, J., Sebald, K., Dunkel, A., Hofmann, T., Rosenthal, I., Schuster, R., ... & Hinrichs, J. (2019). A feasibility study on the pilot scale manufacture of fresh cheese from skim milk retentates without acid whey production: Effect of calcium content on bitterness and texture. *International Dairy Journal*, 93, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.01.012>
- Schenkel, P., Samudrala, R., & Hinrichs, J. (2013). The effect of adding whey protein particles as inert filler on thermophysical properties of fat-reduced semihard cheese type Gouda. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 220-230. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12036>
- Schiffer, S., Scheidler, E., Kiefer, T., & Kulozik, U. (2021). Effect of temperature, added calcium and pH on the equilibrium of caseins between micellar state and milk serum. *Foods*, 10(4), 822. <https://doi.org/10.3390/foods10040822>
- Schuetz, P., Guggisberg, D., Fröhlich-Wyder, M. T., & Wechsler, D. (2016). Software comparison for the analysis of cheese eyes in X-ray computed tomography. *International Dairy Journal*, 63, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.001>
- Schuetz, P., Guggisberg, D., Jerjen, I., Fröhlich-Wyder, M. T., Hofmann, J., Wechsler, D. ..., & Bachmann, H. P. (2013). Quantitative comparison of the eye formation in cheese using radiography and computed tomography data. *International Dairy Journal*, 31(2), 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.12.007>

- Serrazanetti, D. I., Ndagijimana, M., Sado-Kamdem, S. L., Corsetti, A., Vogel, R. F., Ehrmann, M., & Guerzoni, M. E. (2011). Acid stress-mediated metabolic shift in *Lactobacillus sanfranciscensis* LSCE1. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2656-2666. <https://doi.org/10.1128/AEM.01826-10>
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
- Sgarbi, E., Lazzi, C., Tabanelli, G., Gatti, M., Neviani, E., & Gardini, F. (2013). Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4223-4234. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6472>
- Shakeel-Ur-Rehman, Banks, J.M., McSweeney, P.L.H., & Fox, P.F. (2000). Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 10(1-2), 45-53. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00022-4)
- Shakeel-Ur-Rehman, Farkye, N. Y., Considine, T., Schaffner, A., & Drake, M. A. (2003a). Effects of standardization of whole milk with dry milk protein concentrate on the yield and ripening of reduced-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1608-1615. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73746-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73746-1)
- Shakeel-Ur-Rehman, Farkye, N. Y., & Yim, B. (2003b). Use of dry milk protein concentrate in pizza cheese manufactured by culture or direct acidification. *Journal Dairy Science*, 86(12), 3841-3848. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73991-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73991-5)
- Shakeel-Ur-Rehman; McSweeney, P. L., & Fox, P. F. (1998). Protocol for the manufacture of miniature cheeses. *Le Lait*. 78(6), 607-620. <https://doi.org/10.1051/lait:1998654>
- Shakeel-Ur-Rehman, Waldron, D., & Fox, P. F. (2004). Effect of modifying lactose concentration in cheese curd on proteolysis and in quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 14(7), 591-597. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.11.008>
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X)
- Sheehan, J.J. (2011). Cheese - Avoidance of Gas Blowing. In J. Fuquay, P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2<sup>nd</sup> ed., pp. 661-666). San Diego, USA: Academic Press: Elsevier.
- Sheehan, J. J., Fenelon, M. A., Wilkinson, M. G., & McSweeney, P. L. H. (2007). Effect of cook temperature on starter and non-starter lactic acid bacteria viability, cheese composition and ripening indices of a semi-hard cheese manufactured using thermophilic cultures. *International Dairy Journal*, 17(6), 704-716. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.08.011>
- Sieber, R., Bütikofer, U., & Bosset, J. O. (1995). Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *International Dairy Journal*, 5(3), 227-246. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(94\)00005-A](https://doi.org/10.1016/0958-6946(94)00005-A)
- Singh, T. K., Drake, M. A., & Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(4), 166-189. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00021.x>



- Singh, T. K.; Gripon, J. C., & Fox, P. F. (1999). Chromatographic analysis and identification of peptides in cheese. En Y. Ardö (Ed.), *Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation* (Part 2, pp. 17-23). Bruselas, Bélgica: International Dairy Federation.
- Singh, H., & Waungana, A. (2001). Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *International Dairy Journal*, *11*(4-7), 543-551. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00085-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00085-1)
- Skeie, S. (2007). Characteristics in milk influencing the cheese yield and cheese quality. *Journal of Animal Feed Sciences*, *16*(1), 130-142. <https://doi.org/10.22358/jafs/74164/2007>
- Skeie, S. (2010). Milk quality requirements for cheesemaking. En M. Griffiths (Ed.) *Improving the safety and quality of milk* (pp. 433-453). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699437.3.432>
- Skeie, S., Kieronczyk, A., Eidet, S., Reitan, M., Olsen, K., & Østlie, H. (2008b). Interaction between starter bacteria and adjunct *Lactobacillus plantarum* INF15D on the degradation of citrate, asparagine and aspartate in a washed-curd cheese. *International Dairy Journal*, *18*(2), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.09.002>
- Skeie, S., Kieronczyk, A., Næss, R.M., & Østlie, H. (2008a). *Lactobacillus* adjuncts in cheese: Their influence on the degradation of citrate and serine during ripening of a washed curd cheese. *International Dairy Journal*, *18*(2), 158-168. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.09.003>
- Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(3), 591-610. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.002>
- Smit, G., van Hylckama Vlieg, J. E., Smit, B. A., Ayad, E. H., & Engels, W. J. (2002). Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, *57*(2), 61. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.002>
- Somers, E. B., Johnson, M. E., & Wong, A. C. L. (2001). Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science*, *84*(9), 1926-1936. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74634-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74634-6)
- Soodam, K., & Guinee, T. P. (2018). The case for milk protein standardisation using membrane filtration for improving cheese consistency and quality. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(2), 277-291. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12502>
- Soodam, K., Ong, L., Powell, I. B., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2014). The effect of milk protein concentration on the microstructure and textural properties of full fat Cheddar cheese during ripening. *Food and bioprocess technology*, *7*, 2912-2922. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1342-6>
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, *11*(4-7), 327-345. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00062-0)
- Spangler, P. L., Jensen, L. A., Amundson, C. H., Olson, N. F., & Hill Jr, C. G. (1991). Ultrafiltered Gouda cheese: effects of preacidification, diafiltration, rennet and starter concentration, and time to cut. *Journal of Dairy Science*, *74*(9), 2809-2819. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78461-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78461-0)

- Stankey, J. A., Lu, Y., Abdalla, A., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Ø Mikkelsen, B.,... & Andersen, C. B. (2017). Low-fat Cheddar cheese made using microparticulated whey proteins: Effect on yield and cheese quality. *International Journal of Dairy Technology*, 70(4), 481-491. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12413>
- Stefanovic, E., Thierry, A., Maillard, M. B., Bertuzzi, A., Rea, M. C., Fitzgerald, G. ... & Kilcawley, K. N. (2017). Strains of the *Lactobacillus casei* group show diverse abilities for the production of flavor compounds in 2 model systems. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6918-6929. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12408>
- Steffl, A., Schreiber, R., Hafenmair, M., & Kessler, H. G. (1999). Influence of whey protein aggregates on the renneting properties of milk. *International Dairy Journal*, 9(3-6), 403-404. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00107-7)
- Stewart, A., Grandison, A. S., Ryan, A., Festring, D., Methven, L., & Parker, J. K. (2017). Impact of the skim milk powder manufacturing process on the flavor of model white chocolate. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 65(6), 1186-1195. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04489>
- Sturaro, A., De Marchi, M., Zorzi, E., & Cassandro, M. (2015). Effect of microparticulated whey protein concentration and protein-to-fat ratio on Caciotta cheese yield and composition. *International Dairy Journal*, 48, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.02.003>
- Sturaro, A., Penasa, M., Cassandro, M., Varotto, A., & De Marchi, M. (2014). Effect of microparticulated whey proteins on milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6729-6736. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8157>
- Suetens P. (2017a). Radiography. En: P. Suetens (Ed.), *Fundamentals of Medical Imaging*. (3<sup>rd</sup>-ed., pp. 15-32). Cambridge: Cambridge University Press.
- Suetens P. (2017b). X-ray Computed Tomography. En: P. Suetens (Ed.), *Fundamentals of Medical Imaging*. (3<sup>rd</sup>-ed, pp. 33-70). Cambridge: Cambridge University Press.
- Swearingen, P. A., Adams, D. E., & Lensmire, T. L. (2004). Factors affecting calcium lactate and liquid expulsion defects in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 574-582. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73199-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73199-9)
- Tamime, A. Y., Robinson, R. K., & Kiers, G. (2006). Industrial manufacture of Feta-Type cheeses. En: A. Tamime (Ed.), *Brined Cheeses*, (pp. 77-116). Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Taterka, H., & Castillo, M. (2015). The effect of whey protein denaturation on light backscatter and particle size of the casein micelle as a function of pH and heat-treatment temperature. *International Dairy Journal*, 48, 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.017>
- Taterka, H., Zamora, A., & Castillo, M. (2022). Developing an optical backscatter method for determining casein micelle particle size in heated milk. *Food Research International*, 161, 111745. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111745>
- Terre, E., Maubois, J. L., Brulé, G., & Pierre, A. (1987). Procédé d'obtention d'une matière enrichie en caséine bêta, appareillage pour la mise en oeuvre de ce procédé et application des produits obtenus par ce procédé comme aliments, compléments alimentaires ou additifs en industrie alimentaire et pharmaceutique ou dans la préparation de peptides à activité biologique. *French Patent*, (2592769).

- Thierry, A., & Hannon, J. (2011). Cheese flavor: Formation and analysis. En 8<sup>o</sup> *Cheese Symposium, 91*, 124. Moorepark, Fermoy, Co. Cork, Irlanda.
- Thomann, S., Schenkel, P., & Hinrichs, J. (2008). The impact of homogenization and microfiltration on rennet-induced gel formation. *Journal of Texture Studies, 39*(4), 326-344. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2008.00146.x>
- Tormo, M., & Izco, J.M. (2004). Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A, 1033*(2), 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.043>
- Troch, T., Lefébure, É., Baeten, V., Colinet, F., Gengler, N., & Sindic, M. (2017). Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 21*. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.13692>
- Tugba, A. (2021). Food product development: from the consumer aspect. En *E3S Web of Conferences, 247*, 01032. EDP Sciences. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202124701032>
- Tungjaroenchai, W., White, C. H., Holmes, W. E., & Drake, M. A. (2004). Influence of adjunct cultures on volatile free fatty acids in reduced-fat Edam cheeses. *Journal of Dairy Science, 87*(10), 3224-3234. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73458-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73458-X)
- Turner, K. W., Morris, H. A., & Martley, F. G. (1983). Swiss-type cheese. II. The role of thermophilic lactobacilli in sugar fermentation. *New Zealand Journal of Dairy Science Technology, 18*(2), 117-124.
- Uniacke-Lowe, T., & Fox, P. F. (2017). Chymosin, pepsins and other aspartyl proteinases: Structures, functions, catalytic mechanism and milk-clotting properties. *Cheese, 69*-113. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1>
- Unwin, A. (2015). *Graphical data analysis with R*. Chapman and Hall/CRC. <https://doi.org/10.1201/9781315370088>
- Upadhyay, V. K.; McSweeney, P. L. H. H., ... & Fox, P. F. (2004b). Proteolysis in cheese during ripening. En P. F. Fox, P. McSweeney, (...) T. Guinee (Eds.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1: General Aspects* (pp. 391-433). Academic Press. Elsevier.
- Upadhyay, V. K.; Sousa, M. J.; Ravn, P.; Israelsen, H.; Kelly, A. L., & McSweeney, P. L. H. (2004a). Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Le Lait, 84*(6), 527-538. <https://doi.org/10.1051/lait:2004022>
- Upreti, P., Bühlmann, P., & Metzger, L. E. (2006). Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: pH buffering properties of cheese. *Journal of Dairy Science, 89*(3), 938-950. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72159-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72159-2)
- Upreti, P., & Metzger, L. E. (2007). Influence of calcium and phosphorus, lactose, and salt-to-moisture ratio on Cheddar cheese quality: pH changes during ripening. *Journal of Dairy Science, 90*(1), 1-12. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72603-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72603-6)
- Upreti, P., Mistry, V. V., & Acharya, M. R. (2011). Characterization of rennet coagulation of milk concentrated by vacuum condensing and ultrafiltration. *Dairy Science & Technology, 91*, 383-395. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0004-y>

- Van Hoorde, K., Van Leuven, I., Dirinck, P., Heyndrickx, M., Coudijzer, K., Vandamme, P., & Huys, G. (2010). Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(2), 226-235. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.007>
- Varela, P., & Ares, G. (Eds.). (2014). *Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling*. CRC Press.
- Vélez M.A.; Bergamini C.V.; Ramonda M.B.; Candiotti M.C.; Hynes E.; Perotti M. C. (2015). Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. *LWT- Food Science & Technology*, *64*, 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.053>
- Vénica, C. I., Wolf, V. I., Bergamini, C. V., & Perotti, M. C. (2020). Effect of the incorporation of  $\beta$ -galactosidase in the GOS production during manufacture of soft cheese. *Food Research International*, *137*, 109654. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109654>
- Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, *83*(9), 1905-1911. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75065-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75065-X)
- Vyas, H. K., & Tong, P. S. (2003). Process for calcium retention during skim milk ultrafiltration. *Journal of Dairy Science*, *86*(9), 2761-2766. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73872-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73872-7)
- Walstra P., Wouters J.T.M., & Geurts T.J. (2006). *Principles of cheese making. Dairy Science and Technology. 2nd Edition*. CRC. (pp. 577-582). Taylor and Francis, Boca Raton.
- Walstra, P., & Jenness, R. (1984). *Dairy chemistry & physics*. John Wiley & Sons. New York.
- Waungana, A., Singh, H., & Bennett, R. J. (1998). Rennet coagulation properties of skim milk concentrated by ultrafiltration: effects of heat treatment and pH adjustment. *Food Research International*, *31*(9), 645-651. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00038-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00038-1)
- Wichchukit, S., & O'Mahony, M. (2015). The 9-point hedonic scale and hedonic ranking in food science: some reappraisals and alternatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(11), 2167-2178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6993>
- Williams A. G., Withers S. E., & Banks J. M. (2000) Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, *10*, 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00027-3)
- Williams, A. G., Withers, S. E., Brechany, E. Y., & Banks, J. M. (2006). Glutamic acid dehydrogenase activity in lactobacilli and the use of glutamic acid dehydrogenase-producing adjunct *Lactobacillus* spp. cultures in the manufacture of cheddar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, *101*, 1062-1075.
- Wolf, I. (2009). *Estudio de compuestos de aroma y sabor en quesos argentinos*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina
- Wolf, I. V., Bergamini, C. V., Perotti, M. C., & Hynes, E. R (2013). Sensory and flavor characteristics of milk. En Y. Park, & G. Haenlein (Eds.), *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health* (pp. 310-337). United Kingston; John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118534168.ch15>

- Wouters, J. T. M.; Ayad, E. H. E.; Hugenholtz, J., & Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 91–109. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00151-0)
- Yun, J. J., Barbano, D. M., Larose, K. L., & Kindstedt, P. S. (1998). Mozzarella cheese: Impact of nonfat dry milk fortification on composition, proteolysis, and functional properties. *Journal of Dairy Science*, 81, 1-8. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75543-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75543-2)
- Yvon, M. (2006) Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61(2), 16-24.
- Yvon, M., & Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 185-201. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00049-8)
- Zalazar, C. A.; Candiotti, M. C. & Meinardi, C. A. (2006). Defectos producidos durante la maduración En Reinheimer, J. y Zalazar, C. *Avances en Microbiología, Bioquímica y Tecnología de Quesos* (pp. 285–298). Universidad Nacional del Litoral.
- Zalazar, C. A., Meinardi, C. A., & Basualdo, S. (1995). Comparison of chymosin produced by genetically modified microorganisms with other milk clotting agents using formagraph. *MAN Microbiologie, aliments, nutrition*, 13(2), 183-189.
- Zalazar, C. A.; Meinardi, C. & Hynes, E. (1999). Quesos típicos argentinos. Una revisión general sobre producción y características. Ediciones UNL.
- Zalazar, C. A., Zalazar, C. S., Bernal, S., Bertola, N., Bevilaqua, A., & Zaritzky N. (2002). Effect of moisture level and fat replacer on physicochemical, rheological and sensory properties of low fat soft cheeses. *International Dairy Journal*, 12(1), 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00130-3)
- Zheng, Y., Liu, Z., & Mo, B. (2016). Texture profile analysis of sliced cheese in relation to chemical composition and storage temperature. *Journal of Chemistry*, Article ID 8690380, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2016/8690380>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P. ... & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zulewska, J., Newbold, M., & Barbano, D. M. (2009). Efficiency of serum protein removal from skim milk with ceramic and polymeric membranes at 50 °C. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1361-1377. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1757>