



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
LICENCIATURA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

# “Inclusión de bacterias lácticas productoras de polisacáridos en la elaboración de quesos blandos”

---

FACUNDO BUONANDUCI

Directora: Analía Abraham  
Co-Directora: Judith Piermaria

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos

Área Bioquímica y Control de Alimentos

Facultad de Cs. Exactas, UNLP

LA PLATA, 2021

## *Agradecimientos*

*A las autoridades del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) por haberme permitido realizar mi Trabajo Final de Grado.*

*A la Universidad Nacional de La Plata y a todos los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas por la formación que me han brindado a lo largo de estos años.*

*A mis directores, Analía y Judith, por los conocimientos que me han brindado, por su ayuda, su tiempo y la confianza depositada.*

*A mis padres Aldo y Silvia, por la educación y los valores que me brindaron, por preocuparse por mí, por su paciencia, su cariño y apoyo en todo momento.*

*A mi hermano Matías y su familia por el aliento y afecto incondicional que siempre me brindaron a pesar de la distancia y las obligaciones.*

*A mi abuela Ana por haberme acompañado durante todo este largo proceso, siempre con la esperanza de que pueda cumplir mis metas.*

*A mi novia Eva por estar siempre, en especial en los momentos difíciles, alentándome a no bajar los brazos nunca; y a su familia por confiar siempre en mí.*

*A mis compañeros de la facultad con los que tantos buenos momentos compartimos, en especial a Nina que siempre estuvo ayudándome en todo lo que necesitaba.*

*A los integrantes del laboratorio y a todas las personas que me ayudaron en la realización de este trabajo.*

*¡Muchas Gracias a todos!*

# ÍNDICE

---

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>Bacterias ácido lácticas</b>	1
Fermentación homoláctica	1
Fermentación heteroláctica	2
<b>Microorganismos probióticos</b>	3
Características de los probióticos	3
<b>Producción de quesos</b>	4
Historia del queso en Argentina	4
El queso como alimento: generalidades y origen	4
El queso según el Código Alimentario Argentino (CAA)	5
Elaboración	7
<i>Tratamiento de la leche</i>	8
<i>Coagulación</i>	8
<i>Corte de la cuajada y su desuerado</i>	8
<i>Moldeo</i>	8
<i>Prensado</i>	8
<i>Salado</i>	9
<i>Maduración y afinado</i>	9
Tipos de coagulación	9
<i>Coagulación por acidificación</i>	9
<i>Coagulación enzimática</i>	9
Principios de la maduración	10
<b>Quesos de pasta blanda</b>	11
<b>OBJETIVOS</b>	13
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
<b>Cepas empleadas</b>	14
<b>Medios de cultivo y coloraciones</b>	14
Leches	14

Caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe, 1960)	14
Agar MRS	15
Solución diluyente	15
Coloración de GRAM	15
<b>Cinética de acidificación</b>	16
<b>Determinación del número de microorganismos viables en leches fermentadas</b>	16
<b>Determinación del número de microorganismos viables en quesos</b>	17
<b>Evaluación del contenido de ácidos orgánicos en leches fermentadas</b>	18
<b>Caracterización de enzima</b>	18
<b>Elaboración de quesos ácidos</b>	19
<b>Elaboración de quesos enzimáticos</b>	20
<b>Evaluación de exudado</b>	21
<b>Evaluación de la composición de los quesos</b>	21
Determinación de humedad por el método indirecto	21
Determinación de cenizas	21
Determinación del contenido proteico por el método de Kjeldahl	21
Determinación de hidratos de carbono por el método de Antrona	23
Determinación del contenido de lípidos	23
<b>Evaluación del comportamiento de flujo mediante viscosimetría rotacional</b>	24
<b>Reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación</b>	24
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	25
<b>Fermentación/coagulación de las leches</b>	25
Cinéticas de acidificación de leches	25
Evolución del número de microorganismos viables en leches fermentadas	26
Producción de ácidos orgánicos en leches fermentadas	26
Evaluación reológica de las leches fermentadas	27
<b>Quesos ácidos</b>	29
Rendimiento de obtención de quesos ácidos	29
Composición de los quesos ácidos	30
Exudado en función del tiempo de almacenamiento	31
Concentración de los microorganismos viables en los quesos	32
Características reológicas	33

<i>Evaluación mediante viscosimetría rotacional</i>	33
<i>Reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación</i>	36
<b>Quesos obtenidos por desestabilización ácida y enzimática</b>	41
Caracterización de la enzima	42
Rendimiento	42
Composición de los quesos	43
Exudado en función del tiempo de almacenamiento	44
Evolución de la concentración de microorganismos en los quesos en función del tiempo	45
Características reológicas de los quesos	45
<i>Evaluación mediante viscosimetría rotacional</i>	46
<i>Evaluación mediante reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación</i>	48
<b>CONCLUSIONES</b>	56
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	58

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos Gram positivos, no esporulados, habitualmente inmóviles, tolerantes al ácido y fermentadores estrictos ya que carecen de porfirinas y citocromos, involucrados en el transporte de electrones. Su denominación se debe a que son capaces de producir ácido láctico como principal producto final de la fermentación de hidratos de carbono. Desarrollan mejor en anaerobiosis, aunque la mayoría es capaz de tolerar el oxígeno. De acuerdo a su morfología celular se clasifican en cocos o bacilos. Pueden ser mesófilos, cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 25 y 30°C o termófilos cuando la misma oscila entre los 40 y 44°C (Marshall *et al.*, 1984; Novel, 1993).

Son microorganismos con una limitada capacidad biosintética, que requieren factores de crecimiento complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos. Carecen de la capacidad de biosíntesis del grupo hemo, razón por la cual son catalasa negativos. Según los metabolitos finales que se producen en el catabolismo de carbohidratos, las BAL pueden ser homo o heterofermentativas. Las primeras fermentan hexosas casi exclusivamente a ácido láctico, mientras que el segundo grupo produce además cantidades importantes de otros componentes como etanol, ácido acético y dióxido de carbono (Kandler & Weiss, 1984).

### 1.1.1 Fermentación homoláctica

En algunas BAL, el transporte de la lactosa involucra el sistema fosfoenolpiruvatofosfotransferasa dependiente (PEP/PTS), complejo formado por cuatro proteínas, que a su vez se encarga de fosforilar la lactosa, generando lactosa-fosfato (Dills *et al.*, 1980; Zourari *et al.*, 1992; Cogan & Hill, 1993; Monnet *et al.*, 1996). Ésta luego se hidroliza por la  $\beta$ -fosfogalactosidasa ( $\beta$ -Pgal) generando glucosa y galactosa. Estos monosacáridos son catabolizados por las vías de Tagatosa y Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), respectivamente. En ambos casos, los monosacáridos se transforman en gliceraldehído-3-fosfato y finalmente en piruvato, para dar lugar al lactato (Figura 1).

El transporte de lactosa en *Staphylo thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* involucra proteínas citoplasmáticas (permeasas) que permiten la traslocación del disacárido con gasto de ATP pero sin modificación química, es decir, sin fosforilación. Luego la lactosa es desdoblada por la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) en glucosa y galactosa. La glucosa entra en la ruta glucolítica, pero la galactosa es excretada por la célula (Figura 1). Cuando la glucosa se agota, algunos microorganismos son capaces de transportar la galactosa utilizando la vía de Leloir para metabolizarla. *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y

muchas cepas de *S. thermophilus* no pueden metabolizar galactosa (Johnson & Steele, 2001).

El metabolismo homofermentativo se puede resumir en la siguiente reacción:

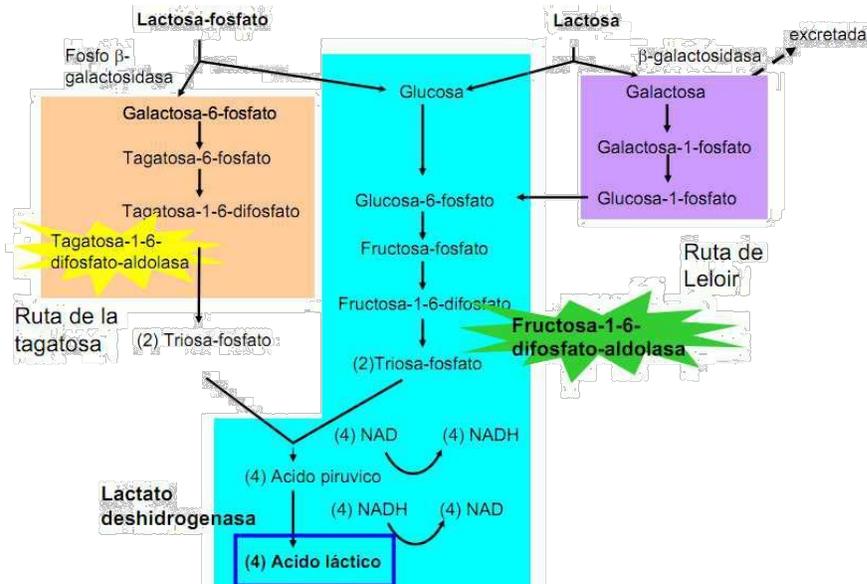


Figura 1: Metabolismo de la lactosa en bacterias lácticas homofermentativas.  
Fuente: [imb.usal.es/formación/docencia/microbioapli/TEMA1.pdf](http://imb.usal.es/formación/docencia/microbioapli/TEMA1.pdf)

### 1.1.2 Fermentación heteroláctica

La lactosa es transportada por medio de permeasas, y a su vez, hidrolizada en glucosa y galactosa. Los microorganismos que realizan esta fermentación no poseen la enzima aldolasa así que transforman a la glucosa (hexosa) en una pentosa, la cual es transformada a su vez en gliceraldehido-3-fosfato y acetil fosfato. El destino del acetil fosfato depende de los aceptores de electrones disponibles. Cuando no existe otra alternativa, este compuesto es reducido hasta etanol, regenerando dos moléculas de NAD<sup>+</sup> en el proceso. Sin embargo, cuando la concentración de oxígeno es tolerada, el NAD<sup>+</sup> es regenerado por otras enzimas (oxidasas y peroxidasas) dejando el acetil fosfato disponible para ser convertido en acetato. Normalmente la fermentación de dos moléculas de glucosa produce tres moléculas de acetato y dos de lactato (Figura 2).

El metabolismo heterofermentativo se puede resumir en la siguiente ecuación:





intestinal y la regulación del nivel de colesterol sérico. Además, disminuyen la intolerancia a la lactosa (Marteau et al., 1997) y la incidencia y duración de las diarreas por rotavirus en lactantes (Saavedra et al., 1994).

Asimismo, se han propuesto los siguientes efectos para los productos que contienen bacterias probióticas: actividad antimicrobiana, mejora a la intolerancia a la lactosa, propiedades antimutagénicas, propiedades anticancerígenas, ayuda a regular el nivel del colesterol, acción contra diversos desórdenes gastrointestinales, estimulación de la repuesta inmune, etc. (Shah, 2007). Algunos de estos beneficios están bien establecidos mientras que otros todavía requieren investigaciones en humanos.

Para asegurar estos efectos se requieren concentraciones de microorganismos mayores a  $10^7$  UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo). Para los productos lácteos que se consumen regularmente, este es el nivel mínimo sugerido de células probióticas viables (Shah et al., 1995; Samona & Robinson, 1994; Arroyo, Cotton & Martin, 1994; Rybka & Kailasapathy, 1995; Pagano, 1998).

### **1.3 Producción de Quesos**

#### **1.3.1. Historia del queso en Argentina**

En Argentina, antes de 1850 se registran pocos datos sobre la producción quesera nacional. Existen registros del año 1617, en el que se destaca una rudimentaria actividad quesera, de la mano de los jesuitas, quienes introdujeron en las comunidades indígenas la cultura del consumo de leche y quesos. En 1788 aparece la actividad lechera como alternativa a la poca rentabilidad por venta de carne y cuero de los chacareros cercanos a la villa de Buenos Aires (actividad principal de la economía rioplatense). Recién a partir de mediados del siglo XIX se produjo un gran desarrollo de la quesería argentina, impulsada por inmigrantes europeos que aportaron sus tecnologías principalmente italianas, españolas y suizas (Castañeda et al., 2010).

#### **1.3.2. El queso como alimento: Generalidades y origen**

Muchos ejemplos en la literatura técnica y científica establecen que la denominación de queso hace referencia a un conjunto de productos lácteos fermentados que se obtienen en todo el mundo en una amplia variedad de *flavours*, formas y texturas (Fox, 2000). Se cree que en la actualidad, existen más de 1000 variedades de quesos en todo el mundo (Beresford et al., 2005; Fox & McSweeney, 2004).

Los primeros quesos se elaboraron en Asia, en la zona de la Mesopotamia, entre los ríos Tigris y Éufrates, en lo que es actualmente Irak, hace unos 9000 años, durante la llamada Revolución Agrícola Neolítica. En ese período se desarrolló la agricultura y se domesticaron los primeros animales. Las primeras hembras lecheras domesticadas fueron las cabras y las ovejas, y los primeros quesos se elaboraron con leche de este origen. Las

vacas, que fueron domesticadas poco después, rápidamente las reemplazaron como productoras de leche en aquellos lugares donde era posible su cría, por los mayores rendimientos (Nantet, 1994; Fox *et al.*, 2000). El primer producto lácteo fermentado probablemente fue consecuencia de la acidificación debida al desarrollo de bacterias lácticas, que produjeron ácido en cantidad suficiente para reducir el pH de la leche hasta el punto isoeléctrico de las caseínas, causando que las mismas coagulen (Fox *et al.*, 2000; Fox & McSweeney, 2004). Por otra parte, la leche se almacenaba en recipientes hechos de pieles, vejigas o estómagos de animales. Se cree que la coagulación enzimática fue consecuencia del almacenamiento de leche en odres hechos con estómagos de terneros o cabritos. Aunque el cuajo de animales fue utilizado desde épocas remotas, es probable que también en la antigüedad se utilizaran cuajos de plantas, como por ejemplo el proveniente del cardo (Fox *et al.*, 2000; Fox & McSweeney, 2004). Existen vestigios arqueológicos de cerámicas diseñadas para elaborar queso, para eliminar suero, realizadas entre los años 5000 y 2000 a. C. Merecen ser citadas las vasijas con alimentos similares al queso, en las tumbas de algunos faraones, y el friso egipcio existente en el museo de Louvre, en París, en el cual se ve a un hombre ordeñando desde el costado de un animal (Castañeda *et al.*, 2010). En el antiguo testamento, existen varias referencias al queso, tales como en Job (1520 a.C.) y Samuel (1017-1170 a.C.). La mitología de la Antigua Grecia, atribuía a Aristeo el descubrimiento del queso. En la Odisea de Homero (800 a 701 a.C.) se describe a un Cíclope haciendo y almacenando quesos de oveja y cabra, queso que podría haber sido el antecesor del queso Feta (Scott, 1998; Fox *et al.*, 2000; Fox & McSweeney, 2004).

La posibilidad de convertir los principales componentes de la leche en queso tuvo varias ventajas entre las que se destacan la estabilidad de los componentes, el fácil transporte y la contribución a la diversificación de la dieta humana, expandiéndose rápidamente al Medio Oriente, Egipto, Grecia y Roma. En los tiempos de la Antigua Roma era un alimento que se consumía a diario, y su proceso de fabricación no distaba demasiado a como se hace actualmente fuera del ámbito industrial.

La elaboración de los quesos se mantuvo como una actividad artesanal hasta el siglo XIX, cuando el microbiólogo Luis Pasteur descubrió la pasteurización, lo cual cambió el proceso de elaboración de quesos. Con la adquisición gradual de conocimientos sobre química y microbiología de la leche y el queso, se hizo posible generar más control sobre el proceso de fabricación y se mejoró la calidad de los mismos. A partir del siglo XX, los avances en la tecnología permitieron un desarrollo muy importante en la industria quesera a gran escala (Fox *et al.*, 2000; Fox & McSweeney, 2004; Castañeda *et al.*, 2010).

### 1.3.3. El Queso según el Código Alimentario Argentino (CAA)

“Se entiende por Queso el producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o

especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes.”

Se entiende por Queso Fresco el que está listo para el consumo poco después de su fabricación (Capítulo VIII artículo 605).

Se entiende por Queso Madurado el que ha experimentado los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos de la variedad de queso. (Capítulo VIII artículo 605).

Clasificación:

**a.** De acuerdo con el contenido de materia grasa del extracto seco en porcentaje, los quesos se clasifican en:

- Extra graso o Doble crema: cuando contengan no menos del 60%.
- Grasos: cuando contengan entre 45,0 y 59,9%.
- Semigrasos: cuando contengan entre 25,0 y 44,9%.
- Magros: cuando contengan entre 10,0 y 24,9%.
- Descremados: cuando contengan menos de 10,0%.

**b.** De acuerdo con el contenido de humedad, en porcentaje, los quesos se clasifican en:

- Quesos de baja humedad (generalmente conocidos como de pasta dura): humedad hasta 35,9%.
- Quesos de mediana humedad (generalmente conocidos como de pasta semidura): humedad entre 36,0 y 45,9%.
- Quesos de alta humedad (generalmente conocidos como de pasta blanda o macíos): humedad entre 46,0 y 54,9%.
- Quesos de muy alta humedad (generalmente conocidos como de pasta muy blanda o mole): humedad no menor a 55,0%.

En la elaboración de quesos se utilizarán:

**a.** Ingredientes obligatorios: Leche y/o leche reconstituida (integral o entera, semi desnatada o parcialmente descremada, desnatada o descremada y/o suero lácteo). Se entiende por leche la proveniente de especies bovina, caprina, ovina o bufalina. Cuando no exista una referencia específica de la especie, entiéndase como leche bovina. Coagulante apropiado (de naturaleza física y/o química y/o bacteriana y/o enzimática).

**b.** Ingredientes opcionales: Cultivo de bacterias lácticas u otros microorganismos específicos, cloruro de sodio, cloruro de calcio, caseína, caseinatos, sólidos de origen lácteo, especias, condimentos u otros ingredientes opcionales, permitidos solamente conforme a lo previsto explícitamente en los artículos que describen variedades individuales o grupos de variedades individuales de ciertas variedades particulares de quesos.

c. Aditivos: Podrán ser utilizados en la elaboración de quesos los aditivos permitidos para: Regular la acidez, aromatizar, conservar, dar coloración, espesar, estabilizar y ayudar a la maduración.

d. Coadyuvantes de tecnología / elaboración: Cultivos de bacterias lácticas u otros microorganismos específicos.

### 1.3.4. Elaboración

La siguiente figura (Figura 3) ilustra las etapas que comprende la producción industrial de queso:

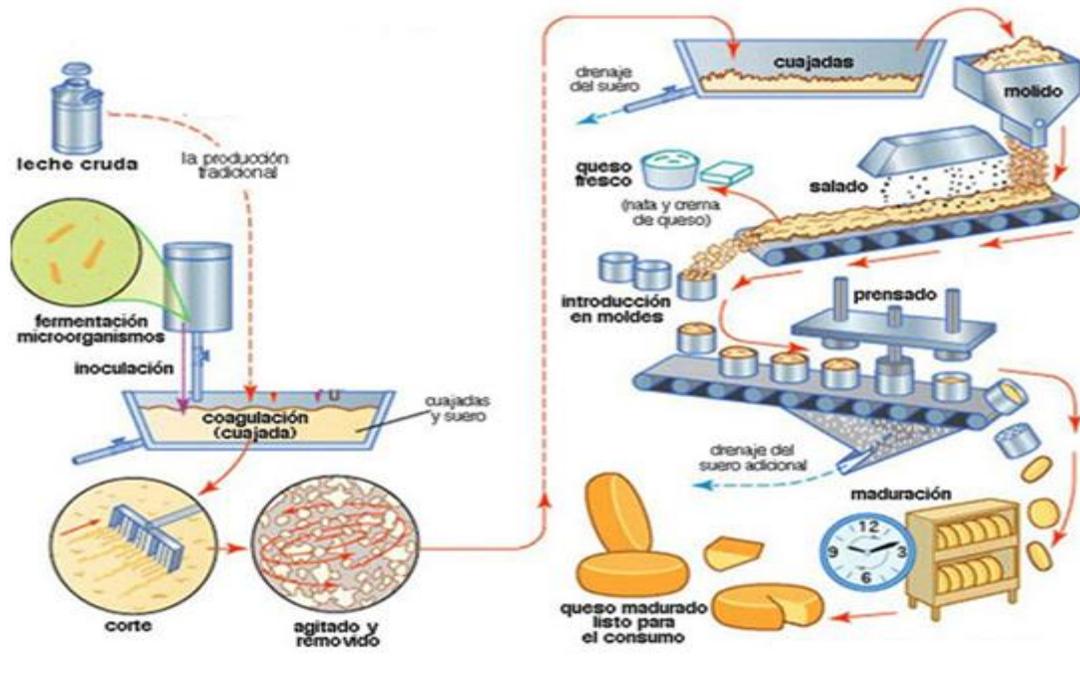


Figura 3: Esquema de las etapas de elaboración de quesos en la industria.

Fuente: <http://gestiondemercados2011.blogspot.com/2011/02/procesos-tecnologicos-para-la.html>

La transformación de la leche en queso generalmente comprende siete etapas:

- Tratamiento de la Leche
- Coagulación
- Corte de la cuajada y su desuerado
- Moldeo
- Prensado
- Salado
- Afinado o Maduración

### *Tratamiento de la leche*

Esta fase consiste en el filtrado de la leche para eliminar macro-sustancias extrañas procedentes de su manipulación. A continuación puede añadirse o eliminarse materia grasa, según el tipo de queso que se quiera elaborar. Tras este proceso, la leche debe homogeneizarse para igualar el tamaño de las partículas que la componen y así obtener una textura más uniforme. Una vez que se han realizado estos pasos se pasteuriza la leche y se traslada a las cubas de elaboración.

### *Coagulación*

En la cuba de elaboración la temperatura de la leche se eleva hasta alrededor de 35°C y se le añaden, dependiendo del tipo de queso que se quiera elaborar, fermentos lácticos y/o coagulantes tipo vegetal o animal (cuajo). Una vez finalizado el tratamiento y coagulación, la leche se transforma pasando de un estado líquido a un estado sólido o semisólido debido a la aglutinación de las micelas de caseína, formándose un gel (cuajada) que retiene además los glóbulos de grasa, agua y sales.

### *Corte de la cuajada y su desuerado*

Una vez transcurrido el tiempo de coagulación y comprobando que el gel o cuajada tienen la consistencia y textura adecuada, se procede a su corte mediante unos instrumentos denominados liras que presentan una serie de hilos tensos y paralelos entre sí. El tamaño del corte determinará el tipo de queso a elaborar. Cuanto más pequeño el tamaño de corte menor humedad tendrá el futuro queso. Como consecuencia de dicho corte se produce un drenaje inicial del suero. El siguiente paso según el tipo de queso a elaborar es trabajar en la cuba de elaboración mediante agitación y elevación de la temperatura favoreciendo todavía más la expulsión del suero. El último paso, “el desuerado”, sirve para eliminar el suero de la cuajada.

### *Moldeo*

Consiste en la colocación de los granos de la cuajada en moldes. Estos moldes son actualmente de acero inoxidable o de plástico alimenticio.

### *Prensado*

Una vez llenados los moldes se continúa con el prensado, que tiene como finalidad dar la forma definitiva al queso, evacuar el suero y el aire atrapado entre los granos y favorecer la unión de la cuajada. La presión y la duración del prensado dependerán del tipo de queso que se desee elaborar. En la mayoría de las queserías actualmente se realiza la presión de forma mecánica.

### *Salado*

Esta fase tiene el propósito fundamental de regular el proceso microbiano evitando el crecimiento de microorganismos indeseables, contribuir al desuerado de la cuajada, otorgar y potenciar la formación de la corteza y el sabor. Puede realizarse en seco, recubriendo la superficie del queso con cloruro de sodio (sal), o por inmersión en un baño de salmuera (NaCl 0,3 kg/l).

### *Maduración y Afinado*

En esta fase los quesos son mantenidos en cámaras o cuevas de maduración donde se controla la temperatura, la humedad y la aireación. Durante esta fase existen procesos mecánicos frecuentes como la rotación de los quesos, consiguiendo que la maduración sea uniforme y evitando que se deformen. Es una etapa muy importante ya que se producen en el queso una serie de reacciones y cambios físico-químicos que determinarán el aroma, el sabor, la textura, el aspecto y consistencia (Poncelet, 2014; Johnson, M. E., 2017).

#### 1.3.5. Tipos de coagulación

##### *Coagulación por acidificación*

La presencia de ácido láctico en la leche, bien por adición o bien como consecuencia de una fermentación láctica, produce un descenso del pH. Esta disminución, si es progresiva, hace que el calcio y fósforo micelar aumenten su solubilidad abandonando la micela y pasará a formar parte de la fase acuosa. El resultado es una micela de menor tamaño, y menos estable. Si la acidificación llega a pH 4,6 (punto isoeléctrico de las caseínas), se logra una carga eléctrica neta nula, la concentración de iones positivos se iguala a la de iones negativos. Las submicelas totalmente desmineralizadas modificadas en su estructura se unen mediante enlaces intermoleculares de naturaleza electrostática e hidrofóbicos, dando lugar a un gel muy frágil (Valencia, 2011).

##### *Coagulación enzimática*

Existen proteasas específicas de origen animal, vegetal o microbiano que poseen la propiedad de coagular la leche.

Fase enzimática: la acción específica de la enzima provoca una proteólisis específica de la  $\kappa$  caseína en el enlace 105-106 (Fenilalanina – Metionina), que la escinde en dos productos: del aminoácido 1 al 105 llamado para- $\kappa$ -caseinato y del aminoácido 106 al 169 llamado caseino-macropéptido. Esta hidrólisis se realiza a gran velocidad. El para- $\kappa$ -caseinato permanece unido a la micela y tiene una naturaleza hidrofoba, mientras que el caseinomacropéptido que corresponde al extremo glicosilado de la  $\kappa$  caseína posee un marcado carácter hidrófilo y, al separarse de la micela caseínica, pasará a la fase acuosa.

Fase de coagulación: al perder un fragmento de la  $\kappa$ -caseína, las micelas sufren una disminución importante de su carga eléctrica, viéndose disminuido también su grado de hidratación. Con esta nueva configuración se podrán establecer enlaces entre las micelas de para- $\kappa$ -caseinato cálcico que darán lugar a un gel. Las caseínas que ahora no se encuentran protegidas por la  $\kappa$ -caseína, se enlazan mediante uniones salinas de calcio y de fosfato cálcico. Estos dos últimos elementos son los que juegan el papel más importante en la formación de agregados o flóculos de micelas de paracaseinato de calcio. Los puntos de agregación de las micelas no se encuentran repartidos uniformemente en su superficie, por lo que se forman una especie de fibrillas que a su vez establecen enlaces, dando lugar a un retículo tridimensional que retiene grasa y suero en una primera instancia y los demás constituyentes de la leche (Valencia, 2011).

#### 1.3.6. Principios de la maduración

Durante la maduración de los quesos, la proteólisis es catalizada por enzimas que provienen principalmente de las bacterias empleadas como *starter*, de la leche (especialmente plasmina) y de las bacterias ácido lácticas que no provienen del starter (Sousa *et al.*, 2001, Upadhyay *et al.*, 2004).

La transformación es debida fundamentalmente a cambios bioquímicos, casi todos de naturaleza enzimática, que se llevan a cabo sobre los principales componentes de la leche que han sido retenidos en la cuajada: lactosa, materia grasa y proteínas. Estos cambios están acompañados por otros de naturaleza exclusivamente física, que ocurren simultáneamente y en cierta forma determinan las condiciones para que sucedan los primeros. Se trata de procesos de difusión de sal y de pérdidas de humedad (Fox & McSweeney, 1998). Asimismo, se han informado algunos cambios netamente químicos, como los equilibrios químicos de calcio, y reacciones químicas no catalizadas por enzimas (Walstra *et al.* 2001).

El metabolismo de la lactosa en el queso juega un rol muy importante. La mayor parte se elimina con el suero (aproximadamente el 98%), y queda en la cuajada únicamente la lactosa disuelta en la fase acuosa, que metabolizan las bacterias lácticas, produciendo ácido láctico (McSweeney, 2004; McSweeney & Fox, 2004; Zalazaret *al.*; 2006; McSweeney, 2011). Estas pequeñas cantidades residuales pueden influir en fenómenos claves de la calidad del producto, como post acidificación o formación de compuestos volátiles. Por esta razón, el correcto desarrollo de la fermentación láctica es un aspecto crucial de la elaboración de quesos (McSweeney & Fox, 2004; McSweeney, 2011).

El lactato proveniente de la fermentación también puede sufrir transformaciones durante la maduración. En los quesos que contienen bacterias propiónicas u hongos, el lactato es un importante sustrato que determina la calidad y características específicas de los productos (McSweeney, 2004).

En cuanto al citrato, el 90% del mismo se pierde en el suero (Fox *et al.*, 2000; McSweeney, 2004; Zalazaret *al.*; 2006). El citrato que queda remanente, es de gran importancia para el desarrollo de *flavor*, dado que puede ser metabolizado por las bacterias

citrato positivas generando compuestos volátiles que suman al *flavor* del queso (Fox *et al.*, 2000; Quintans *et al.*, 2008; McSweeney, 2011).

La lipólisis refiere a un conjunto de reacciones de hidrólisis de los triglicéridos para dar di o mono-acilgliceroles, ácidos grasos libres y glicerol. En algunos quesos madurados por hongos y en menor medida en quesos duros, es un fenómeno importante (Mc Sweeney, 2004). En los quesos duros de pasta cocida la degradación de los triglicéridos para dar ácidos grasos libres y sus derivados es significativa, probablemente debido al largo periodo de maduración, que permite la expresión de la actividad lipolítica relativamente débil que está presente en el queso (Gobetti & DiCagno, 2003). La lipólisis así desarrollada es una transformación necesaria para la formación del *flavor* genuino de este tipo de producto, en el que los ácidos grasos libres pueden ser transformados por los microorganismos en otros compuestos que impactan más fuertemente en el *flavor*, como las metilcetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehídos (Sousa *et al.*, 2001; Perotti *et al.*, 2005; Vélez, 2013).

La degradación de las proteínas que conforman la matriz proteica del queso, y la posterior hidrólisis de los péptidos provenientes de dicha transformación, constituyen el conjunto de reacciones cuantitativamente más importante durante el periodo de maduración y almacenamiento del queso y se conocen globalmente como proteólisis (Fox *et al.*, 1993; Gobetti & DiCagno, 2003; O'Mahony *et al.*, 2005). Las reacciones que se agrupan bajo el título de proteólisis están vinculadas a distintos aspectos relacionados con la calidad del queso. En primer lugar, la textura y las propiedades de fractura parecen estar relacionadas al grado de hidrólisis de las proteínas, que a su vez impacta sobre su capacidad de ligar agua, aunque el equilibrio salino de los minerales de calcio, presentes en cantidades significativas en el queso, también ha sido señalado como un factor muy importante para determinar la estructura del alimento (Lucey *et al.*, 2003; Hassan *et al.*, 2004; O'Mahony *et al.*, 2005). Por otra parte, la proteólisis y peptidólisis proveen los principales sustratos para la bioformación de aroma y sabor en queso (Sousa *et al.*, 2001; Upadhyay *et al.*, 2004; McSweeney, 2011).

#### 1.4 Quesos de pasta blanda

Generalmente son quesos con alto porcentaje de humedad. Se caracterizan por ser producidos con leche de vaca (entera, parcial o totalmente descremada) coagulada la mayoría por acidificación láctica, complementada o no por cuajo y/o enzimas específicas. En algunos casos llevan el agregado de crema. Las características sensoriales varían según el tipo de pasta y maduración. Algunos de los quesos de pasta blanda son: queso Blanco, Petit Suisse, Cottage, Mozzarella, Caccio, Crema, Cuartirolo, Cremoso, Brie y Camembert, Limburgo o Romadur, Por Salut y Criollo (Ficha 38 Quesos Alimentos Argentinos, 2015).

En función de poder potenciar y contribuir a resaltar las características esperadas para los quesos de pastas blandas, surge la posibilidad de elaborar los mismos con la utilización de bacterias ácido lácticas productoras de polisacáridos, que a su vez también aportarían al producto una función probiótica. Un aspecto nada menor en la actualidad, donde la alimentación equilibrada y saludable, se encuentra más instalada y naturalizada en el consciente colectivo de la comunidad.

## 2. OBJETIVOS

---

### Objetivo general:

Elaborar y caracterizar quesos blandos a partir de la fermentación de leche con bacterias ácido lácticas productoras de polisacáridos sin o con acción adicional de renina.

### Objetivos particulares:

- Obtener quesos ácidos empleando cepas de *Lactobacillus paracasei* productoras de polisacáridos.
- Obtener quesos empleando renina que incluyan además cepas de *Lactobacillus paracasei* productoras de polisacáridos.
- Evaluar las características fisicoquímicas (composición, capacidad retención de agua y textura) y número de microorganismos viables de los productos obtenidos y en función del tiempo de almacenamiento.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1 Cepas empleadas

Se emplearon las siguientes cepas:

- *Lacticaseibacillus paracasei* (anteriormente *Lactobacillus paracasei*) CIDCA 8339
- *Lacticaseibacillus paracasei* (anteriormente *Lactobacillus paracasei*) CIDCA 83124

Ambos microorganismos pertenecientes a la colección CIDCA, fueron aislados a partir de gránulos de kéfir (Hamet *et al.*, 2013).

Las cepas se conservaron a -80 °C, empleando leche estéril como crioprotector. El cepario de trabajo se conservó a -20 °C. Para los ensayos, las cepas se reactivaron en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) y posteriormente se cultivaron en leche estéril a 30 °C. En todos los casos se verificó la morfología y pureza de los cultivos por coloración de Gram y microscopía.

### 3.2 Medios de cultivo y coloraciones

#### 3.2.1 Leches:

La leche empleada tanto para la preparación de los inóculos como para la elaboración de quesos ácidos fue Leche parcialmente descremada, Ultra Alta Temperatura, homogeneizada (La Serenísima, Mastellone Hnos. S.A.). Mientras que para la caracterización de la renina y la elaboración de quesos enzimáticos se utilizó leche cruda proveniente del tambo de la Universidad Nacional de La Plata.

#### 3.2.2 Caldo MRS (Man–Rogosa–Sharpe, 1960)

Peptona	10,0 g/L
Extracto de carne	10,0 g/L
Extracto de levadura	5,0 g/L
Glucosa	20,0 g/L
Fosfato ácido de dipotasio	2,0 g/L
Tween 80	1,0 g/L
Citrato ácido de amonio	2,0 g/L

Acetato de sodio	5,0 g/L
Sulfato de magnesio	0,1 g/L
Agua	c.s.p. 1 L

### 3.2.3 Agar MRS

Caldo MRS adicionado con agar en una concentración de 15 g/L

### 3.2.4 Solución diluyente

Triptona 1,0 g/L

### 3.2.5 Coloración de Gram

Cristal violeta: 10 g/L en agua destilada

Safranina (solución madre): 25 g/L en etanol

Safranina (solución de trabajo): solución madre diluida 1/10 en agua destilada

Lugol: 10 g I<sub>2</sub> + 20 g KI en 1 litro de agua destilada

Decolorante: etanol-acetona 4:1

Las soluciones fueron filtradas antes de utilizarlas

#### *Protocolo*

- 1- Extender, secar y fijar a la llama.
- 2- Cubrir durante 2 minutos con la solución de cristal violeta.
- 3- Escurrir y cubrir con la solución de Lugol durante 30 segundos.
- 4- Escurrir y cubrir nuevamente con Lugol durante 30 segundos.
- 5- Decolorar con etanol- acetona y lavar con abundante agua
- 6- Cubrir con la solución de safranina durante 2 minutos.
- 7- Dejar secar o secar entre papeles de filtro y observar con objetivo de inmersión.

### 3.3 Cinética de acidificación

Para estudiar la capacidad acidificante de *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. paracasei* CIDCA 83124 en leche parcialmente descremada ultrapasteurizada y homogeneizada, las cepas se reactivaron en leche a 30 °C. Para ello 10 ml de leche se inocularon con 500  $\mu$ l de fermento activo en caldo MRS de cada cepa correspondiente, y posteriormente se incubaron a 30 °C para que la cepa se adapte al cambio de medio. Luego un volumen de 100 ml de leche se sembró con 1 ml del fermento ya adaptado a crecer en leche y se incubaron a 30 °C. Se registró el valor de pH en función del tiempo hasta coagulación de la muestra empleando un pHmetro con un microelectrodo combinado de vidrio (Cole-Parmer).

### 3.4 Determinación del número de microorganismos viables en leches fermentadas

Se evaluó el número de microorganismos viables en cada una de las leches al final de la fermentación empleando la técnica de recuento en placa. Para ello se partió de 0,5ml de cada una de las leches fermentadas que se colocaron en 4,5ml de triptona 0,1% y posteriormente se realizaron diluciones seriadas. Las diluciones convenientes fueron sembradas en placas de agar MRS (Figura 4).

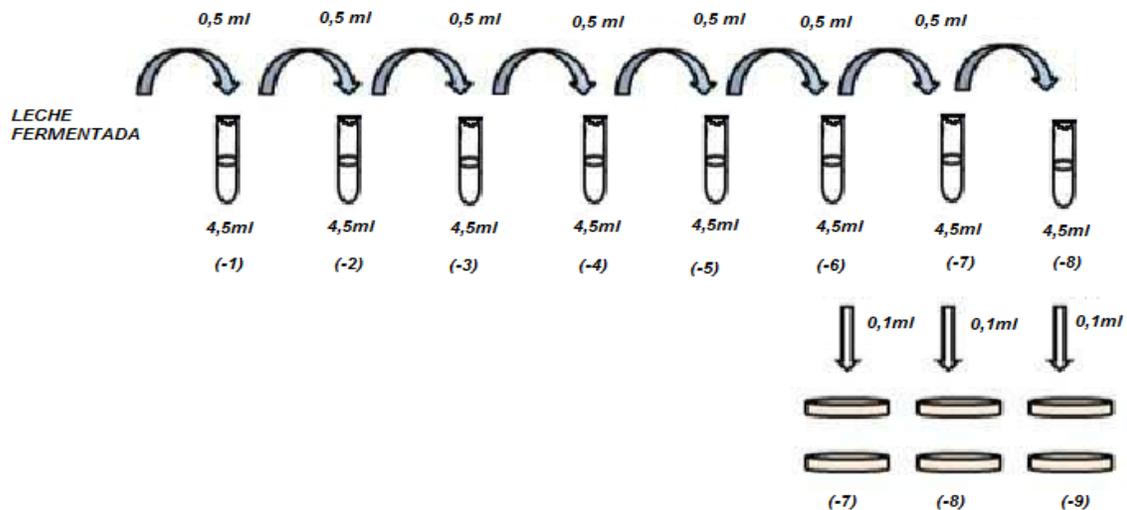


Figura 4: Esquema de las diluciones seriadas que fueron empleadas para la evaluación del número de microorganismos viables en leche fermentadas.

Finalmente, las placas fueron incubadas en estufa a 30 °C durante 24-48 horas y pasado dicho tiempo se realizó el recuento de las colonias y se calculó el número de unidades formadoras de colonia presentes en la muestra de leche (UFC/ml).

### 3.5 Determinación del número de microorganismos viables en quesos

Se tomaron 0,5g de los quesos obtenidos, se colocaron en 4,5ml de triptona al 0,1% y se realizaron diluciones seriadas, luego 100µl de las diluciones apropiadas se sembraron en placas de agar MRS (Figura 5).

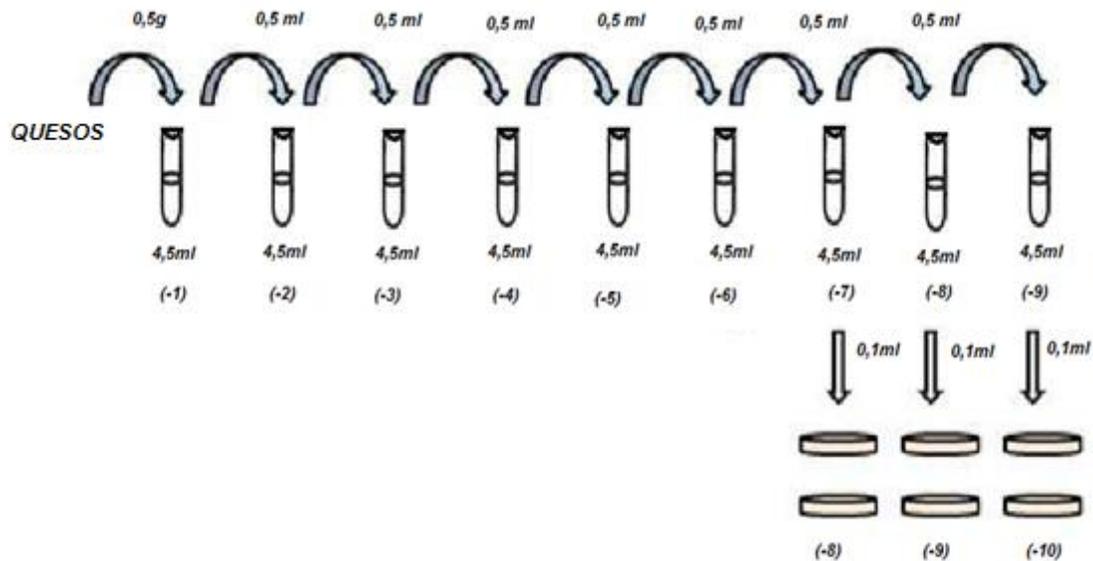


Figura 5: Esquema de las diluciones seriadas que fueron empleadas para la evaluación del número de microorganismos viables en quesos.

Finalmente, las placas fueron incubadas en estufa a 30°C durante 24-48 horas. Se realizó el recuento de las colonias y se calculó el número de UFC/g de queso.

### 3.6 Evaluación del contenido de ácidos orgánicos en leches fermentadas

El análisis de ácidos orgánicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de acuerdo al método descrito por Lombardi *et al.* (1994). Inicialmente las muestras de leches fermentadas fueron centrifugadas durante 15 min a 10.000 *g* (Microcentrífuga Eppendorf 5430). Los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana estéril de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, USA) y se diluyeron (1:10) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,009 N. La separación se llevó a cabo en una columna de intercambio iónico AMINEX HPX 87H (Biorad Labs) y se utilizó un detector UV a 214 nm (Waters<sup>TM</sup> 996, Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA). La determinación se realizó a una velocidad de flujo de 0.7 ml/min a 60°C utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.009 N como fase móvil. Los solventes fueron previamente desgaseados bajo vacío. La identificación se basó en la comparación de los tiempos de retención de los picos presentes en la muestra con los correspondientes a patrones de ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Para la cuantificación se realizaron calibraciones en base a las áreas de los picos obtenidos al evaluar soluciones de los patrones de concentraciones conocidas (500, 1.000, 4.000, 8.000, 10.000 y 14.000 mg/L).

### 3.7 Caracterización de enzima

Se utilizó renina en polvo Far M (Christian Hansen). Se prepararon diferentes concentraciones de enzima (10 a 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Se agregaron 200 $\mu\text{l}$  de cada dilución a diferentes recipientes que contenían 200ml de leche de tambo pasteurizada mediante tratamiento térmico a 65°C durante 15 min incluyendo  $\text{CaCl}_2$  1M al 0,3%. Las muestras se colocaron en baño termostático a 37°C y se registró el tiempo de formación del coágulo, con el fin de poder definir la concentración de enzima más adecuada en relación al tiempo necesario para la formación del coágulo en el sistema estudiado.

### 3.8 Elaboración de quesos ácidos

En vasos plásticos estériles, se colocaron 100ml de leche descremada ultra al temperatura homogeneizada comercial y se inocularon con 1ml de cultivos frescos de *L. paracasei* CIDCA 8339 o *L. paracasei* CIDCA 83124. Se incubó a 20 °C el tiempo necesario para alcanzar pH 4,5.

Luego se procedió a desuerar los quesos por acción de la gravedad a través de un lienzo doble durante 48h a 4°C (Figura 6).



Figura 6: Esquema de elaboración de quesos ácidos elaborados con inóculo de cultivos frescos de *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. paracasei* CIDCA 83124.

### 3.9 Elaboración de quesos enzimáticos

La leche cruda fue sometida a un tratamiento térmico de pasteurización a 65 °C durante 15 min. Se disminuyó la temperatura hasta 30 °C y luego se mantuvo empleando un baño termostático. Se adicionó CaCl<sub>2</sub> 1M (3ml por litro de leche) y 10ml de inóculo de cada cepa (cultivo fresco en leche). Se mantuvo por 30 minutos y posteriormente se llevó la temperatura a 37°C y se adicionó la renina Far M (Christian Hansen).

La enzima se hidrató primeramente en agua, 10 mg/ml, y luego se adicionó esta dispersión en una relación de 1ml por litro de leche. Se dejó actuar la renina hasta formación del coágulo y se inició el corte de la cuajada con un tamaño de grano de aproximadamente 1 cm de lado con una lira adaptada a la escala del ensayo. Luego se colocaron los quesos en los moldes para prensarlos durante 48h con una presión controlada de 0,0025 Pa. Finalizado el prensado los quesos se almacenaron a 4 °C (Figura 7).

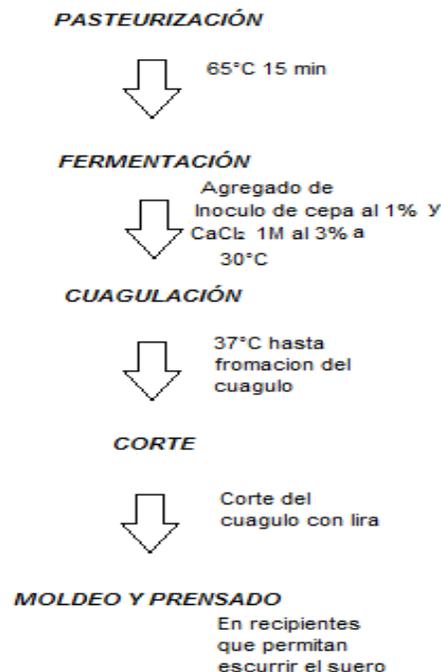


Figura 7: Esquema de elaboración de quesos enzimáticos elaborados con inóculo de cultivos frescos de *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. paracasei* CIDCA 83124.

### 3.10 Evaluación de exudado

Se tomaron muestras de los distintos quesos, recién elaborados y en diferentes momentos durante su almacenamiento a 4°C. Masas conocidas de los mismos se colocaron en tubos eppendorf previamente pesados. Luego se sometió a centrifugación a 10.000 g durante 5 min, se extrajo el líquido expulsado de la matriz del queso y se pesó nuevamente. En base a la diferencia con el peso inicial se calculó la cantidad de líquido no retenido en la matriz.

### 3.11 Evaluación de la composición de los quesos

#### 3.11.1. Determinación de humedad por el método indirecto

El contenido de agua de los quesos se determinó a través de la medida de la pérdida de peso ( $\pm 0.0001g$ ) a partir de muestras secadas en estufa a  $105 \pm 1$  °C hasta peso constante y se calculó el porcentaje de humedad de la muestra

#### 3.11.2. Determinación de cenizas

Para la determinación de las cenizas se procedió a la destrucción de la materia orgánica por vía seca. Se pesaron las muestras dentro de cápsulas de porcelana o crisoles previamente calcinados a 500-550°C y pesados.

Inicialmente se evaporó hasta sequedad sobre tela metálica en mechero a fuego lento. Una vez secas, las muestras contenidas en los crisoles se carbonizaron en mechero hasta ausencia de humos blancos. Luego se calcinó en mufla a 500-550°C hasta la obtención de cenizas blancas.

En algunas muestras, donde se observaron residuos carbonosos, fue necesario disolver las cenizas con agua destilada y llevarlas nuevamente a la mufla previa evaporación. Las muestras se calcinaron hasta peso constante y luego se enfriaron en desecador. Finalmente se pesaron y se calculó el contenido porcentual de cenizas en la muestra.

#### 3.11.3. Determinación del contenido proteico por el método de Kjeldahl

Para la determinación analítica del contenido proteico total, se determinó el contenido de nitrógeno (N) mediante el método de Kjeldahl.

Inicialmente se realizó una digestión de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado para convertir todo el nitrógeno en amonio. Se calculó el contenido de proteínas utilizando un factor (F) correspondiente a proteínas de leche.

Las muestras se sometieron a un tratamiento oxidativo con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en presencia de una mezcla catalizadora. El trióxido de azufre formado durante el tratamiento a altas temperaturas se adiciona al grupo NH del enlace peptídico de la proteína, formándose el correspondiente ácido amidosulfónico. El ácido amidosulfónico es resistente a una posterior oxidación y se transforma en sulfato de amonio por degradación. El sulfato de amonio se determinó a continuación, tras liberación del  $\text{NH}_3$  por tratamiento alcalino, con ayuda de una destilación en corriente de vapor de agua recolectándose en un recipiente con  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Finalmente se efectuó la titulación con una solución valorada de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en presencia del indicador de Mortimer.

Reactivos necesarios:

- Ácido sulfúrico concentrado  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98%
- Mezcla catalizadora ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{K}_2\text{SO}_4$ )
- NaOH 40%
- Ácido bórico  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 %
- Indicador Mortimer (0,016% rojo de metilo; 0,083% verde de bromocresol en etanol)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,05275 N

Para la digestión, se pesaron las cantidades adecuadas de muestra en un balón Kjeldahl por duplicado. Se agregó una cucharadita de mezcla catalizadora (sulfato de sodio/sulfato de cobre 10/1), 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y plato poroso. La mezcla se calentó lentamente el tiempo necesario hasta que presentó aspecto verdoso (digestión completa). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron cuidadosamente entre 170-190 ml de agua destilada.

Posteriormente, para la neutralización, a la solución obtenida se le adicionó NaOH 40 % en cantidad suficiente para alcalinizar fuertemente el medio (en nuestro caso 40 ml). Los balones se colocaron en el destilador (Büchi Destillation Unit k-350) para llevar a cabo la destilación.

Se preparó un erlenmeyer con 35 ml de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  4 % e indicador de Mortimer (color rojo) para recoger el  $\text{NH}_3$  destilado colocándose a la salida del refrigerante del equipo. Al comenzar la destilación el indicador viró a azul y se continuó la destilación hasta un volumen de aproximadamente 200 ml en el erlenmeyer colector (los primeros 150 ml del destilado contienen generalmente la totalidad del  $\text{NH}_3$ ). Luego se enjuagó el extremo del refrigerante con agua destilada, para no perder nitrógeno y se apagó el equipo.

El destilado se valoró con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de concentración conocida hasta viraje del indicador, que vuelve al color rojo original. Se realizaron dos blancos, siguiendo las mismas indicaciones sin adicionar muestra en el balón.

#### 3.11.4. Determinación de hidratos de carbono por el método de antrona

Para la determinación de los azúcares totales presentes en el queso y leche cruda, se utilizó el método colorimétrico de la antrona/ácido sulfúrico. El método se basa en que todos los hidratos de carbono reaccionan en medio ácido fuerte dando un cromógeno (furfural y derivados) que condensan con un cromóforo (antrona) para dar color.

Para la preparación del reactivo se colocaron 42,5 ml de agua destilada en un erlenmeyer de 250 ml. A este volumen de agua se adicionaron cuidadosamente 82,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, empleando un baño de hielo para alojar al erlenmeyer, dado que la reacción es exotérmica. Se agitó fuertemente y se adicionó la antrona previamente pesada, cuando la solución estaba aún caliente para lograr una buena disolución de la misma. El reactivo se pasó a una botella de vidrio color caramelo, se tapó con papel aluminio y se conservó a temperatura de refrigeración. El reactivo se almacenó hasta 2 semanas y no más ya que transcurrido este tiempo, el color se incrementa con lo cual comienzan a existir problemas para la determinación.

Para construir la curva de calibración se partió de una solución patrón de glucosa y se prepararon 5 puntos con concentraciones dentro del rango 0 - 800  $\mu\text{g/ml}$ . Las muestras fueron diluidas apropiadamente para entrar en el rango de medición del método.

Para la determinación se colocaron 0,2 ml de la solución a ensayar en un tubo de vidrio con tapa y se agregaron 2 ml de reactivo de antrona. Se agitó para mezclar el contenido y se tapó el tubo firmemente. Luego se colocaron en un baño de agua a ebullición durante 15 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se dejó en la oscuridad. Transcurridos 20-30 min se midió la absorbancia a 620 nm en espectrofotómetro (Metrolab 330).

Se determinó la concentración de azúcares totales expresados en  $\mu\text{g/ml}$  a partir de la curva de calibración obtenida graficando absorbancia (620nm) en función de la concentración de glucosa. Por regresión lineal se calculó la pendiente, la ordenada al origen de la recta y el coeficiente de correlación.

#### 3.11.5. Determinación del contenido de lípidos

Para la determinación de lípidos se utilizó el método de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (*S.B.R.*). Este método se emplea para determinar lípidos en queso y en leche en polvo. En un vaso de precipitado de 100 ml se colocó una muestra exactamente pesada ( $\pm 0.0001$  g) y se adicionaron 10 ml de HCl (densidad: 1,19 g/ml). Se calentó en baño de agua a ebullición hasta disolución de las proteínas. Luego se dejó enfriar y se transfirió el contenido a una probeta graduada con tapa esmerilada, lavando el vaso de precipitado con 10 ml de alcohol etílico en dos porciones. Finalmente se adicionaron 50-60 ml de éter. Se dejó en

reposo 24 horas y se leyó el volumen de la fase etérea. Luego se tomó una alícuota exactamente medida de 10,00 ml de dicha fase y se evaporó el éter en un vaso de precipitado pequeño previamente tarado. Una vez evaporado el éter se pesó nuevamente y se determinó el contenido de lípidos de la alícuota por diferencia de peso. Teniendo en cuenta el resultado obtenido se calculó la cantidad de lípidos que contenían las muestras.

### 3.12 Evaluación del comportamiento de flujo mediante viscosimetría rotacional

Para la evaluación de los comportamientos de flujo de las leches fermentadas y de los diferentes quesos se utilizó un reómetro Rheostress 600 (Haake, Alemania) en su modo rotacional, empleando un sistema sensor de geometría plato-plato rugoso (Rotor PP35/S). Las medidas se efectuaron a 20 °C utilizando un baño termostático anexo (Termohaake DC50).

Se registró el esfuerzo de corte ( $\tau$ ) en función de las variaciones de gradiente de velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) impuestas. Dicho gradiente se incrementó de 0 a 500 s<sup>-1</sup> en 60 s, se mantuvo luego en 500 s<sup>-1</sup> durante 60 s y finalmente descendió hasta 0 en los siguientes 60 s. Para el análisis de resultados se empleó el programa RheoWin Data Manager y a partir de las gráficas correspondientes al comportamiento de flujo se determinó la viscosidad aparente ( $\eta_{app}$ ) al gradiente de velocidad de 300 s<sup>-1</sup> y el área de histéresis, encerrada entre las curvas de esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad ascendente y descendente.

### 3.13 Reometría oscilatoria de baja amplitud de deformación

El carácter viscoelástico de las muestras fue analizado mediante reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación utilizando el mismo reómetro Rheostress 600 (Haake, Alemania) indicado anteriormente, pero en modo oscilatorio.

Se empleó nuevamente el sensor de geometría plato-plato paralelo con superficie rugosa y separación de 1 mm entre platos. La temperatura se mantuvo a 20 °C utilizando un baño termostático anexo (Termohaake DC50).

Cada muestra fue cuidadosamente removida de los recipientes y colocada sobre la superficie del sensor del reómetro.

En un primer ensayo, se determinó el rango de viscoelasticidad lineal realizando un barrido de esfuerzo de 0,5 a 200 Pa a una frecuencia fija de 1 Hz.

A partir de la evaluación del rango de viscoelasticidad lineal se seleccionó un esfuerzo de 10 Pa en todas las muestras para realizar los espectros mecánicos. Se determinaron el módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ) y la tangente del ángulo de desfase ( $\tan\delta$ ) como funciones de la frecuencia (0,05-100 Hz) y se escogieron los valores de esos parámetros a la frecuencia de 1 Hz para efectuar las comparaciones correspondientes.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Fermentación/coagulación de las leches

En una primera etapa, se evaluó la fermentación de leche empleando dos cepas de *Lacticaseibacillus paracasei*. Las leches inoculadas con los microorganismos *L. paracasei* CIDCA 8339, *L. paracasei* CIDCA 83124 fueron analizadas en cuanto a la cinética de acidificación y el número de microorganismos viables y la producción de ácidos orgánicos una vez concluida la fermentación. Asimismo, las leches fermentadas obtenidas fueron evaluadas mediante viscosimetría rotacional.

#### 4.1.1 Cinéticas de acidificación de leches

Se analizó el descenso del pH de las leches en función del tiempo de incubación a 30 °C. Los resultados se presentan en la Figura 8.

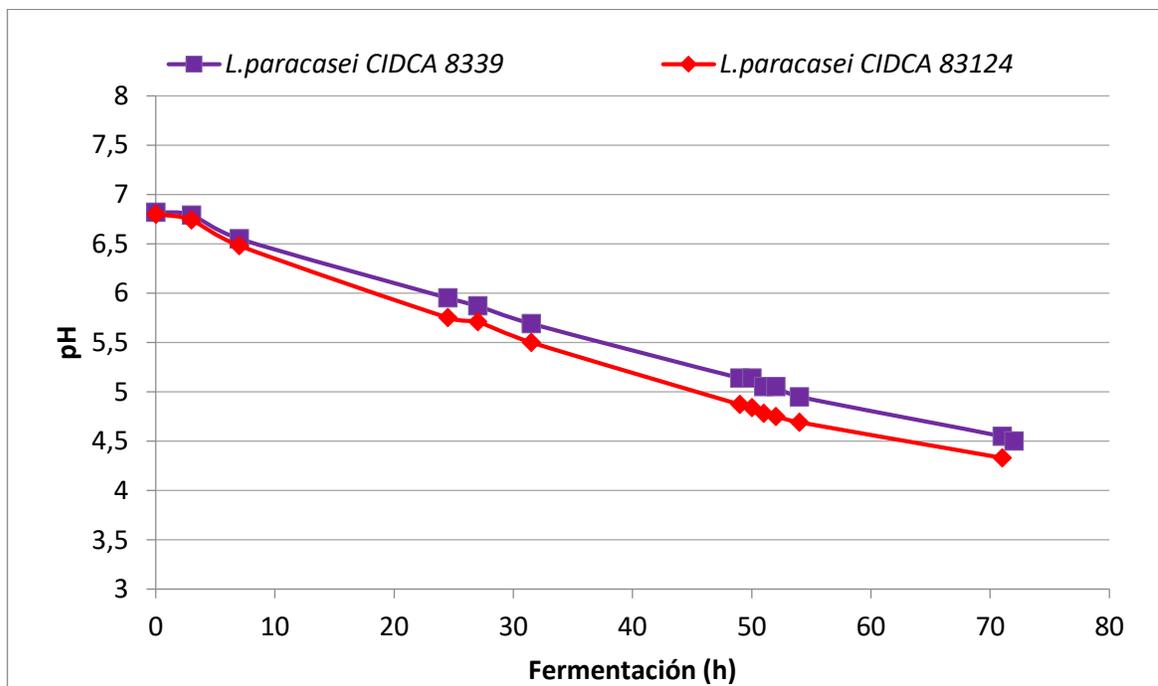


Figura 8: Descenso de pH de las leches inoculadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 o *L. paracasei* CIDCA 83124 en función del tiempo de incubación a 30 °C.

Se observó que en las condiciones del ensayo, ambas cepas lograron el descenso del pH de las leches hasta alcanzar el punto isoeléctrico de las caseínas con la concomitante formación del gel ácido en un tiempo de alrededor de 72 horas.

#### 4.1.2 Evolución del número de microorganismos viables en leches fermentadas

Se evaluó el número de microorganismos viables en la leche al inicio y al final de la fermentación. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentración de microorganismos viables en la leche descremada UAT inoculada con las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124 al inicio y luego de 72 h de fermentación a 30 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Microorganismo	Concentración de microorganismos viables (UFC/ml)	
	Inicio de la fermentación	72 horas de fermentación
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	$1,35 \times 10^8 \pm 5,66 \times 10^{6a}$	$1,73 \times 10^9 \pm 9,90 \times 10^{7b}$
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	$1,25 \times 10^8 \pm 2,12 \times 10^{7a}$	$1 \times 10^{10} \pm 2,83 \times 10^{9c}$

Durante las 72 horas en las cuales se desarrolló la fermentación se observó un incremento del número de microorganismos viables en la leche fermentada con ambas cepas superior a un orden logarítmico. El número de microorganismos hallado en la leche luego de 72 horas resultó mayor cuando la misma se fermentó con *L. paracasei* CIDCA 83124 que cuando se empleó *L. paracasei* CIDCA 8339.

#### 4.1.3 Producción de ácidos orgánicos en leches fermentadas

Una vez concluido el período de 72 horas de fermentación se analizó la producción de ácidos orgánicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se incluyó la evaluación de leche no inoculada como control (Tabla 2).

Tabla 2: Concentración de ácido láctico de las leches fermentadas durante 72h con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124 y de la leche control sin fermentar.

	Ácido láctico (mM)
Leche fermentada con <i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	99,1
Leche fermentada con <i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	95,4
Leche control sin fermentar	2,3

La concentración de ácido láctico luego de las 72 horas de fermentación fue semejante en ambas leches fermentadas y, como se esperaba, despreciable en la leche control sin fermentar.

#### 4.1.4 Evaluación reológica de las leches fermentadas

Las leches fermentadas fueron evaluadas mediante viscosimetría rotacional. En la Figura 9 se presentan las curvas de flujo, esfuerzo de corte en función de gradiente de velocidad, correspondientes a la fermentación con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124. En la misma figura se incluyó la curva correspondiente a la leche sin inocular.

Ambas leches fermentadas mostraron comportamiento de flujo no newtoniano, de tipo pseudoplástico con la presencia de área de histéresis. En todo el rango de gradientes de velocidad del ensayo se observó un mayor esfuerzo de corte para la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124. La leche control, como se esperaba, presentó comportamiento de flujo de tipo newtoniano.

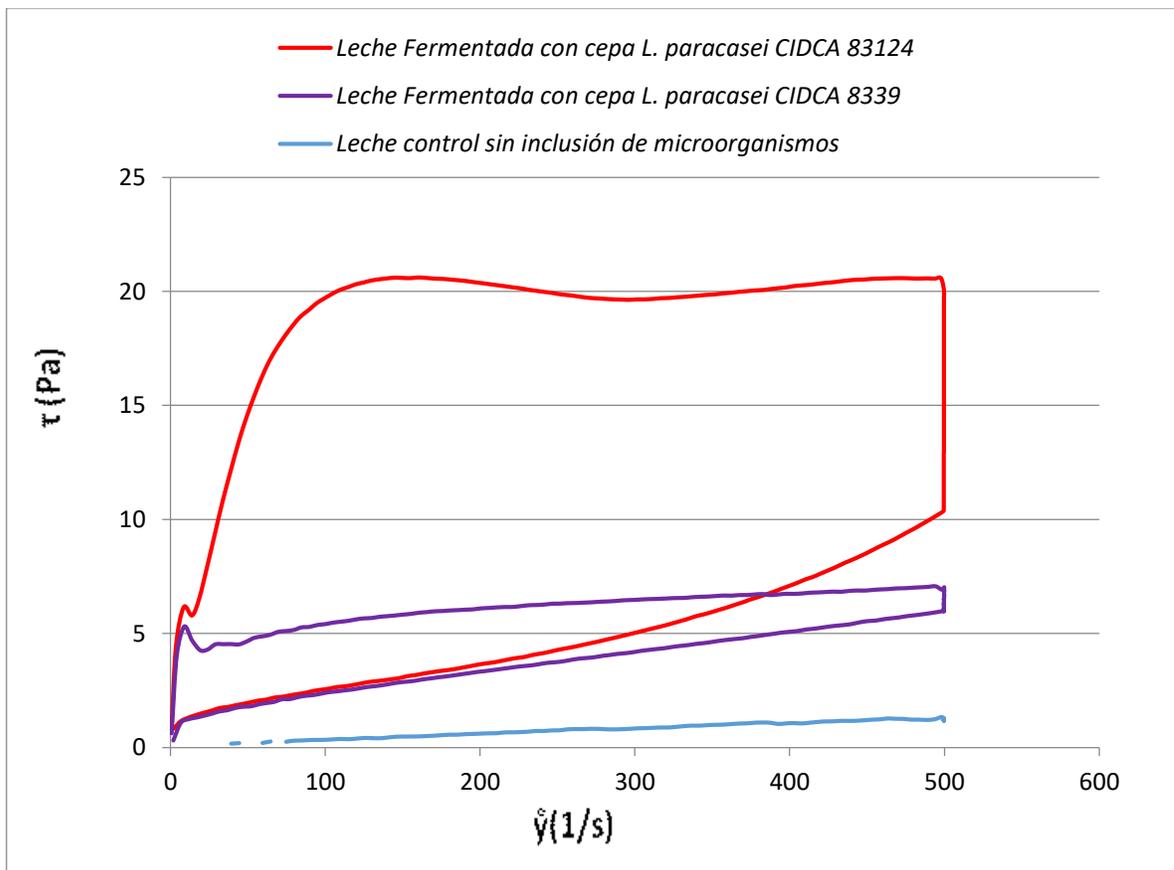


Figura 9: Curvas de flujo (esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad) correspondiente a leche control sin inocular y leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124.

A partir de las curvas de flujo se obtuvo el valor del área de histéresis (tixotropía) y la viscosidad aparente a 300 s<sup>-1</sup>. Los resultados se presentan en las figuras 10 y 11.

La leche sin fermentar presentó una viscosidad de 2 mPa.s y dado su comportamiento de tipo newtoniano no se halló área de histéresis. Las leches fermentadas con ambas cepas de *L. paracasei* difirieron significativamente en sus curvas de flujo y en los parámetros obtenidos a partir de ellas. El valor de viscosidad aparente a 300 s<sup>-1</sup> resultó de 21,7 mPa.s para la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y casi cinco veces mayor (59,4 mPa.s) para la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124.

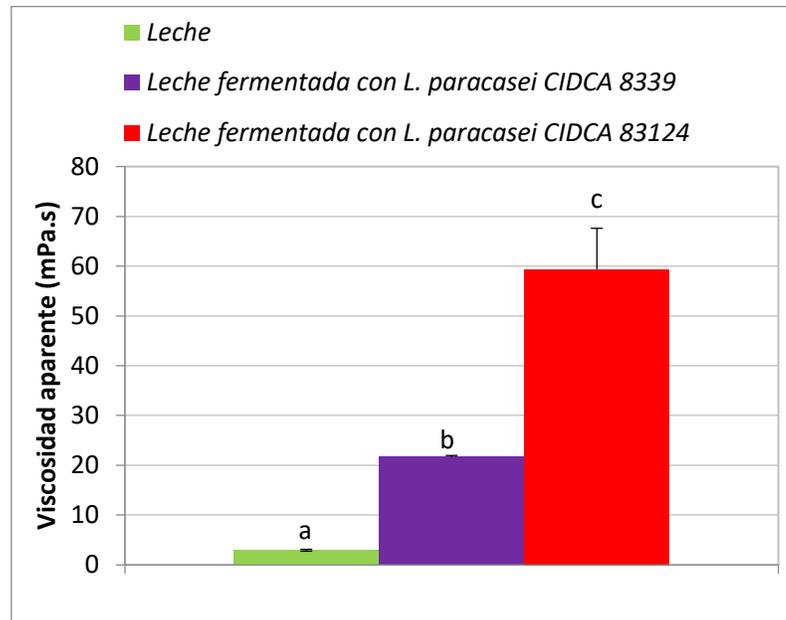


Figura 10: Valores de viscosidad de leche sin fermentar y viscosidad aparente a 300 s<sup>-1</sup> correspondiente a leches fermentadas a 30°C con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

La tixotropía calculada a partir de las curvas de flujo resultó de 1223 Pa/s para la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y significativamente mayor, 6315 Pa/s, para la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124 (Figura 11).

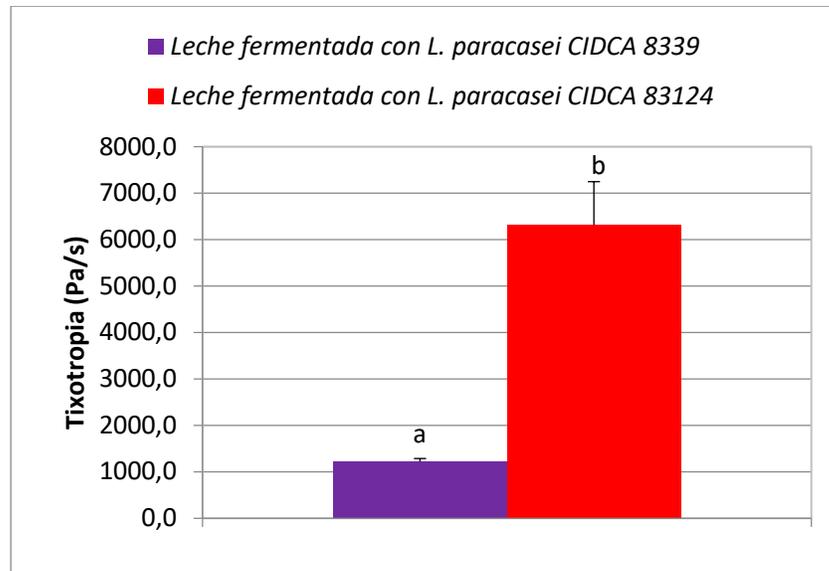


Figura 11: Valores de área de histéresis (tixotropía) correspondiente a las leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

*L. paracasei* CIDCA 83124 es capaz de producir una fracción de polisacárido de mayor peso molecular que el producido por *L. paracasei* CIDCA 8339 (Bengoa *et al.*, 2018). Las cepas que son capaces de producir polisacárido de alto peso molecular son las que le confieren a las leches fermentadas mayor viscosidad aparente (Hamet *et al.*, 2012), lo que explicaría la gran diferencia en los parámetros obtenidos a partir de las curvas de flujo de las leches fermentadas por estos microorganismos

## 4.2 Quesos ácidos

A partir de las leches fermentadas con los microorganismos y mediante desuerado de las mismas, se elaboraron los quesos ácidos. Dichos quesos presentaron aspecto homogéneo y apariencia semejante a la de quesos de untar comerciales.

### 4.2.1 Rendimiento de obtención de quesos ácidos

Se evaluaron los rendimientos de obtención de los quesos ácidos elaborados. Para los cálculos se consideró la masa de queso obtenido respecto a la masa de leche empleada. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3: Rendimientos en la obtención de quesos ácidos en función de la cepa de *L. paracasei* empleada en la fermentación de la leche. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Microorganismo empleado en la fermentación de la leche	Rendimiento % (g de queso obtenidos cada 100g de leche fermentada)
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	29,1 ± 2,0 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	27,9 ± 0,3 <sup>a</sup>

No se hallaron diferencias en los valores de rendimiento de los quesos obtenidos a partir de las leches fermentadas con las cepas *L. paracasei* utilizadas.

#### 4.2.2 Composición de los quesos ácidos

Se evaluó la composición porcentual de los quesos ácidos elaborados utilizando las metodologías descritas en materiales y métodos. Los resultados se presentan en la Tabla 4. Asimismo, en la tabla antes mencionada se incluyó la composición de un queso crema comercial.

Tabla 4: Composición porcentual de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, agua, cenizas y sólidos totales de los quesos ácidos elaborados a partir de leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. paracasei* CIDCA 83124 y de un queso crema comercial. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Microorganismo empleado en la fermentación de la leche	Composición del queso ácido obtenido					
	Proteínas (%)	Hidratos de carbono (%)	Lípidos (%)	Agua (%)	Cenizas (%)	Sólidos totales (%)
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	10,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,4	80,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,13 <sup>a</sup>	19,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	9,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,5	80,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,10 <sup>a</sup>	19,6 ± 0,5 <sup>a</sup>
Queso crema comercial	4,5	8,0	22,0	65,0	0,5	35,0

La fermentación de la leche con ambas cepas de *L. paracasei* permitió la obtención de quesos de composición semejante. Se observó que los contenidos de proteínas y lípidos están concentrados entre dos y tres veces respecto a la leche original, mientras que los hidratos de carbono se encuentran en menor proporción como consecuencia de la pérdida durante el desuerado y su utilización durante la fermentación por parte de los microorganismos inoculados. En relación a un queso crema comercial los quesos ácidos desarrollados en este trabajo presentan valores menores en el contenido de materia grasa. La materia grasa proporciona una percepción de cremosidad que puede ser sustituida en parte por la presencia de polisacáridos de alto peso molecular producidos *in situ* por los

microorganismos que fermentan la leche (Lucey, 2017). Probablemente, el aspecto homogéneo observado en los quesos producidos se debe a los polisacáridos presentes en las leches fermentadas que los originan. Por otra parte, los quesos desarrollados en el presente trabajo, con apariencia y textura semejante a los comerciales, contienen alrededor de la mitad de los hidratos de carbono y el doble de proteínas, lo que representa una ventaja dada la calidad nutricional de las proteínas lácteas.

#### 4.2.3 Exudado en función del tiempo de almacenamiento

La capacidad de retención de líquido de los quesos se evaluó indirectamente mediante la valoración de la cantidad de líquido exudado por la matriz al someter muestras de los quesos a centrifugación. El ensayo se realizó, una vez completada la etapa de desuerado, con los quesos recientemente obtenidos y luego de 30 días de almacenamiento a 4 °C. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Líquido exudado a partir de los quesos ácidos recientemente elaborados o luego de 30 días de almacenamiento a 4 °C. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Microorganismo empleado en la elaboración del queso ácido	Tiempo de almacenamiento (días)	Exudado (g de líquido por gramo de queso)
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	0	0,23 ± 0,03 <sup>a</sup>
	30	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	0	0,25 ± 0,04 <sup>a</sup>
	30	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>

Cuando se compararon los resultados obtenidos, se observó, que los parámetros de exudado no presentaron diferencias significativas en función del microorganismo empleado para la elaboración de los quesos, así como tampoco respecto al tiempo de almacenamiento de 30 días en refrigeración, en relación al producto recientemente elaborado. La presencia de polisacáridos y el elevado contenido proteico de los quesos podrían ser factores que ayuden a mejorar la retención de líquido. Las bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos se han utilizado con éxito para fabricar quesos, especialmente las variedades de bajo contenido en grasa, porque contribuyen a su textura. En el queso cheddar, las cepas productoras de exopolisacáridos aumentan la retención de humedad del queso y, en consecuencia, el rendimiento (Dabour et al., 2005). Se describieron resultados similares para los quesos tipo mozzarella donde el uso de cultivos iniciadores productores de exopolisacáridos mejora la textura y reduce el tiempo de maduración (Zisu & Shah, 2005).

#### 4.2.4 Concentración de microorganismos viables en los quesos

Se analizó la concentración de microorganismos viables en los quesos empleando la técnica de recuento en placa. La evaluación de dicho parámetro se realizó al finalizar el desuerado, en los quesos recientemente elaborados, y se repitió luego de 15 y 30 días de almacenamiento refrigerado a 4° C. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Concentración de microorganismos viables en quesos ácidos recientemente elaborados y luego de 15 o 30 días de almacenamiento a 4°C. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Microorganismo empleado en la elaboración del queso ácido	Tiempo de almacenamiento (días)	Concentración de microorganismos viables (UFC/g)
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	0	$4,0 \cdot 10^9 \pm 2,8 \cdot 10^{9a,b}$
	15	$9,6 \cdot 10^9 \pm 2,1 \cdot 10^{8b,c}$
	30	$4 \cdot 10^9 \pm 2,8 \cdot 10^{9a,b}$
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	0	$1,4 \cdot 10^{10} \pm 4,2 \cdot 10^9 c$
	15	$8,5 \cdot 10^9 \pm 7,1 \cdot 10^{7b,c}$
	30	$1,2 \cdot 10^9 \pm 7,1 \cdot 10^{7a}$

Los quesos ácidos recientemente elaborados con *L. paracasei* CIDCA 8339 o *L. paracasei* CIDCA 83124 presentaron concentraciones de microorganismos viables de  $4,0 \cdot 10^9 \pm 2,8 \cdot 10^9$  UFC/g y  $1,4 \cdot 10^{10} \pm 4,2 \cdot 10^9$  UFC/g, respectivamente. El mayor valor de recuento inicial en el queso recientemente elaborado con *L. paracasei* CIDCA 83124 con respecto al que obtenido con la cepa *L. paracasei* CIDCA 8339 está en concordancia con las concentraciones de microorganismos viables halladas en las correspondientes leches fermentadas.

Cuando se analizó la concentración de microorganismos durante el almacenamiento refrigerado se observó que el queso ácido obtenido a partir de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 presentó valores relativamente estables en función del tiempo. Mientras que la concentración de microorganismos viables luego de 30 días de almacenamiento en los quesos obtenidos mediante fermentación con *L. paracasei* CIDCA 83124 presentó una disminución de la concentración de microorganismos viables en función del tiempo de almacenamiento.

El Artículo 1389 del Código Alimentario argentino, capítulo XVII, se expresa respecto a la concentración de microorganismos viables del alimento indicando: “con la denominación de Alimento con Probióticos, se entiende aquel alimento con una carga de células viables que deberá ser mayor a  $10^7$  UFC/g durante su período de duración mínima”. De acuerdo a ello, podemos establecer que los valores hallados en los quesos ácidos del presente trabajo se ajustan perfectamente a la mencionada resolución.

#### 4.2.5 Características reológicas

Para los consumidores, la textura del queso es determinante de la calidad y condiciona la preferencia de los mismos. Asimismo, cada vez más se conocen las relaciones existentes entre los resultados de pruebas instrumentales y características sensoriales (Joyner, 2018). Por otra parte, los cambios físicos y químicos ocurridos durante la maduración y conservación de este tipo de productos suelen afectar su textura. Por tales motivos, resulta importante contar con herramientas que ayuden a comprender y controlar las características de textura y las modificaciones que surgen en las mismas. La evaluación reológica a partir de diversas metodologías resulta fundamental para analizar la estructura de los quesos y en muchos casos se convierte en un indicador vinculado a la percepción de los mismos.

La textura de los quesos elaborados en este trabajo se analizó utilizando viscosimetría rotacional, así como ensayos de reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación. Las muestras se conservaron refrigeradas a 4°C y la evaluación se llevó a cabo en función del tiempo de almacenamiento.

##### *Evaluación mediante viscosimetría rotacional*

En la Figura 12 se presentan las curvas de flujo, esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad, correspondientes a los quesos ácidos recientemente elaborados a partir de leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 o *L. paracasei* CIDCA 83124. En dicha figura se puede observar que las curvas correspondientes al gradiente de velocidad ascendente presentan un pico inicial denominado *overshoot*. Este pico es indicador de un comportamiento viscoelástico debido a las interacciones presentes en la matriz (Rao, 1999) que pueden ser evaluadas mediante ensayos de reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación. Las curvas de flujo presentan área de histéresis e indican un comportamiento de tipo pseudoplástico que se vuelve evidente en la curva correspondiente a la etapa de descenso de gradiente de velocidad.

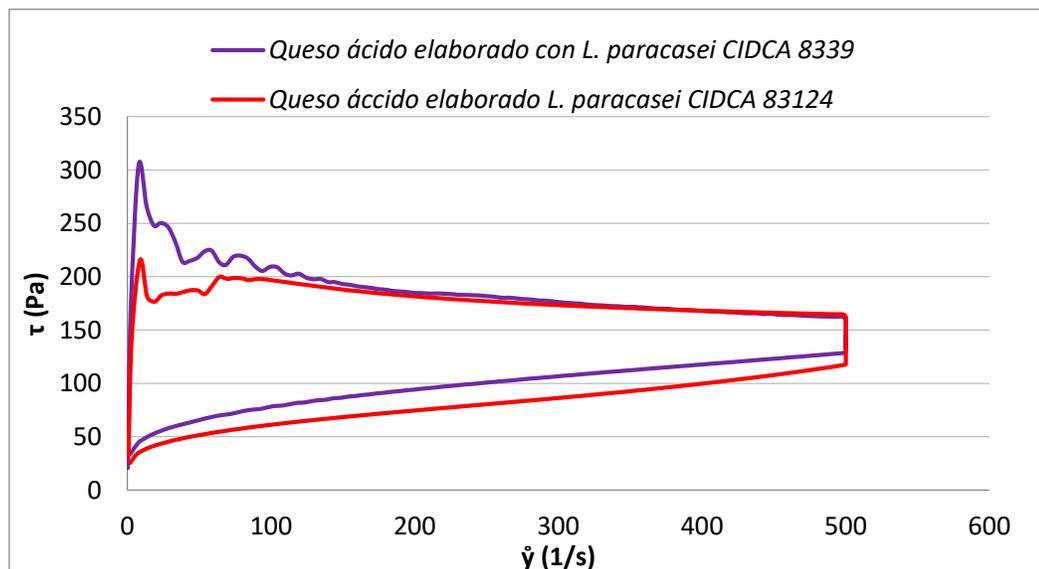


Figura 12: Curvas de flujo, esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad, correspondientes a quesos ácidos elaborados empleando *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124.

A partir de las curvas de flujo se obtuvieron los valores de tixotropía y los valores de viscosidad aparente a  $300\text{ s}^{-1}$  (Figura 13).

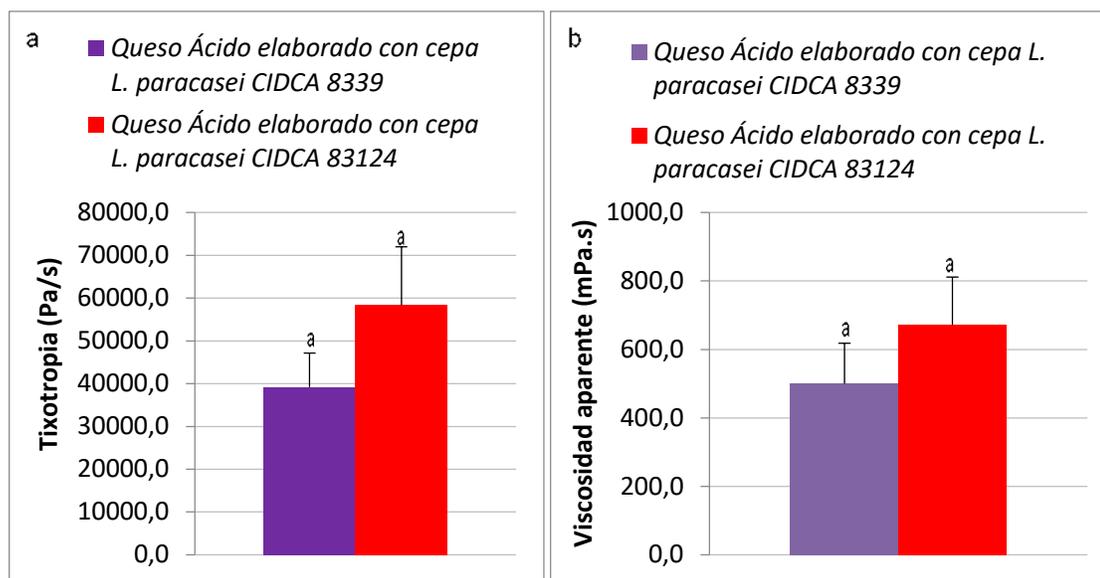


Figura 13: Viscosidad aparente a  $300\text{ s}^{-1}$  (a) y tixotropía (b) de quesos ácidos recientemente elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y *L. paracasei* CIDCA 83124. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Los valores de viscosidad aparente a  $300\text{ s}^{-1}$  de los quesos ácidos recientemente elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124 ( $500,5 \pm 118,1\text{ mPa.s}$  y  $672,5 \pm 139,3\text{ mPa.s}$  respectivamente) no presentaron diferencias significativas. Los valores de tixotropía de dichos quesos ( $39205 \pm 7912,5\text{ Pa/s}$  y  $58415 \pm 13555,2\text{ Pa/s}$ ), tampoco resultaron significativamente diferentes. Los valores de estos parámetros fueron semejantes a los descritos por otros autores para matrices similares y hablan de una textura adecuada y un número importante de interacciones entre las moléculas que forman la microestructura de estos alimentos. (Coutouly *et al.*, 2014; Sanchez *et al.*, 1996).

Asimismo, los valores de viscosidad aparente a  $300\text{ s}^{-1}$  y de tixotropía correspondientes a los quesos ácidos fueron analizados en función del tiempo de almacenamiento a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los parámetros correspondientes a los quesos elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 se presentan en las Figura 14 a y b. Ni la viscosidad aparente a  $300\text{ s}^{-1}$ , ni los valores de tixotropía de este queso variaron durante el período de almacenamiento estudiado.

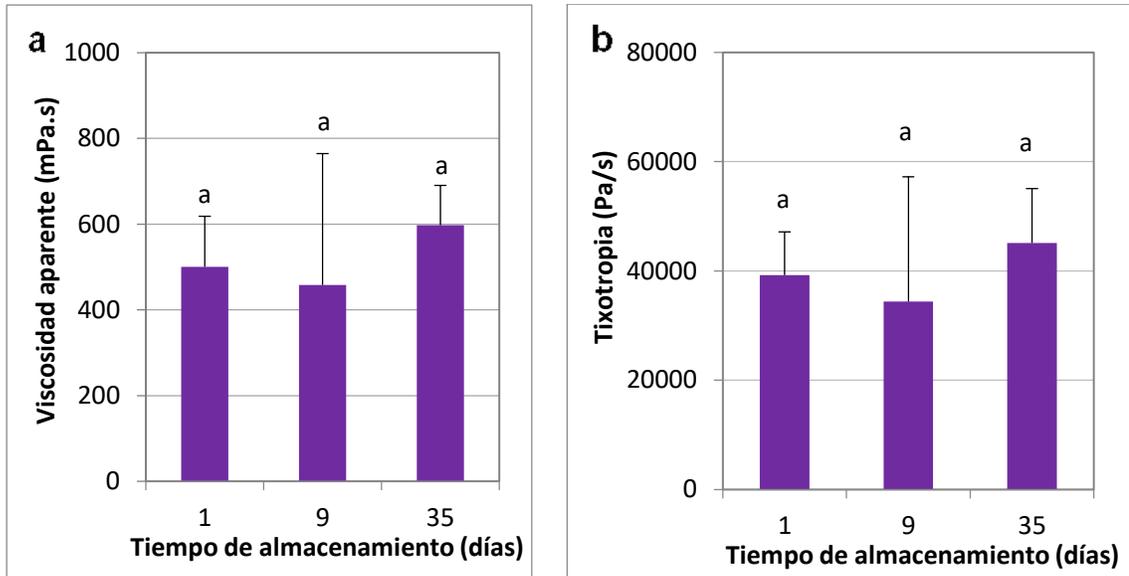


Figura 14: Viscosidad aparente a 300 s<sup>-1</sup> (a) y tixotropía (b) de quesos ácidos elaborado a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 en función del tiempo de almacenamiento a 4°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

A partir del análisis de los valores de viscosidad aparente a 300s<sup>-1</sup> y tixotropía en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C correspondientes a los quesos elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124 se llegó a resultados semejantes a los descritos anteriormente, ya que no se observaron variaciones en los parámetros mencionados en el período evaluado (Figura 15).

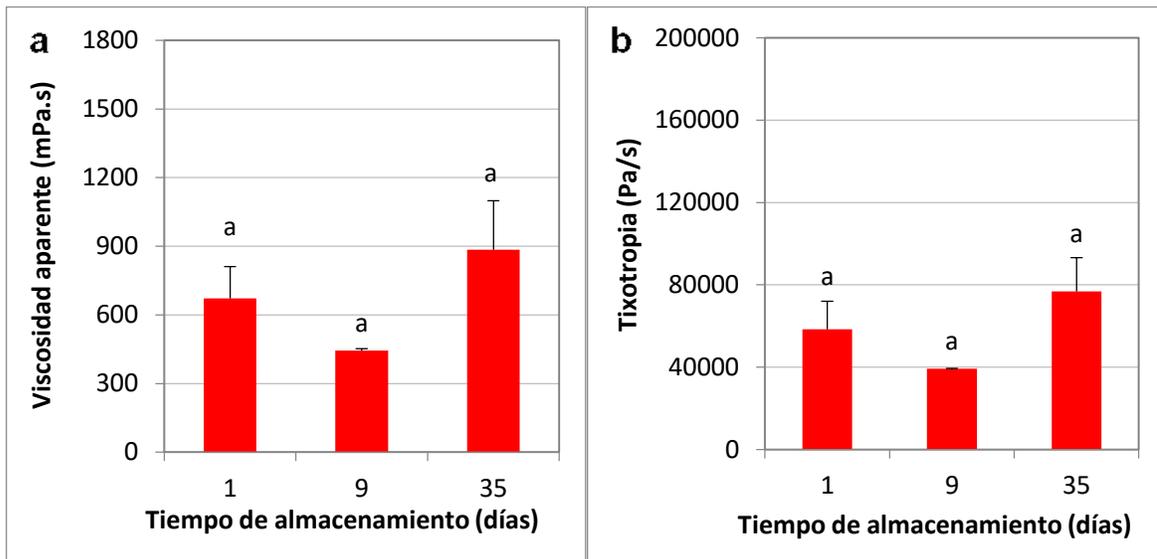


Figura 15: Valores de viscosidad aparente a 300 s<sup>-1</sup> (a) y tixotropía (b) correspondientes a quesos ácidos elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124 en función del tiempo de almacenamiento a 4°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación

Para caracterizar los quesos ácidos se utilizó reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación. En una primera etapa, a la frecuencia constante de 1 Hz, se analizaron los módulos elástico y viscoso en respuesta a un esfuerzo creciente con la finalidad de determinar el rango de viscoelasticidad lineal de las diferentes muestras.

Se encontró que los módulos se mantenían constantes hasta esfuerzos cercanos a 30 Pa, independientemente de la cepa de *L. paracasei* empleada para la fermentación de la leche con la que se elaboraron los quesos. En la Figura 16, y a modo de ejemplo, se presenta el barrido de esfuerzo correspondiente al queso elaborado a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124.

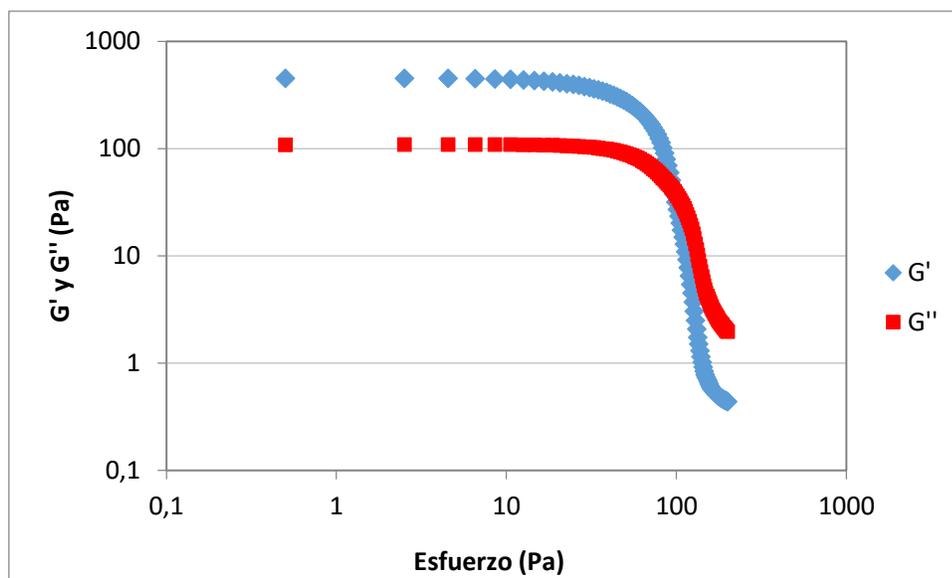


Figura 16: Módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en función del esfuerzo aplicado correspondientes a queso ácido elaborado a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124. Evaluación realizada a la frecuencia de 1 Hz.

En base a los resultados se decidió emplear un esfuerzo de 10 Pa para obtener los espectros mecánicos de las muestras de quesos ácidos. Para ello se registraron los valores de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en función de la variación de la frecuencia de oscilación. Se evaluaron quesos recientemente elaborados y luego de almacenarlos durante 35 días a 4°C (Figura 17).

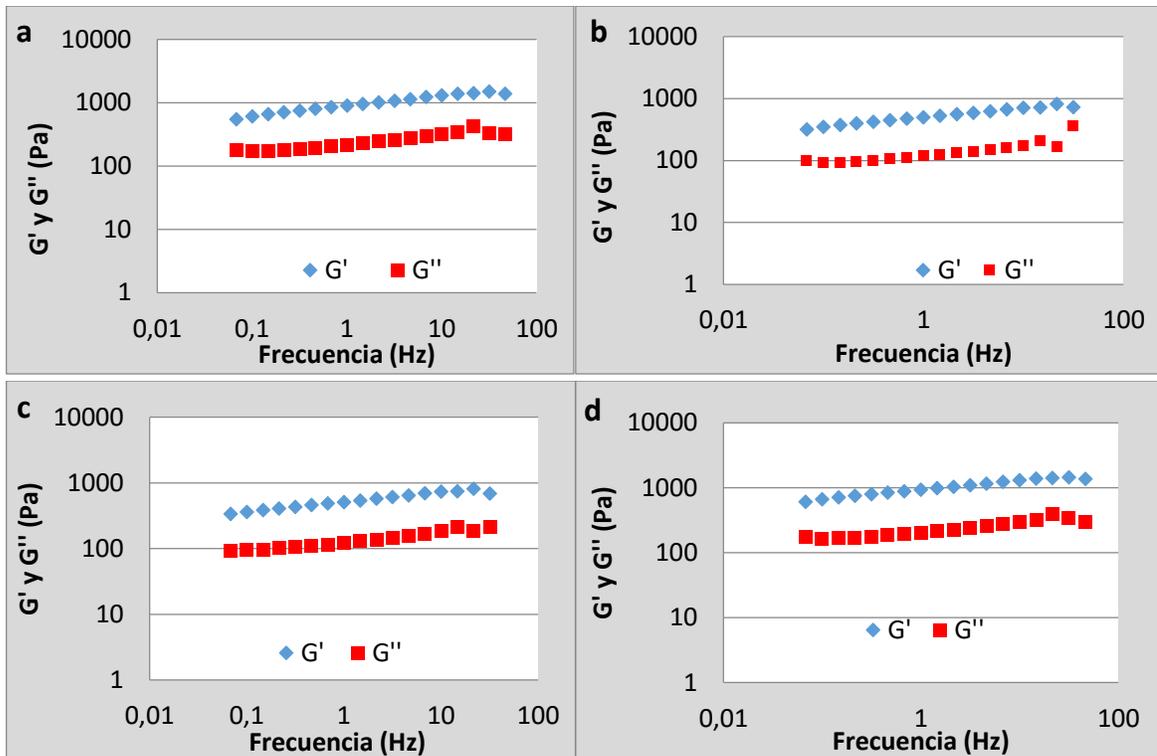


Figura 17: Espectros mecánicos correspondientes a quesos ácidos obtenidos a partir de leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 (a y b) o *L. paracasei* CIDCA 83124 (c y d) recientemente obtenidos (a y c) o luego de 35 días de almacenamiento a 4°C (b y d).

Los espectros mecánicos resultaron característicos de geles, mostrando valores de módulo elástico superiores a los correspondientes al módulo viscoso en todo el rango de frecuencia estudiado. A su vez, cada uno de dichos módulos presentó una leve dependencia con la frecuencia.

A partir de los espectros mecánicos se determinaron los valores de módulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y tangente del ángulo de desfase ( $\text{tg}\delta$ ) a la frecuencia de 1Hz.

En la Figura 18 se presentan los valores de  $G'$  y  $G''$  correspondientes a los quesos recientemente elaborados a partir de leches fermentadas con ambas cepas de *L. paracasei*. Estos módulos son dependientes del número, la fuerza y la distribución de los enlaces entre las proteínas, que pueden estar condicionados por la presencia de otras moléculas presentes tales como los polisacáridos (Lucey, 2017). En la Figura 18, se puede observar que los valores de módulos elásticos ( $743,9 \pm 220,19\text{Pa}$  y  $611,9 \pm 138,59\text{Pa}$ ) resultaron significativamente mayores a los de los módulos viscosos ( $178,8 \pm 52,11\text{Pa}$  y  $144,8 \pm 32,31\text{Pa}$ ) y no se observaron diferencias significativas en función de la cepa empleada para fermentar la leche a partir de la cual se elaboraron los quesos.

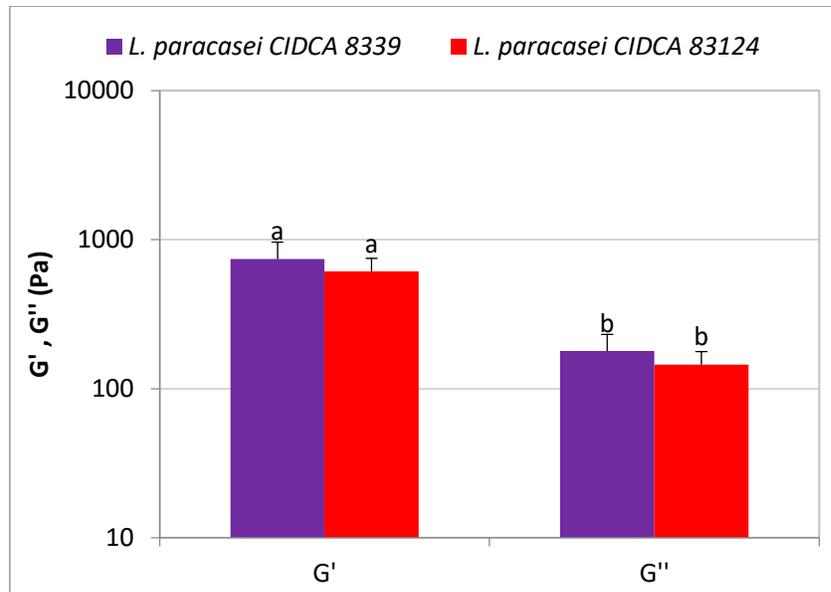


Figura 18: Módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) a la frecuencia de 1Hz correspondientes a quesos ácidos recién elaborados a partir de leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

La  $tg\delta$  es un parámetro capaz de indicar la viscoelasticidad de un material. En la Figura 19 se presentan los valores de dicho parámetro a la frecuencia de 1Hz correspondiente a los quesos ácidos recién elaborados a partir de leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124. Si bien el valor correspondiente al queso obtenido con la cepa CIDCA 8339 (0,2405) resultó significativamente mayor al correspondiente al queso obtenido a partir de la leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124 (0,2365), ambos valores no difieren demasiado numéricamente e indican un comportamiento de gel verdadero de acuerdo a Picout & Ross-Murphy (2001).

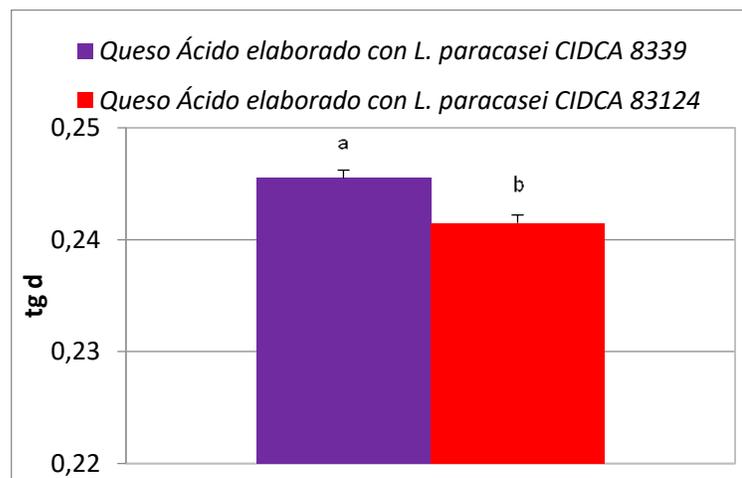


Figura 19: Valores de  $tg\delta$  a 1Hz para quesos ácidos recién elaborados a partir de leches fermentadas con *L. paracasei* CIDCA 8339 y CIDCA 83124. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Para evaluar cambios de viscoelasticidad durante el almacenamiento de los quesos se analizaron los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) y la tangente del ángulo desfasaje ( $\text{tg}\delta$ ) correspondientes a los quesos ácidos en función del tiempo a 4 °C (Figura 20).

Las características viscoelásticas durante el almacenamiento, podrían modificarse debido a la actividad proteolítica de los microorganismos presentes, así como también por los cambios en la concentración de sólidos totales debido a sinéresis. Sin embargo los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) de los quesos elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 no se modificaron con el tiempo de almacenamiento (Figura 20 a y b), al menos hasta 35 días. Tampoco se modificó la tangente del ángulo de desfasaje ( $\text{tg}\delta$ ) (Figura 20c). Aunque se sabe que la proteólisis de las matrices continúa levemente en la refrigeración, el efecto podría ser compensado por la deshidratación de los productos y consecuente concentración de componentes.

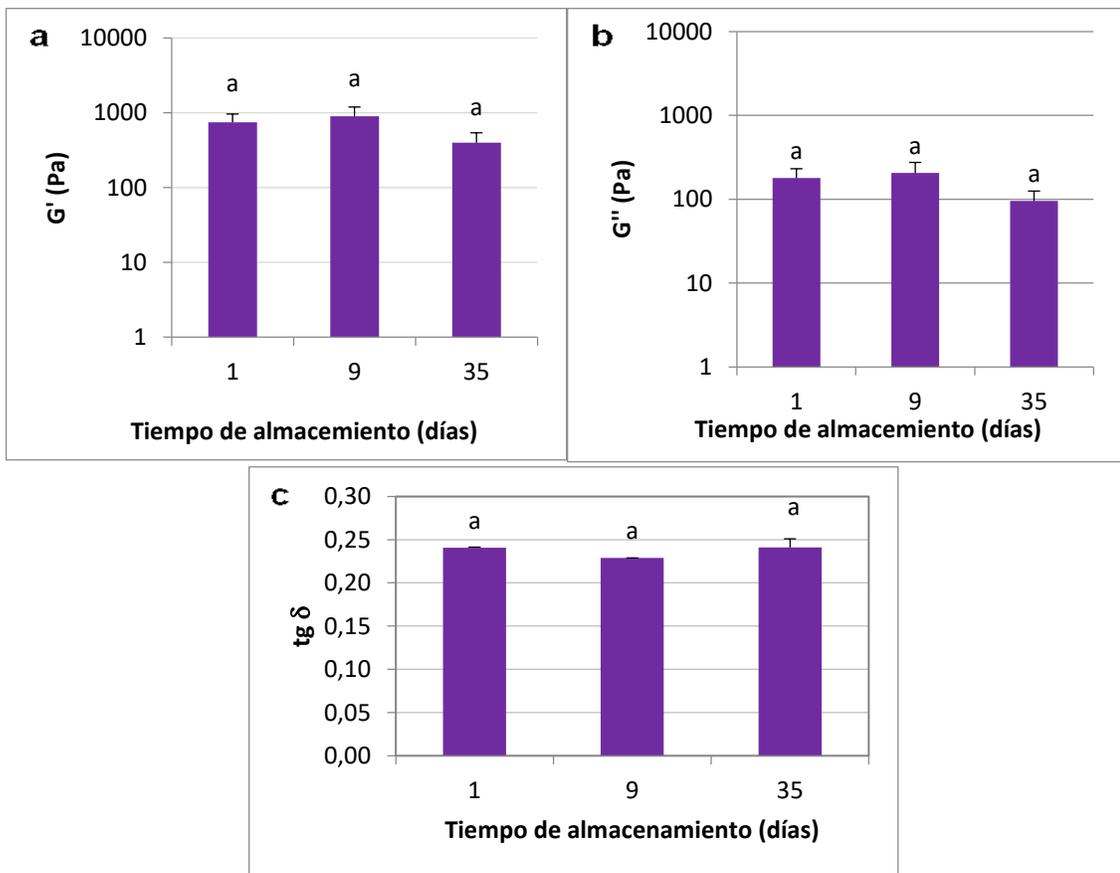


Figura 20: Valores de módulo elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) (a y b) y tangente del ángulo de desfasaje ( $\text{tg}\delta$ ) (c) a frecuencia de 1Hz correspondientes a quesos ácidos elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 8339 en función del tiempo de almacenamiento a 4°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

De modo equivalente a los quesos ácidos descritos anteriormente, ni el módulo elástico ( $G'$ ) ni el módulo viscoso ( $G''$ ) de quesos elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124 no sufrieron cambios significativamente diferentes durante el almacenamiento a 4°C (Figura 21 a y b). En estos quesos, sin embargo, se observó un descenso en la tangente del ángulo de desfase ( $\text{tg}\delta$ ) (Figura 21 c). Este diferente comportamiento podría estar asociado a las características del exopolisacarido producido por esta cepa, evidenciado en el comportamiento de flujo de la leche fermentada.

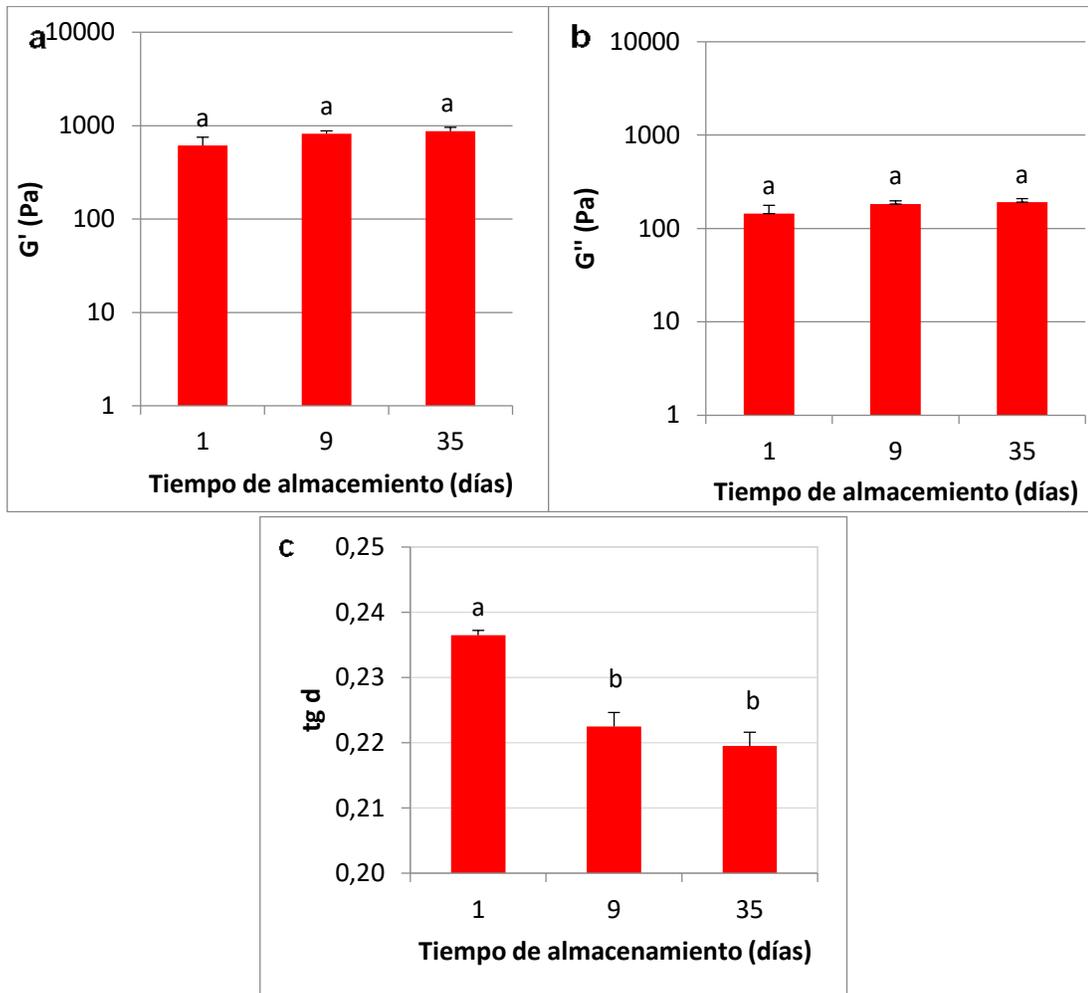


Figura 21: Valores de módulo elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) (a y b) y tangente del ángulo de desfase ( $\text{tg}\delta$ ) (c) a frecuencia de 1Hz correspondientes a quesos ácidos elaborados a partir de leche fermentada con *L. paracasei* CIDCA 83124 en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

En función de los resultados obtenidos se puede concluir que los quesos elaborados con ambas cepas presentan características interesantes en relación a su comportamiento reológico y dichas características se preservaron durante el periodo de almacenamiento estudiado.

### 4.3 Quesos obtenidos por desestabilización ácida y enzimática

Se elaboraron quesos utilizando tanto la inoculación con microorganismos como el empleo de la enzima renina y un desuerado posterior de los mismos. A estos quesos, en el presente trabajo, se los denominó quesos enzimáticos para diferenciarlos de los anteriores en los cuales sólo se empleó la desestabilización ácida mediante fermentación para su elaboración.

Como se describió anteriormente, en la sección de materiales y métodos, para la elaboración de estos quesos enzimáticos se trabajó con leche cruda del tambo de la U.N.L.P previamente pasteurizada. En tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 75-80 °C se producen importantes cambios fisicoquímicos sobre los constituyentes de la leche que afectan la formación del coágulo, entre ellos la desnaturalización y agregación de las proteínas del suero, que interaccionan con las micelas de caseína impidiendo la correcta acción de la renina y la pérdida de calcio soluble en forma de fosfato de calcio precipitando sobre dichas micelas. Ambos efectos pueden generar mayores tiempos de coagulación, defectos en la formación del coágulo y pérdida de rendimiento.

La elaboración de estos quesos enzimáticos se llevó a cabo inoculando la leche con *L. paracasei* CIDCA 8339 o *L. paracasei* CIDCA 83124, adicionando posteriormente la renina, cortando el coágulo formado y finalmente desuerando mediante presión. También se incluyó la elaboración de un queso control sin la inoculación de microorganismos. Se analizó el rendimiento, las características fisicoquímicas de los quesos y la viabilidad de los microorganismos incluidos en los mismos.

#### 4.3.1 Caracterización de la enzima

Inicialmente se evaluó la actividad de la enzima renina en la leche. Se analizó el tiempo necesario para la coagulación de la leche en función de la concentración de renina utilizada.

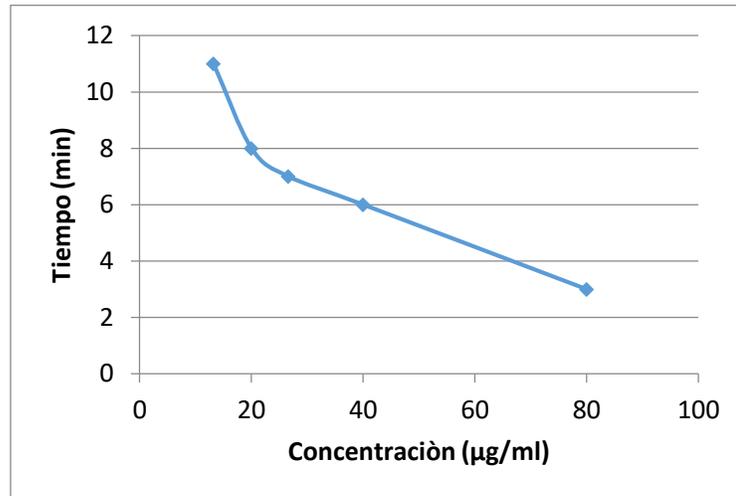


Figura 22: Tiempo necesario para observar la coagulación de leche en función de la concentración de enzima renina empleada.

Se observó, como se esperaba, una disminución del tiempo requerido para la coagulación con el incremento de concentración de enzima empleada (Figura 22).

En base a estos resultados se decidió trabajar con una concentración de enzima que luego de actuar 30 minutos pueda formar un coagulo con la estructura adecuada para ser manipulado en las siguientes etapas de procesamiento del producto.

#### 4.3.2 Rendimiento

Se evaluaron los rendimientos considerando la masa de queso obtenido con respecto a la masa de leche empleada. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Rendimientos de quesos enzimáticos control y quesos obtenidos utilizando las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339 o CIDCA 83124 en la fermentación de la leche.

Variante	g de queso cada 100ml de leche de partida
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	28,0
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	22,5
Control sin microorganismos inoculados	26,8

El queso elaborado empleando *L. paracasei* CIDCA 8339 presentó un rendimiento de 28%, mientras que el obtenido utilizando *L. paracasei* CIDCA 83124 fue de 22,5%. Los rendimientos de los quesos enzimáticos resultaron semejantes a los obtenidos en la elaboración de quesos ácidos.

La composición de la leche destinada a la elaboración de queso es de suma importancia para el cálculo del rendimiento quesero. Dentro de los componentes de la leche son de particular relevancia la cantidad de proteína, en particular caseínas, el contenido de materia grasa, la relación entre materia grasa y caseína (así como también el contenido de sustancias minerales (Dalla Costa, 2015).

#### 4.3.3 Composición de los quesos

Se determinó la composición química porcentual de los quesos. Aprovechando que nuestra materia prima es leche y al ser una matriz ampliamente estudiada en muchos trabajos de investigación, se cuenta con una referencia de los valores aproximados que se pueden obtener, es por este motivo que los métodos empleados fueron aquellos que mejor se ajustan a las necesidades requeridas. Se evaluó el contenido de agua mediante la pérdida de peso en estufa, el de proteínas mediante Kjeldahl, el de lípidos utilizando el método de Schmid-Bondzynski Ratzlaff, las cenizas calcinando en mufla a 550°C y el contenido de hidratos de carbono por el método de antrona. En la Tabla 8 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 8: Contenido de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, agua, cenizas y sólidos totales correspondientes a los quesos obtenidos por desestabilización enzimática con o sin empleo de microorganismos en su elaboración. Valores correspondientes a un queso comercial de características similares. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Variante de queso	Proteínas (%)	Hidratos de carbono (%)	Lípidos (%)	Agua (%)	Cenizas (%)	Sólidos totales (%)
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	14,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,2	73,78 ± 0,8 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	26,2 ± 0,8 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	15,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,4	72,1 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	27,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
Control sin microorganismos	14,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	11,0	69,4 ± 1,9 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	30,7 ± 1,9 <sup>a</sup>
Queso blando comercial	21,0	1,0	28,0	49,5	1,0	51,0

La composición de los quesos obtenidos con las dos cepas, así como la correspondiente al control, elaborado sin microorganismos, no difirió significativamente. Cuando se comparan los valores de macrocomponentes con los correspondientes a los del queso que no incluyó la inoculación, se observa un mayor contenido de cenizas en el queso

elaborado con *L. paracasei* CIDCA 83124 y un mayor contenido de agua en el queso elaborado con *L. paracasei* CIDCA 8339, que posiblemente pueda atribuirse a que la matriz obtenida es capaz de retener más cantidad de líquido.

Comparando los resultados de composición de los quesos elaborados en este trabajo con los valores correspondientes a quesos comerciales de apariencia y textura semejantes, se observó que los quesos del presente trabajo cuentan con menor cantidad de proteínas y mayor contenido de hidratos de carbono probablemente debido a una menor eliminación de suero. Con respecto a la materia grasa, también los valores fueron menores para los quesos elaborados en este trabajo lo que resulta en un dato de interés. En los últimos tiempos la concientización de los consumidores respecto al consumo de grasas condujo al desarrollo de productos lácteos bajos en lípidos. Sin embargo, la grasa de la leche contribuye al sabor, cuerpo y textura de producto y su eliminación conduce a defectos de funcionalidad como principales problemas. En esta perspectiva, los exopolisacáridos producidos por las bacterias lácticas pueden actuar como espesantes o viscosantes producidos *in situ* reemplazando el uso de aditivos y permitiendo la reducción del contenido de sólidos requeridos sin afectar, o incluso mejorando, las características sensoriales de textura (Folkenberg, *et al.*, 2006).

#### 4.3.4 Exudado en función del tiempo de almacenamiento

Se evaluó la cantidad de líquido exudado por las matrices de los quesos cuando estos fueron sometidos a una fuerza externa. El ensayo se realizó al finalizar el desuerado y se repitió a los 7 y 12 días de almacenamiento de los quesos a 4°C. Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9: Cantidad de líquido exudado por gramo de muestra de los distintos quesos enzimáticos en función del tiempo de almacenamiento.

Tiempo de almacenamiento(días)	Variedad de queso enzimático	Exudado (g líquido expulsado/g muestra)
0	<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	0,28 ± 0,01 <sup>a</sup>
	<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	0,27 ± 0,01 <sup>a,b</sup>
	Control sin microorganismos inoculados	0,21 ± 0,01 <sup>c,d</sup>
7	<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	0,22 ± 0,03 <sup>b,c,d</sup>
	<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	0,18 ± 0,02 <sup>d</sup>
	Control sin microorganismos inoculados	0,26 ± 0,01 <sup>a,b,c</sup>
12	<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	0,10 ± 0,03 <sup>e</sup>
	<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	0,04 ± 0,03 <sup>f</sup>
	Control sin microorganismos inoculados	0,05 ± 0,04 <sup>e,f</sup>

En los quesos recién elaborados el exudado fue ligeramente menor para el control. Posiblemente el mínimo descenso de pH causado por la fermentación de las cepas de *L. paracasei* en los quesos condujo a una menor capacidad de las matrices de retener el. Por otra parte en cada variante de queso elaborada se observó una disminución del exudado en función del tiempo de almacenamiento, vinculado posiblemente a la deshidratación de las matrices, que condujo a una mayor concentración de sólidos y como consecuencia una menor posibilidad de retener el agua restante.

#### 4.3.5 Evolución de la concentración de microorganismos en los quesos en función del tiempo

La concentración de microorganismos viables presentes en los quesos fue evaluada empleando la técnica de recuento en placa. El análisis se realizó al finalizar el desuerado del queso y se repitió a los 7 y 12 días de almacenamiento a 4 °C. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10: Evolución de la concentración de microorganismos viables presentes en los quesos en función del tiempo de almacenamiento.

Variedad de queso enzimático	Concentración de microorganismos viables (UFC/ml)		
	Inicial	7 días	12 días
<i>L. paracasei</i> CIDCA 8339	$1,0 \cdot 10^8 \pm 1,41 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>	$1,00 \cdot 10^8 \pm 2,83 \cdot 10^7$ <sup>a</sup>	$3,05 \cdot 10^8 \pm 7,07 \cdot 10^{6a,b}$
<i>L. paracasei</i> CIDCA 83124	$2,55 \cdot 10^8 \pm 7,07 \cdot 10^{6a,b}$	$3,6 \cdot 10^8 \pm 4,24 \cdot 10^7$ <sup>b</sup>	$3,65 \cdot 10^8 \pm 3,54 \cdot 10^7$ <sup>b</sup>

La concentración de microorganismos viables en los quesos se mantuvo estable durante los 12 días de almacenamiento refrigerado. Superando el periodo de 16 días, los quesos sufrieron una contaminación, la cual se reflejó con el crecimiento de microorganismos visibles en la superficie de los mismos.

#### 4.3.6 Características reológicas de los quesos

La reología de productos como el queso se encuentra en una estrecha relación con la microestructura de los mismos y, como se indicó anteriormente, reviste gran importancia dado su impacto en las características sensoriales. Los quesos enzimáticos, al igual que los quesos ácidos, fueron evaluados mediante viscosimetría rotacional y reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación.

### Evaluación mediante viscosimetría rotacional

En la Figura 23 se presentan las curvas de flujo, esfuerzo de corte en función de gradiente de velocidad, correspondientes a los quesos recientemente elaborados. En todos los casos se observó un comportamiento de flujo no newtoniano, de tipo pseudoplástico con la presencia de un área de histéresis. En las curvas correspondientes al incremento de gradiente de velocidad se observó la presencia de un pico inicial (*overshoot*), indicador de gran cantidad de interacciones en la matriz de los quesos que se rompen como consecuencia del esfuerzo de corte aplicado.

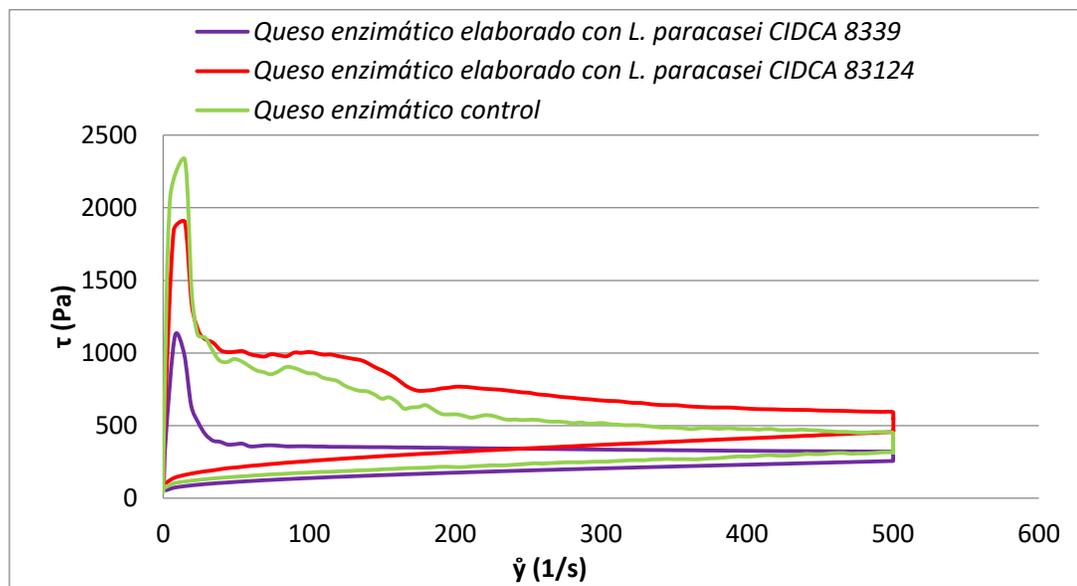


Figura 23: Curvas de flujo, esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad, correspondientes a quesos enzimáticos elaborados sin la inclusión de microorganismos (control) o incluyendo *L. paracasei* CIDCA 8339 o CIDCA 83124.

A partir de los resultados se obtuvieron los valores de tixotropía y viscosidad aparente a  $300 \text{ s}^{-1}$  correspondientes al queso control y a los quesos enzimáticos elaborados. Los resultados se presentan en la figura 24.

Los valores de tixotropía observados fueron elevados, siendo los correspondientes al queso control y al que incluyó a *L. paracasei* 83124 superiores a  $200.000 \text{ Pa/s}$ . El valor de tixotropía del queso elaborado incluyendo *L. paracasei* 8339 fue de  $95.195 \text{ Pa/s}$ , menor a los anteriores (Figura 24 a).

Los valores de viscosidad aparente a  $300 \text{ s}^{-1}$  correspondientes a los quesos enzimáticos elaborados incluyendo *L. paracasei* CIDCA 8339 o CIDCA 83124 ( $1159$  y  $1536 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  respectivamente) fueron semejantes entre sí y no difirieron significativamente del correspondiente al queso control ( $1571,5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ) (Figura 24 b). Si bien al gradiente de

velocidad de  $300 \text{ s}^{-1}$  no se hallaron diferencias significativas en los valores de viscosidad aparente, las curvas de flujos presentaron marcadas diferencias, que pueden ser evidenciadas por los valores de tixotropía o por la determinación de la viscosidad aparente a menores gradientes de velocidad. A bajos gradientes de velocidad se evidencia una ruptura estructural (*overshoot*) menor en los quesos elaborados con la cepa *L. paracasei* CIDCA 8339 indicando una diferencia en la estructura con respecto a los otros dos. Las interacciones existentes en dichos quesos son diferentes y seguramente impactan en la percepción sensorial de estos quesos.

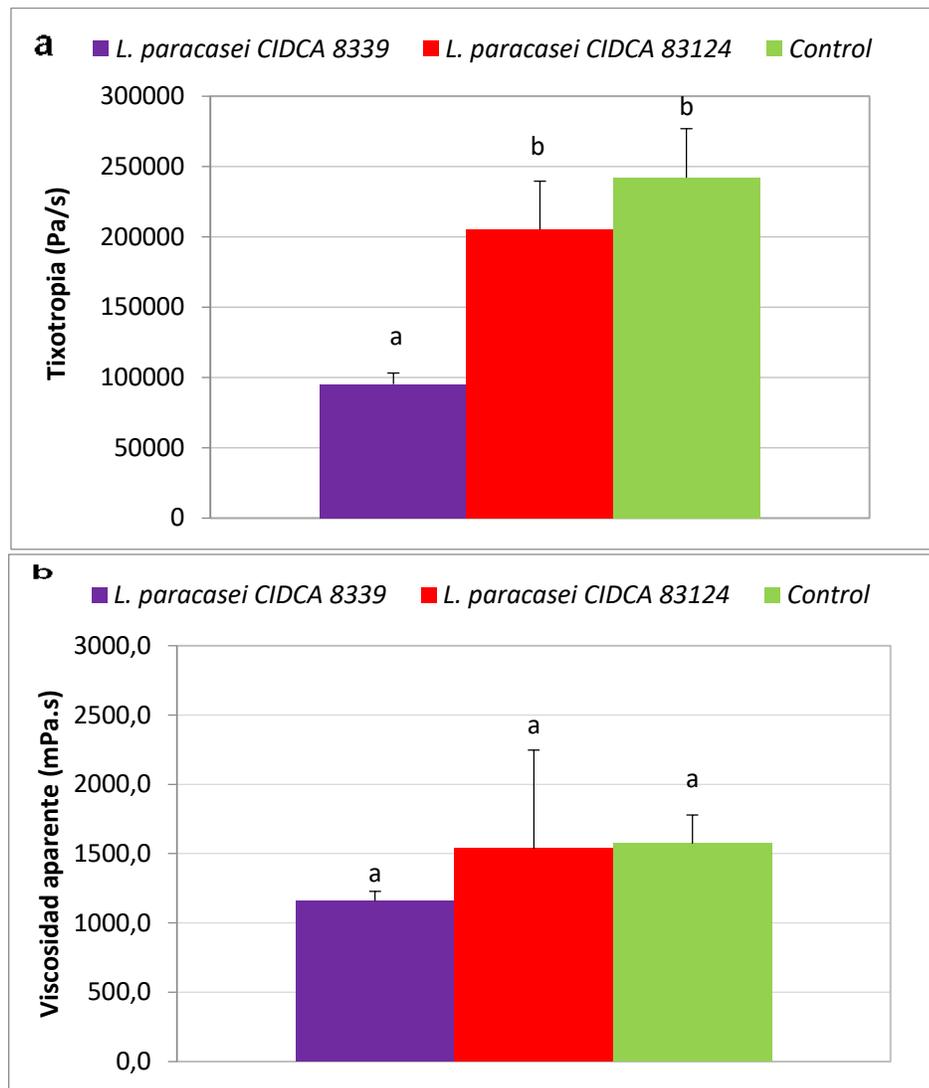


Figura 24: Tixotropía (a) y viscosidad aparente a  $300 \text{ s}^{-1}$  (b) correspondientes a quesos enzimáticos recientemente elaborados sin la inclusión de microorganismos (control) o incluyendo *L. paracasei* CIDCA 8339 o CIDCA 83124. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Los valores de tixotropía y de viscosidad de quesos enzimáticos superan en gran medida a los correspondientes a quesos ácidos. Seguramente la estructura formada a partir de las micelas, luego de la acción de la renina, contribuye en gran parte a las diferencias de comportamiento de flujo observadas, ya que mientras que gel que se forma por acidificación cuando el pH llega el punto isoeléctrico de la caseínas y las mismas se unen mediante enlaces hidrofóbicos es frágil, el retículo tridimensional que se forma luego de que la renina actué sobre la  $\kappa$  caseína y que los fragmentos hidrófobos generados se unan, es notoriamente más resistente. Además, cabe señalar que el contenido de sólidos totales de los quesos enzimáticos fue superior al de los quesos ácidos, factor que también incide en las características reológicas del gel obtenido

#### *Evaluación mediante reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación*

Al igual que para los quesos ácidos, para los enzimáticos se realizó una evaluación mediante reometría oscilatoria de pequeña amplitud de deformación. Se hicieron primero barridos de esfuerzo que permitieron determinar el rango de viscoelasticidad lineal de los productos y luego se ejecutaron barridos de frecuencia y se analizaron los espectros mecánicos de los mismos.

En la figura 25 se presenta, a modo de ejemplo, uno de los barridos de esfuerzo realizados a los quesos para la determinación del rango de viscoelasticidad lineal. En base a los resultados de las diferentes muestras se escogió un esfuerzo común de 10Pa para efectuar la evaluación de los módulos en función de la variación de frecuencia de oscilación.

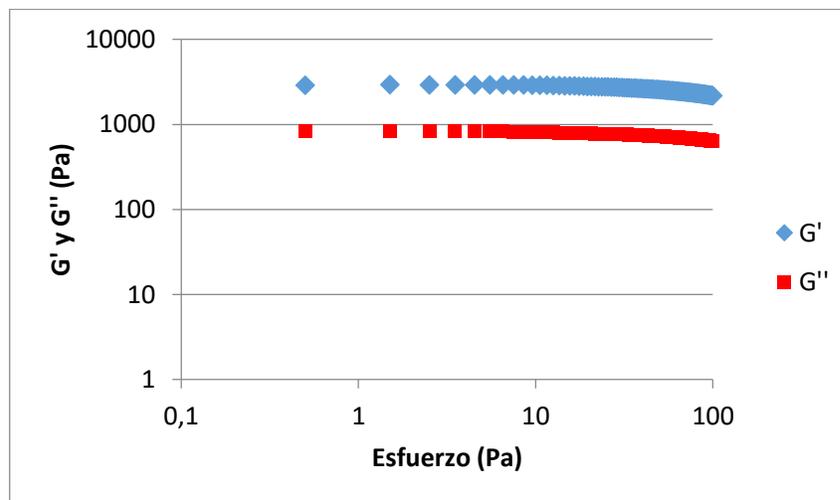


Figura 25: Barrido de esfuerzo, módulos elástico y viscoso en función del esfuerzo aplicado, correspondiente al queso enzimático control, elaborado sin inclusión de microorganismos.

Los espectros mecánicos, módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en función de la variación de la frecuencia de oscilación, de las muestras de quesos enzimáticos recientemente elaborados o luego de 16 días de almacenamiento a 4 °C se presentan en la figura 26.

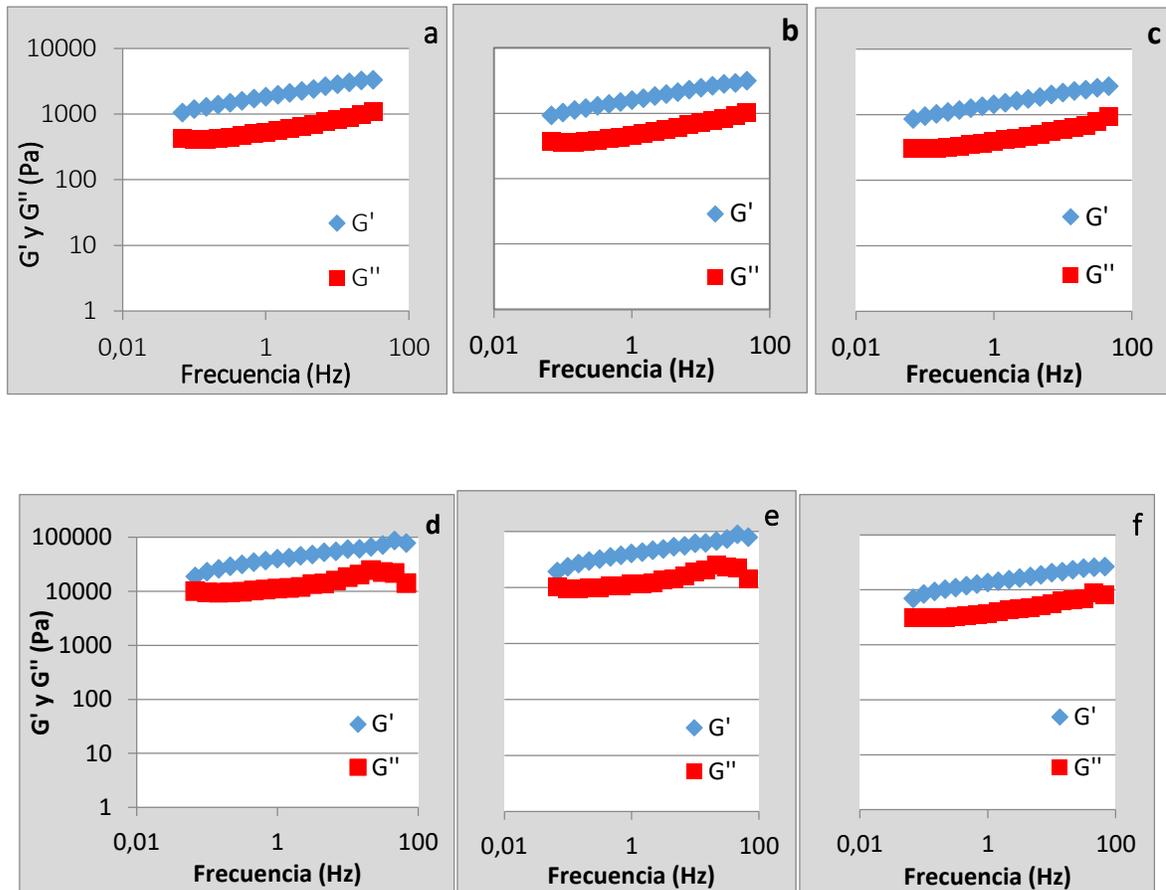


Figura 26: Espectros mecánicos correspondientes a quesos enzimáticos recién elaborados con *L. paracasei* CIDCA 8339 (a) o *L. paracasei* CIDCA 83124 (b) y queso control sin la inclusión de microorganismos (c) y los correspondientes a los mismos quesos luego de 16 días de su elaboración (d, e y f respectivamente).

Todas las muestras presentaron valores de módulo elástico superiores a los correspondientes a módulo viscoso en todo el rango de frecuencia estudiado. Asimismo, se observó una ligera dependencia de los módulos con la frecuencia.

A partir de los espectros mecánicos se escogió la frecuencia de 1Hz para comparar los valores de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ). En los quesos recién elaborados dichos módulos no presentaron diferencias significativas (Figura 27).

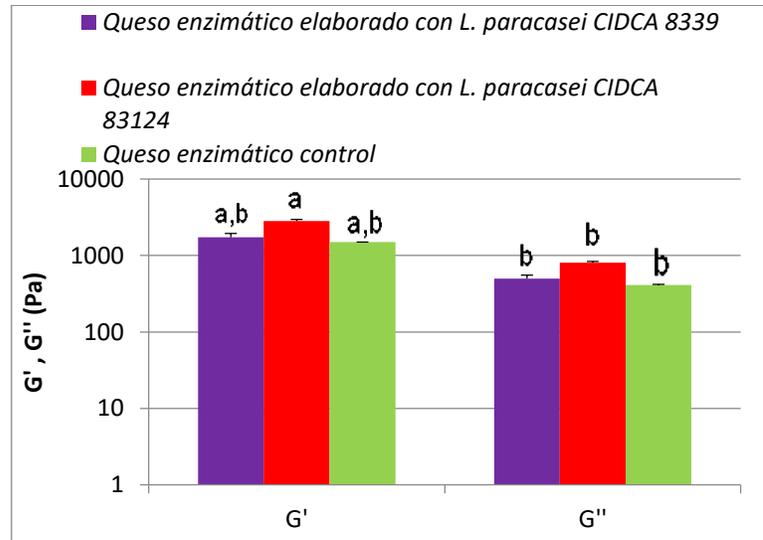


Figura 27: Módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) a 1Hz correspondientes a quesos enzimáticos recién elaborados incluyendo *L. paracasei* CIDCA 8339 o CIDCA 83124 o sin inclusión de microorganismos (control). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Para evaluar la viscoelasticidad de los quesos se calculó la tangente del ángulo de desfasaje ( $\tan \delta$ ) a la frecuencia de 1Hz. Los resultados se presentan en la Figura 28.

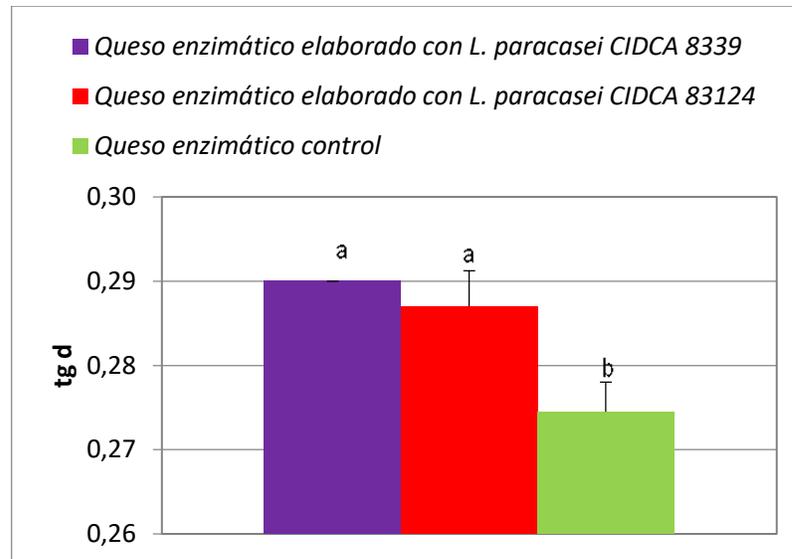


Figura 28: Valores de  $tg\delta$  a la frecuencia de 1Hz correspondiente a quesos enzimáticos recientemente elaborados incluyendo *L. paracasei* CIDCA 8339 o CIDCA 83124, o sin la inclusión de microorganismos en la elaboración (control). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Los valores de  $tg\delta$  resultaron menores a 0,3 para todos los quesos, indicando que en todos los casos se trató de verdaderos geles. Los quesos elaborados incluyendo las cepas en estudio presentaron valores de  $tg\delta$  ligeramente mayores que el queso control. La presencia de los microorganismos o algunas moléculas asociadas a los mismos, aún en pequeñas cantidades, podrían aumentar el carácter viscoso de los quesos provocando el mayor valor de la tangente del ángulo de desfasaje. Este aumento de viscosidad podría beneficiar las características sensoriales del producto otorgándole una percepción de mayor “suavidad”.

Para evaluar el efecto del almacenamiento refrigerado en la microestructura de los quesos se analizaron los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) y la tangente del ángulo desfasaje ( $tg\delta$ ) en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C.

El módulo elástico ( $G'$ ) a 1Hz del queso enzimático control aumentó significativamente con el tiempo de almacenamiento, tomando valores de alrededor de 1500 Pa al inicio, 13500 Pa a los 7 días y 23200 Pa a los 16 días (Figura 29a). De igual modo, el valor del módulo viscoso ( $G''$ ) a 1Hz de este queso mostró un aumento significativo (400 Pa al inicio, 3800 Pa a los 7 días y 7000 Pa a los 16 días) con el tiempo de almacenamiento (Figura 29b). La  $tg\delta$  a 1Hz correspondiente al queso enzimático control no se modificó durante los 7 días iniciales de almacenamiento y aumentó ligeramente llegando al valor 0,30 luego de 16 días de almacenamiento (Figura 29c).

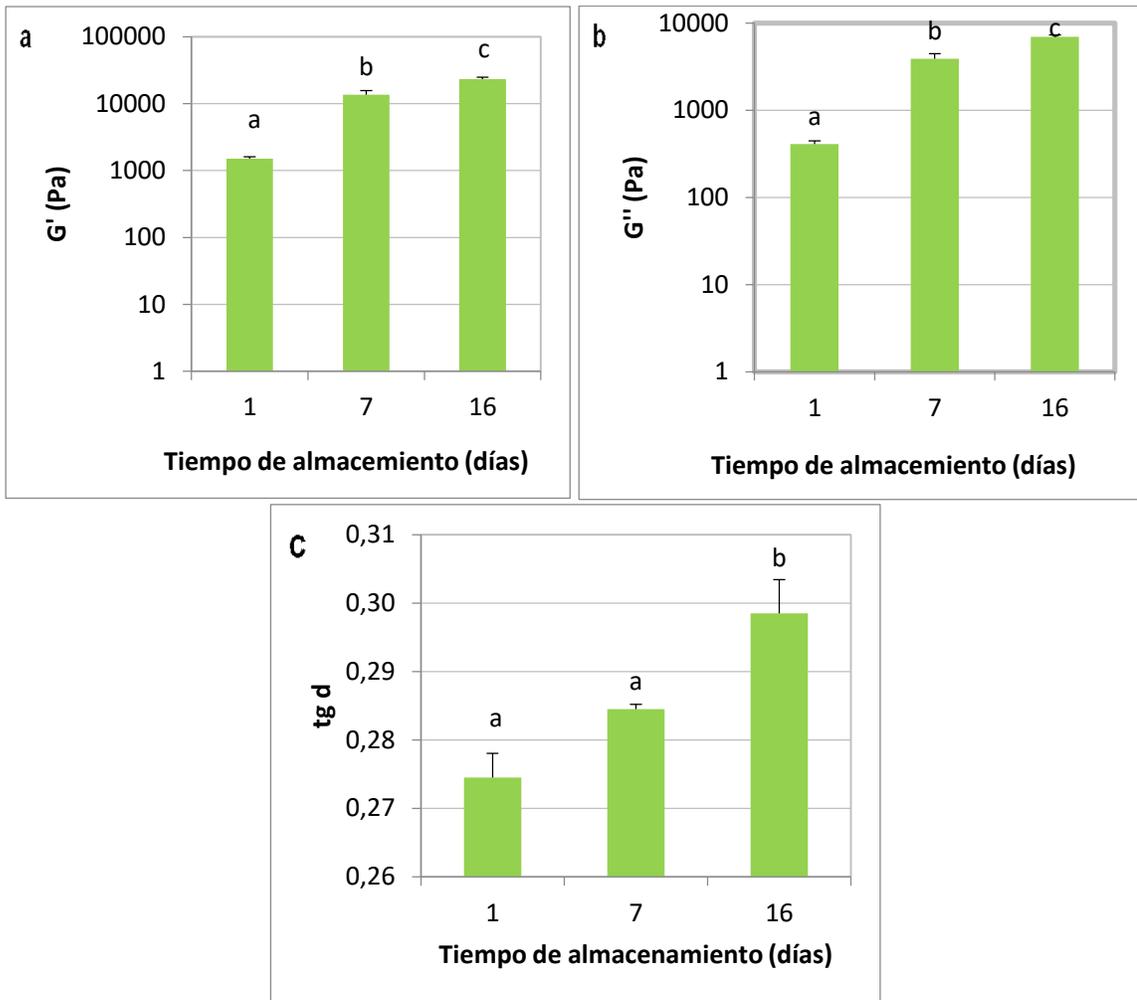


Figura 29: Valores de módulo elástico,  $G'$  (a), módulo viscoso,  $G''$  (b) y tangente del ángulo de desfasaje,  $\text{tg}\delta$  (c) a 1Hz, correspondientes a quesos enzimáticos control en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.

Los valores de módulo elástico ( $G'$ ) correspondientes a los quesos elaborados incluyendo *L. paracasei* CIDCA 8339 al igual que el queso control presentaron un aumento en función del tiempo de almacenamiento. El valor de este parámetro varió desde 1700 Pa en el queso recientemente elaborado hasta 37500 Pa luego de 16 días de almacenamiento (Figura 30a).

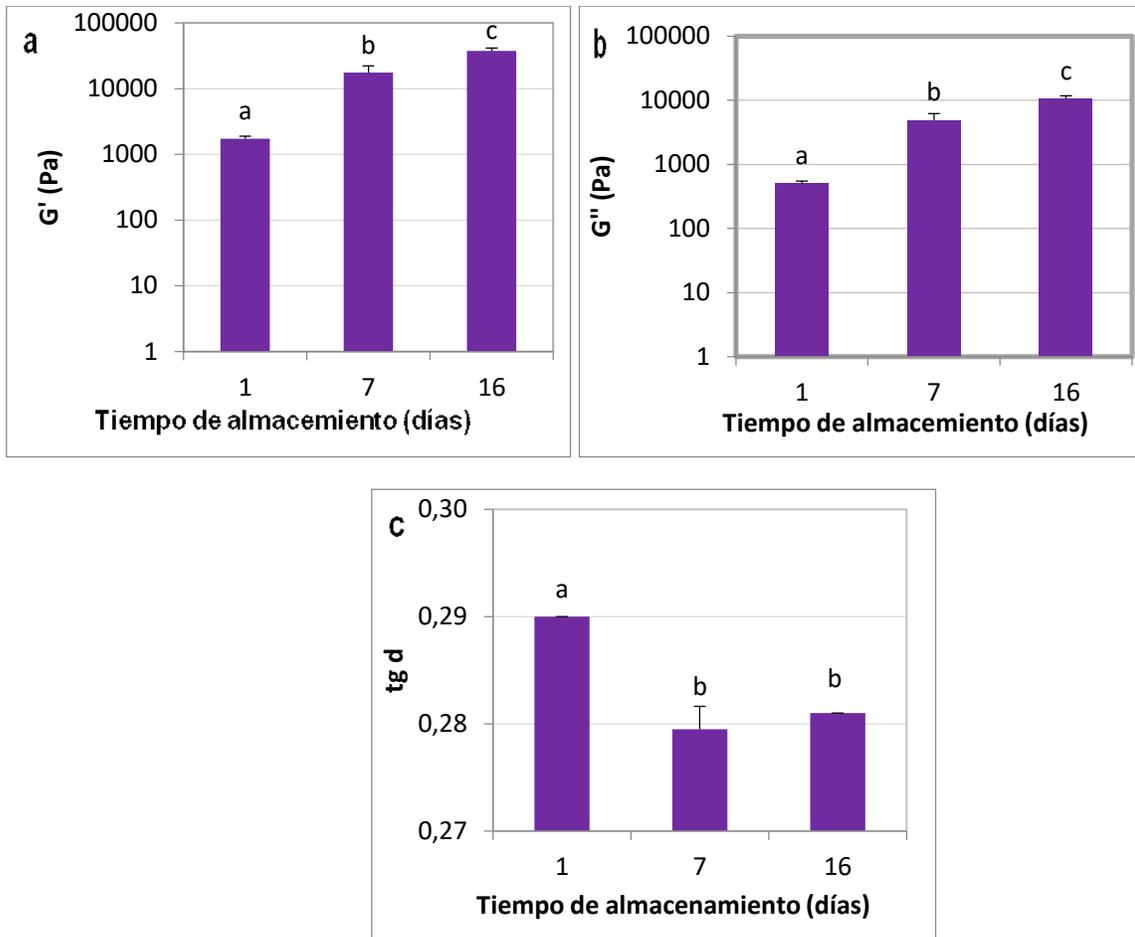


Figura 30: Valores de  $G'$  (a),  $G''$  (b) y de  $\text{tg}\delta$  (c) a 1Hz de queso enzimático elaborado con *L. paracasei* CIDCA 8339 en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.

También el módulo viscoso de los quesos arriba mencionados se incrementó con el tiempo de almacenamiento, pasando de alrededor de 500 Pa al inicio hasta un valor de 10.500 Pa luego de 16 días de almacenamiento refrigerado (Figura 30b).

El valor de  $\text{tg}\delta$  a 1Hz del queso enzimático elaborado con *L. paracasei* CIDCA 8339 disminuyó durante los primeros 7 días de almacenamiento y luego se mantuvo durante el tiempo de almacenamiento ensayado (Figura 30c).

Los resultados correspondientes a los quesos enzimáticos elaborados incluyendo *L. paracasei* CIDCA 83124 se presentan en la Figura 31. Los valores de módulo elástico ( $G'$ ) a 1Hz aumentaron en función del tiempo, siendo inicialmente cercanos a 2800 Pa alcanzando valores de 16000 Pa luego de 16 días de almacenamiento (Figura 31a). Asimismo, el módulo viscoso ( $G''$ ) a 1Hz de este queso enzimático aumentó en función del tiempo, siendo inicialmente cercano a 800 Pa y llegando a valores de 4500 Pa luego de 16 días (Figura 31b). Sin embargo, los valores de  $\text{tg}\delta$  a 1Hz del queso no se modificaron durante el período de almacenamiento evaluado (Figura 31c).

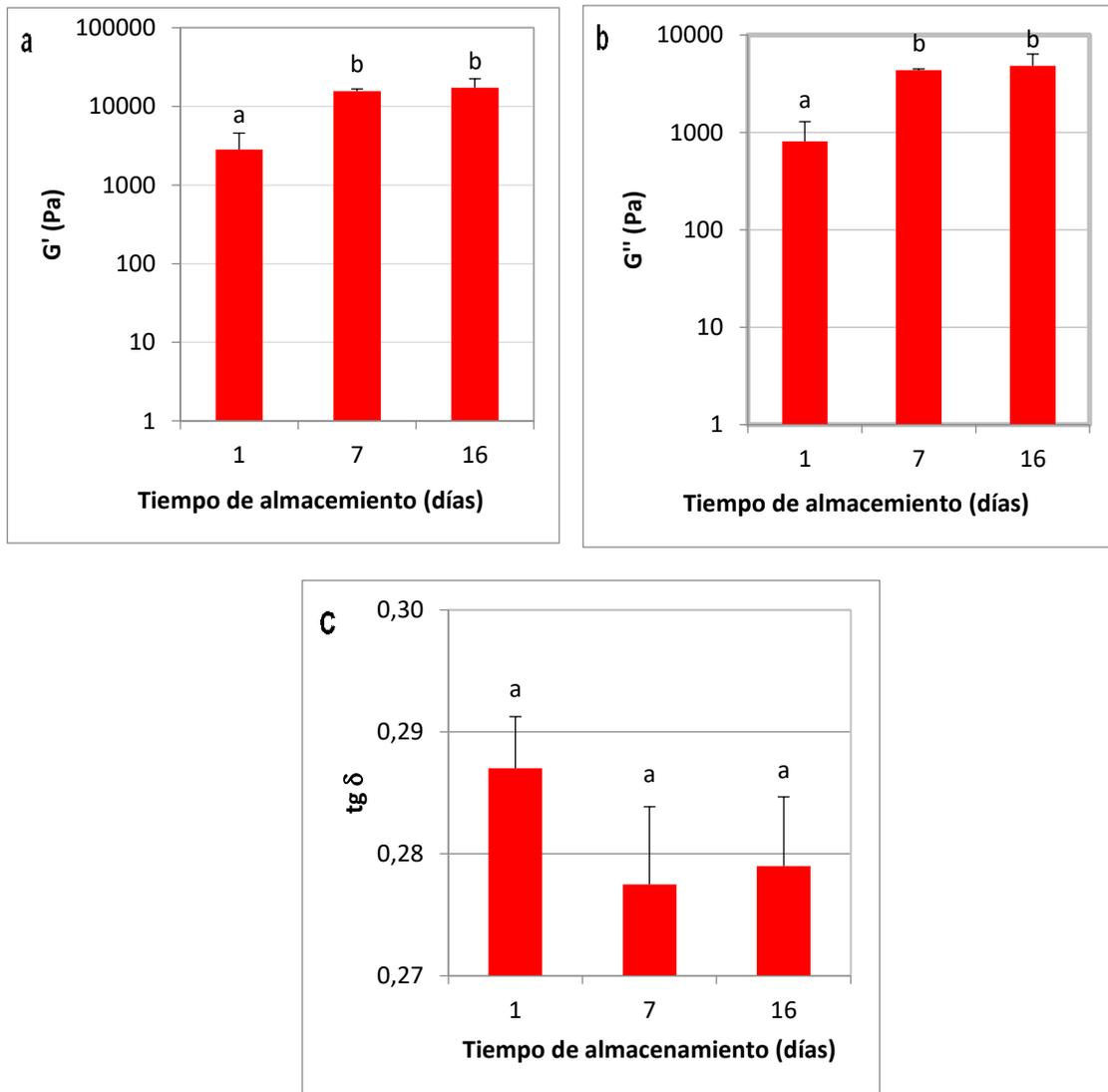


Figura 31: Valores de  $G'$  (a),  $G''$  (b) y de  $\text{tg}\delta$  (c) a 1Hz de queso enzimático elaborado con *L. paracasei* CIDCA 83124 en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.

Cabe señalar que durante el almacenamiento estos quesos presentaron exudado espontáneo y en consecuencia hubo un cambio en la concentración de sólidos totales en todos ellos, no obstante el uso de los fermentos productores de polisacáridos generó diferente comportamiento durante el almacenamiento; el queso enzimático sin inclusión de microorganismos, presentó un incremento de la tangente con el almacenamiento, mientras que cuando están presentes los microorganismos este parámetro descendió, destacando la importancia de los productos de las bacterias lácticas en el mantenimiento de la plasticidad de estos productos. Esas diferencias, pueden ser debidas posiblemente a modificaciones en las interacciones entre las caseínas durante la formación de la matriz del gel.

## 5. CONCLUSIONES

---

A partir del desarrollo del presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Se pudieron elaborar quesos ácidos y enzimáticos utilizando como fermentos las cepas productoras de polisacáridos potencialmente probióticas *Lactocaseibacillus paracasei* CIDCA 8339 y 83124.

Los rendimientos de los quesos enzimáticos resultaron semejantes a los obtenidos en la elaboración de quesos ácidos.

La desestabilización de las caseínas como consecuencia de la acidificación acompañada o no de la acción de la renina, permitió obtener productos diferentes. El uso de renina, debido al mayor número de interacciones generadas en la matriz, posibilitó un queso similar a los de tipo “cremoso”, mientras que el desarrollo de los microorganismos en los quesos ácidos, generó características semejantes a las de los quesos de “untar”.

Los quesos denominados ácidos, presentaron muy buenas características reológicas a pesar de su menor contenido en proteínas y lípidos. Esto probablemente se puede relacionar con la presencia de polisacárido producido durante la fermentación de la leche.

En cuanto a la composición, cuando se empleó la acción de renina como parte del proceso, se lograron productos con mayor contenido de sólidos debido principalmente a un mayor contenido proteico y lipídico.

La pérdida debida a exudado una vez completado el desuerado, no resultó diferente para ambos tipos de quesos.

Ambos quesos pudieron considerarse geles en relación a su viscoelasticidad. Los módulos elástico y viscoso fueron mayores en los quesos elaborados incluyendo la acción enzimática debido a las características estructurales desarrolladas en la matriz y el mayor contenido de sólidos.

Los dos tipos de quesos mantuvieron sus características de viscoelasticidad durante el almacenamiento.

La concentración de microorganismos por gramo de producto fue mayor en los quesos obtenidos por fermentación, hecho explicable por el tiempo de desarrollo otorgado a las bacterias a temperaturas óptimas para su crecimiento. Esto constituye una ventaja en el desarrollo de alimentos probióticos, dado que con menores cantidades de producto podría aportar el número mínimo de microorganismos establecido para el efecto probiótico de los mismos.

Las leches fermentadas con las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339 y 83124 presentaron curvas de flujo diferentes. Las leches fermentadas con la cepa *L. paracasei* CIDCA 83124 presentaron mayor viscosidad y mayor área de histéresis. Sin embargo, los quesos ácidos obtenidos con ambas cepas no presentaron diferencias significativas en lo referente al rendimiento, viscosidad y parámetros viscoelásticos.

Los quesos enzimáticos elaborados con las cepas *L. paracasei* CIDCA 8339 y 83124 presentaron curvas de flujos con diferentes áreas de histéresis y aunque en la evaluación mediante reometría oscilatoria no se observaron diferencias significativas en el módulo elástico ni en el módulo viscoso, los quesos elaborados con las cepas en estudio presentaron valores de  $tg\delta$  ligeramente mayores que el queso control. El mayor carácter viscoso hallado cuando se emplearon los microorganismos podría beneficiar las características sensoriales de los productos.

Los quesos ácidos y enzimáticos del presente trabajo, que incluyeron en su composición microorganismos potencialmente probióticos productores de polisacáridos, constituyen una matriz interesante como alimentos funcionales en los cuales los microorganismos contribuyen tanto al desarrollo de las características sensoriales del producto como a su potencial acción benéfica sobre la salud.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

**Arroyo, L., Cotton, L. N., & Martin, J. H.** (1994). Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture. *Cult. Dairy Prod. J.*, 29(5), 20-24.

**Balthazar, C. F., Junior, C. C., Moraes, J., Costa, M. P., Raices, R. S. L., Franco, R. M., Cruz, A.G., & Silva, A. C. O.** (2016): Physicochemical evaluation of sheep milk yogurts containing different levels of inulin. *Journal of dairy science*, 99(6), 4160-4168

**Batista, A. L., Silva, R., Cappato, L. P., Almada, C. N., Garcia, R. K., Silva, M. C. & Freitas, M. Q** (2015): Quality parameters of probiotic yogurt added to glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical–chemical and metabolic activity analyses. *Food Research International*, 77, 627-635.

**Bengoa, A. A., Llamas, M. G., Iraporda, C., Dueñas, M. T., Abraham, A. G., & Garrote, G. L.** (2018): Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food microbiology*, 69, 212-218

**Beresford, T. P., Sheehan, J. J., Huppertz, T., Hayes, M. G., Kelly, A. L. & Guinee, T. P.** (2005): High pressure treatment of reduced-fat Mozzarella cheese: Effects on functional and rheological properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(1), 73-81.

**Castañeda, R., Borbonet, S., Ibarra, A., Ipar, J. L., Vásquez, A. M., Contreras, C. B., Purtschert, N., & Alfonso, R.** (2010): *Quesos de América Del Sur*. Buenos Aires: Albatros

**Código Alimentario Argentino: Código Alimentario Argentino: Decreto 2126/71-Reglamentario de la Ley 18.284. Capítulo VIII artículo 605. Capítulo XVII artículo 1389.** <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>

**Cogan, T. M., & Hill, C.** (1993): Cheese starter cultures. In *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (pp. 193-255). Springer, Boston, MA.

**Dabour, N., Kheadr, E. E., Fliss, I., & LaPointe, G.** (2005). Impact of rropy and capsular exopolysaccharide -producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition. *International Dairy Journal* 15(5), 459-471.

**Dalla Costa, C. A.** (2015): Rendimiento quesero teórico y real de la leche de la cuenca de Villa María, Córdoba (Doctoral dissertation, Universidad Católica de Córdoba).

**Dills, S. S., Apperson, A. P. R. I. L., Schmidt, M. R., & Saier Jr, M. H.** (1980): Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiological reviews*, 44(3), 385.

**FAO/WHO** (2002): Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. <http://www.fao.org/es/ESN/food>

**Ficha 38 Quesos. Alimentos Argentinos. Dirección Nacional de alimentos y bebidas** (2015):  
[http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha\\_38\\_Quesos.pdf](http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_38_Quesos.pdf)

**Folkenberg, D. M., Dejmek, P., Skriver, A., Guldager, H. S., & Ipsen, R.** (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *International Dairy Journal*, 16(2), 111-118.

**Fox, P. F., & Stepaniak, L.** (1993): Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal*, 3(4-6), 509-530.

**Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H.** (2000): Cheese rheology and texture. *Fundamentals of cheese science*, 305-340.

**Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., & Lynch, C. M.** (1998): Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53(2), 83.

**Fox, P. F., McSweeney, P. L., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (Eds.)**. (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1: General Aspects. Elsevier.

**Gobetti, M. & DiCagno, R.** (2003) : Hard Italian Cheeses ripening. In *Encyclopedia of Dairy Science*, Volume 1, pp. 378–385 (Eds H Roginsky, J Fuquay & P Fox). UK: Academic Press.

**Hamet, M. F.** (2012). Polisacáridos de bacterias lácticas de fermentos artesanales para el desarrollo de alimentos funcionales (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata).

**Hamet, M.F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., Van Hoorde, K., Garrote, G.L., Huys, G., Vandamme, P. et al.** (2013) Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present kefir grains . *Food Microbiol* 36, 327–334.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.022>

**Hassan, A. N., Corredig, M., Frank, J. F., & Elsoda, M.** (2004). Microstructure and rheology of an acid-coagulated cheese (Karish) made with an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strain and its exopolysaccharide non-producing genetic variant. *Journal of Dairy Research*, 71(1), 116-120.

**Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. & Calder, P. C.** (2014): Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.

**Holzapel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H.** (1998): Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 85-101.

<http://www.racve.es/publicaciones/fundamentos-tecnologicos-de-la-elaboracion-de-queso/>

**Johnson M. E., Steele J L.: Fermented Dairy Products** (2001) En: *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, 2nd Edition. Ed.: M.P. Doyle et al. Capítulo 31. Washington, D.C.

**Johnson, M. E.** (2017). A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9952-9965.

**Joyner, H. S.** (2018). Explaining food texture through rheology. *Current Opinion in Food Science*, 21, 7-14.

**Kandler, O. & N. Weiss** (1984): Regular non-sporing Gram-positive rods. Genus *Lactobacillus* (Beijerinck 1901.22). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2*, ed. Sneath. PHA, Mair NS, Sharpe ME and Holt JG, pp. 1208-1234.

**Lucey, J. A.** (2017). Formation, structural properties, and rheology of acid-coagulated milk gels. In *Cheese* (pp. 179-197). Academic Press.

**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.

**Marshall B., Law B. A** (1984): *Advances in Microbiology, Biochemistry of Cheese fermented*. Capítulo III; editado por Davies y Law, Londres

**Marteau, P., Vesa, T. & Rambaud, J.** (1997): Lactose malabsorption. In: Fuller R, ed. *Probiotics 2: applications and practical aspects*. London: Chapman & Hall. 65-88.

**McSweeney, P. L.** (2004): Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2- 3), 127-144.

**McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F.** (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 1, 361-371.

**McSweeney, P. L., Fuquay, J. W. & Fox, P. F.** (2011). *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press.

**Monnet, V., Condon, S., Cogan, T. M., & Gripon, J. C.** (1996): Metabolism of starter cultures. *Dairy Starter Cultures*, 44-100.

**Nantet, B.** (1994): *Quesos del mundo*.

**Novel G.** (1993): Les Bactéries Lactiques. En: *Microbiologie Industrielle*. Ed.: J. Y. Leveau & M. Bouix. Technique & Documentation-Lavoisier, Paris. Cap. 3, pp. 169-374.

**O'mahony, J. A., Lucey, J. A., & McSweeney, P. L. H.** (2005). Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3101-3114.

**Pagano JC** (1998): Nueva legislación del Mercosur para leches fermentadas. *Indust. Lech.* 713:8–13.

**Perotti, M. C., Bernal, S. M., Meinardi, C. A., & Zalazar, C. A.** (2005). Free fatty acid profiles of ReggianitoArgentino cheese produced with different starters. *International Dairy Journal*, 15(11), 1150-1155.

**Picout, D.R. & Ross-Murphy, S.B.** (2001). Thermoreversible and irreversible physical gels from biopolymers. In *Polymer Gels and Networks*. Osada, Y. & Khokhlov, A.R., Eds. Marcel Dekker, New York. pp. 27-46.

**Poncelet** (2014): Enciclopedia del queso :<http://www.poncelet.es>

**Quintáns-García, N., Blancato, V. S., Repizo, G. D., Magni, C., & López, P.** (2008): Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria.

**Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K.** (2012): In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food research international*, 49(2), 619-625.

**Ranadheera, C. S., Liyanaarachchi, W. S., Chandrapala, J., Dissanayake, M., & Vasiljevic, T.** (2016). Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 178-187.

**Rao, M. A.** (1999) *Rheology of Fluid and Semisolids Foods. Principles and Applications*. Ed.: J. A. Lopes da Silva, P. E. Okechukwu & M. A. Rao. Aspen Publishers, Inc., Maryland.

**Rybka, S., & Kailasapathy, K.** (1995): The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 50(2), 51.

**Saavedra, J.M., Bauman, N.A. & Oung, I.** (1994): Feeding *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infant in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*. 344, 1046-1049.

**Samona, A., & Robinson, R. K.** (1994): Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 47(2), 58-60.

**Scott, R., Scott, J. E., Robinson, R. K., & Wilbey, R. A.** (1998): *Cheesemaking practice*. Springer Science & Business Media

**Shah, N. P.** (2007): Functional cultures and health benefits. *International dairy journal*, 17(11), 1262-1277.

- Shah, N. P., & Ravla, R. R.** (2004): Selling the cells in desserts. *Dairy Industries International*, 69(1), 31-32.
- Shah, N. P., Lankaputhra, W. E., Britz, M. L., & Kyle, W. S.** (1995): Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5(5), 515-521.
- 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
- Upadhyay, V. K., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., & Fox, P. F.** (2004): Proteolysis in cheese during ripening. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 1(3), 391-434.
- Valencia, M. C. C.** (2011). Fundamentos tecnológicos de la elaboración del queso. In *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias* (Vol. 19, No. 19, pp. 55-68). Real Academia de Ciencias Veterinarias.
- Vélez, M. A.** (2013). Influence of indigenous milk enzymes activities lipoprotein lipase and plasmin on lipolysis and proteolysis of hard cooked cheeses (Doctoral dissertation, Doctoral Thesis. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. <http://biblioteca-virtual.unl.edu.ar:8180/tesis/handle/1/57>).
- Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, van Boekel MAJS** (2001): *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. [Milk science and dairy technology] .Acribia, Zaragoza.
- Zalazar, C. A., Bergamini, C. V. & Hynes, E. R.** (2006): Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16(8), 856-866.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H., 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*.
- Zisu, B., & Shah, N. P.** (2005). Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 957-972.
- Zourari, A., Accolas, J. P., & Desmazeaud, M. J.** (1992): Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Le lait*, 72(1), 1-34.