

Propiedades físico-químicas y comportamiento reológico  
en la maduración de quesos.



Alicia Eva Bevilacqua  
Tesis presentada para el grado de:  
Doctor en Ingeniería  
Departamento de Ingeniería Química,  
Facultad de Ingeniería,  
Universidad Nacional de La Plata  
Diciembre 1997



El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ingeniería fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra Noemí E. Zaritzky y la Co-dirección de la Dra Alicia N. Califano.

*A Norita*

*por su presencia*

*incondicional, siempre*

*Mi agradecimiento a las instituciones e industrias que hicieron que este trabajo fuera posible y a todas aquellas personas que me tendieron su mano cuando lo necesité.*

<b>1- INTRODUCCION</b>	<b>Pág.</b>
<b>1-1 Generalidades</b>	1
<b>1-2 Clasificación de los quesos</b>	3
<b>1- 3 Manufactura del queso</b>	3
<i>Formación del gel de caseína</i>	5
<i>Coagulación por cuajo o enzimática</i>	7
<i>Coagulación láctica o ácida</i>	9
<i>Desuerado</i>	10
<i>Troceado</i>	12
<i>Agitación</i>	13
<i>Temperatura en el desuerado</i>	13
<i>Acidificación</i>	14
<i>Lavado de los granos</i>	14
<i>Prensado de la cuajada</i>	14
<i>Salado</i>	15
<b>1-4 Maduración o afinado de la cuajada</b>	15
<i>Agentes del afinado</i>	16
<i>Enzimas de la leche</i>	16
<i>Enzimas coagulantes</i>	17
<i>Enzimas microbianas</i>	19
<i>Flora microbiana</i>	19
<i>Modo de acción de los microorganismos</i>	21
<i>Mecanismos bioquímicos de la maduración del queso</i>	24
<i>Glicólisis</i>	24
<i>Lipólisis</i>	25
<i>Proteólisis</i>	26

<i>Factores condicionantes de la maduración</i>	27
<b>1-5 Aroma y sabor en quesos.</b>	30
<b>1-6 Textura en quesos</b>	33
<i>Evaluación de la textura instrumental</i>	36
<b>1-7 Maduración en películas plásticas</b>	36
<i>Envasado en películas plásticas flexibles</i>	37
<b>1-8 Congelación</b>	40
<b>1-9 Objetivos</b>	41
<b>2-MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>2-1 MATERIALES</b>	44
<i>Materias primas</i>	44
<i>Queso Reggianito</i>	44
<i>Manufactura del queso Reggianito</i>	45
<i>Queso Mozzarella</i>	46
<i>Manufactura del queso Mozzarella</i>	47
<b>2-2 METODOS</b>	48
<b>2-2-1 Contenido de humedad</b>	48
<b>2-2-2 Actividad acuosa</b>	49
<b>2-2-3 Contenido de sal y de grasa</b>	49
<b>2-2-4 Contenido de Nitrógeno</b>	49
<i>Nitrógeno total</i>	50
<i>Nitrógeno soluble</i>	51
<i>Nitrógeno no proteico</i>	51

<b>2-2-5 Análisis de ácidos orgánicos y lactosa</b>	51
<i>Preparación de la muestra</i>	60
<b>2-2-6 Análisis de textura</b>	61
<i>Ensayos de compresión</i>	61
<i>Curvas fuerza deformación</i>	63
<i>Ensayos de relajación realizados en Queso Reggianito Argentino</i>	64
<b>2-2-7 Propiedades funcionales del queso Mozzarella fundido</b>	70
<i>Fundibilidad</i>	70
<i>Viscosidad aparente</i>	71
<i>Aceite liberado</i>	72
<b>3-MADURACION EN PELICULA DE QUESO REGGIANITO</b>	
<b>3-1 DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	73
<b>3-2 ANALISIS ESTADISTICO</b>	74
<b>3-3 RESULTADOS Y DISCUSION</b>	77
<b>3-3-1 Humedad y actividad acuosa</b>	77
<b>3-3-2 Proteólisis</b>	80
<b>3-3-3 Análisis de textura</b>	82
<i>Curvas de relajación</i>	82
<i>Análisis de las curvas fuerza-deformación</i>	84
<i>Relaciones entre parámetros reológicos, humedad y proteólisis</i>	84
<b>3-3-4 Lactosa y ácidos orgánicos</b>	90
<b>3-4 CONSIDERACIONES FINALES</b>	101

**4-CONGELACION DE QUESO MOZZARELLA**

<b>4-1 DISEÑO DE LA EXPERIENCIA</b>	103
<i>Quesos refrigerados</i>	103
<i>Quesos congelados</i>	103
<i>Ensayos realizados sobre las muestras de queso Mozzarella</i>	105
<b>4-2 ANALISIS ESTADISTICO</b>	106
<b>4-3 ANALISIS DE ACIDOS ORGANICOS</b>	110
<b>4-4 ANALISIS ESTADISTICO DE ACIDOS ORGANICOS</b>	111
<b>4-5 RESULTADOS Y DISCUSION</b>	113
<b>4-5-1 Quesos refrigerados</b>	113
<b>4-5-1-1 Contenido de agua, grasa y sal</b>	113
<b>4-5-1-2 Contenido de nitrógeno</b>	113
<b>4-5-1-3 Análisis de Perfil de Textura</b>	114
<i>Adhesividad</i>	114
<i>Dureza</i>	115
<i>Elasticidad</i>	115
<b>4-5-1-4 Propiedades funcionales de la Mozzarella fundida</b>	116
<i>Viscosidad Aparente y aceite liberado</i>	116
<i>Fundibilidad</i>	117
<b>4-5-2 Quesos congelados</b>	117
<b>4-5-2-1 Contenido de nitrógeno</b>	118
<b>4-5-2-2 Análisis de perfil de textura</b>	120
<i>Dureza</i>	120
<i>Adhesividad, cohesividad y elasticidad</i>	122



<b>4-5-2-3 Propiedades funcionales</b>	124
<i>Viscosidad aparente</i>	124
<i>Aceite liberado</i>	126
<i>Fundibilidad</i>	127
<b>4-5-3 Acidos orgánicos</b>	129
<i>Análisis de componentes principales</i>	135
<b>4-6 CONSIDERACIONES FINALES</b>	140
<b>5-CONCLUSIONES</b>	142
<b>CONCLUSIONES FINALES</b>	148
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	149
<b>NOMENCLATURA</b>	167

# *Capítulo 1*

## ***INTRODUCCION***

## **1-1 Generalidades**

El queso es el producto , fermentado o no, constituido esencialmente por la caseína de la leche, en forma de gel más o menos deshidratado, que retiene casi toda la materia grasa (si se trata de queso graso), un poco de lactosa en forma de ácido láctico y una fracción variable de sustancias minerales.

Según el Código Alimentario Argentino (Art. 605-Dec. 111 12/1/76) "con la denominación de queso se entiende el producto fresco o madurado que se obtiene por la separación del suero de la leche o de la leche reconstituída (entera, parcial o totalmente descremadas), coaguladas por acción del cuajo y/o enzimas específicas, complementada o no por bacterias específicas o por ácidos orgánicos permitidos a este fin, con o sin el agregado de sustancias colorantes permitidas, especies o condimentos u otros productos alimenticios".

Dado que el queso es un producto casi artesanal existen más de cuatrocientas variedades de quesos según la región, la calidad de leche utilizada, el animal del cual proviene la leche y las condiciones de producción e industrialización de los mismos. Con el paso del tiempo se tiende a la normalización e industrialización controlada de algunas de las variedades de quesos. Actualmente se definen legalmente algunas variedades de quesos con el fin de proporcionar a los consumidores productos idénticos dentro de cada variedad.

La manufactura de la mayor parte de las variedades de queso involucra esencialmente la concentración ( de 6 a 12 veces) de caseína y grasa de la leche según la variedad del queso. La concentración se logra por la coagulación del principal grupo de proteínas de la leche, caseínas, utilizando algunos de los siguientes métodos (Fox y Law,1991) :

- 1) Proteólisis limitada utilizando una proteínasa (cuajo bovino o microbiano); este método se emplea en la mayor parte de los quesos madurados y en algunos quesos frescos.
- 2) Precipitación isoeléctrica a pH 4.6, principalmente para quesos frescos, usualmente por la producción in situ de ácido láctico por un cultivo iniciador y menos frecuentemente por acidificación directa.

3) Agregado de ácido y sometimiento a la acción del calor; por ejemplo acidificación a pH 5.2 con suero ácido o ácido acético a 80-90°C (ricota y queso blanco).

Se deben considerar dos pasos fundamentales en la fabricación del queso. El primero incluye el desarrollo de la estructura básica, característica de cada variedad particular de queso. La misma está determinada por el pH en el momento del drenado del suero. El segundo paso implica el desarrollo de la composición química en la cuajada del queso, debida a la actividad enzimática y microbiana necesaria para producir el sabor y el olor característico de cada variedad de queso.

Las cuajadas de las diferentes variedades de quesos pueden ser consideradas como medios preferenciales donde cierto tipo de microorganismos pueden crecer mejor que otros (Lawrence y col., 1983).

La principal proteína de la leche es la caseína, de alto peso molecular y gran contenido en fósforo. Las distintas caseínas se clasifican según su composición, secuencia de aminoácidos y genotipos. Así se clasifican en  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  caseínas, diferenciándose unas de otras por la variante genética y además por el grado de fosforilación y el contenido de glúcidos. La caseína se encuentra en la leche formando un complejo de fosfocaseinato cálcico en disolución coloidal, constituido por micelas de distintos tamaños (20 a 600 nm) e igual carga negativa que hace que se repelan entre sí.

La fabricación del queso es lograda por la remoción de humedad a partir del coágulo. En la leche, las micelas de caseína contienen grandes cantidades de agua (alrededor de 2 g de agua/ g de caseína). Aproximadamente la mitad de esta agua es removida durante la fabricación del queso junto con cantidades variables de calcio y de fosfato. La cantidad de fosfato de calcio micelar perdida se determina por la acidez desarrollada antes de que el suero sea drenado desde la cuajada.

Estudios de microscopía electrónica muestran que el queso consiste de una matriz continua de proteínas en la cual se encuentra, en forma dispersa, una fase grasa discontinua. La caseína contribuye a la formación de la estructura básica del queso. Creamer y Olson (1982), observaron que la microestructura de los quesos consiste en una malla proteica formada por moléculas de  $\alpha_{s1}$  caseína. La resistencia de esta malla proteica depende de factores tales como el contenido de agua, grasa y minerales presentes en el

queso. Se supone que el calcio podría actuar como enlace entre las cadenas proteicas o bien que los efectos de neutralización de cargas generarían puentes entre las proteínas.

La conversión de la cuajada en queso maduro está determinada principalmente por la proteólisis. La actividad proteolítica en el queso está principalmente determinada por los niveles de cuajo residual, las proteinasas nativas de la leche presentes, las proteasas microbianas, la relación sal/agua, la temperatura de maduración, el tipo de coagulante usado y los cambios de pH durante la maduración. El potencial de óxido-reducción y el contenido de calcio también pueden ser importantes.

### **1-2 Clasificación de los quesos**

Según el Código Alimentario Argentino (1993) y de acuerdo al contenido de materia grasa del extracto seco de la pasta los quesos se clasifican en:

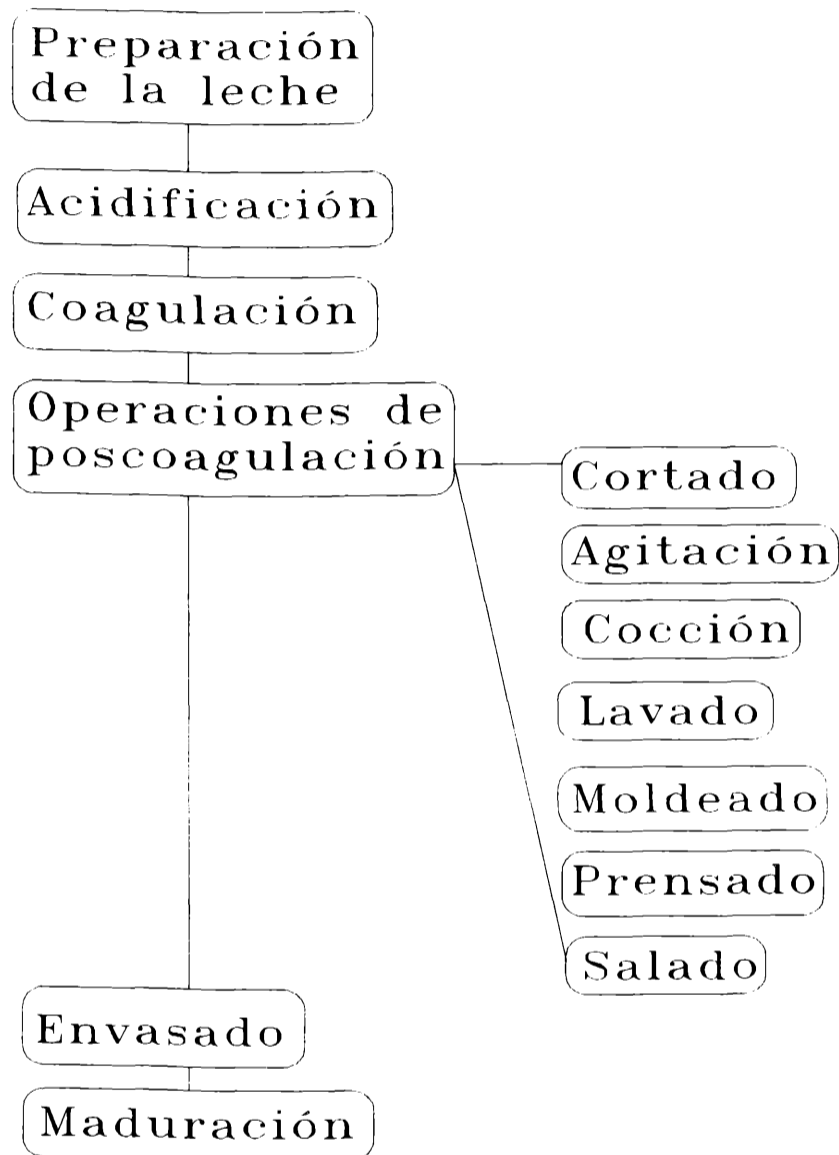
- a) **doble crema:** son aquellos cuyo contenido de materia grasa es mayor del 60%.
- b) **grasos:** el contenido de materia grasa se encuentra entre el 40 y el 59.9%.
- c) **semigrasos:** con contenido de materia grasa entre 25 y 39.9%.
- d) **magros:** con contenido de materia grasa entre 10 y 24.9 %.

Según el tiempo de maduración y el contenido de agua de la pasta (Código Alimentario Argentino, 1993) pueden ser:

- a) **quesos de pasta blanda o quesos frescos:** contienen entre el 45 y el 55% de agua (Petit-Suisse, Caccio, Quartirolo, Cremoso, Camembert).
- b) **quesos de pasta semidura:** contienen entre el 36 y el 44% de agua (Fontina, Pategrás, Cheddar, Tybo).
- c) **queso de pasta dura:** contienen entre 27 y 35% de agua (Reggianito, Sardo, Provolone).

### **1- 3 Manufactura del queso**

Para llegar de la leche al queso se deben cumplir ciertas etapas tecnológicas que pueden ser resumidas en el siguiente esquema:



La fabricación de un queso comprende en general tres etapas fundamentales:

- 1-La fabricación de un gel de caseína. Es el cuajado o coagulación de la leche.
- 2-La deshidratación parcial de este gel por sinéresis. Es el desuerado de la cuajada.
- 3-La maduración enzimática del gel deshidratado. Es el afinado o maduración de la cuajada.

*Formación del gel de caseína*

La coagulación es una de las etapas más importantes en el proceso de elaboración del queso. Consiste en la floculación de las micelas de caseína, que se unen para formar un gel compacto, que contiene el líquido de dispersión que es el suero. El gel formado atrapa en su estructura la mayor parte de los glóbulos grasos. El sólido húmedo una vez separado resulta rico en caseína y materia grasa, y en el líquido segregado se halla casi toda la lactosa, las proteínas del suero y muchas sales minerales (Zalazar, 1994).

La coagulación se puede realizar por medio de una acidificación láctica o utilizando cuajo. En realidad todas las cuajadas de quesería se obtienen por acción simultánea del cuajo y de la acidificación láctica, alguna de ambas en mayor proporción que la otra.

En la **coagulación por acidificación láctica** la desestabilización de las micelas ocurre debido a que cuando disminuye el pH se reduce la afinidad por el calcio entre las submicelas de caseínas. Esto provoca un pasaje gradual de fósforo y calcio desde la micela hacia el exterior con lo cual ésta se desmineraliza; en consecuencia la micela se disgrega en submicelas, que por la disminución de su grado de hidratación y por su elevado peso molecular interacciona dando lugar a la floculación. Este fenómeno se manifiesta en el punto isoeléctrico de la caseína (4.6) y es necesario llegar a él para lograr que todo el calcio micelar presente pase disuelto al lactosuero.

Los factores que en la práctica regulan la formación del gel láctico son temperatura y modo de acidificación. La agregación puede ocurrir a un pH mayor que el punto isoeléctrico si la temperatura se eleva.

Para obtener un gel liso y homogéneo es necesario producir el ácido láctico por vía biológica en el seno de la leche en reposo (fermentación láctica).

Las fuerzas que mantienen unidas entre sí a las submicelas son de naturaleza hidrofóbica y por lo tanto relativamente frágiles. El coágulo ácido obtenido es firme, friable, poroso y poco contráctil y de difícil deshidratación por la elevada cantidad de agua retenida por las pequeñas partículas de caseína desmineralizadas.

Si bien la coagulación ácida sola prácticamente no se emplea en la fabricación de quesos, tampoco es cierto que la enzimática sea la responsable exclusiva del fenómeno.

Debería considerarse que el paso previo al agregado del coagulante enzimático a la leche es la adición de un femento láctico, que según el tipo de queso provocaría un descenso del pH (Zalazar, 1994).

La **coagulación enzimática** es el sistema más difundido en quesería y utiliza sustancias principalmente de origen animal y microbiano.

Los coagulantes de origen animal son en general mezcla de dos enzimas: la quimosina y la pepsina; la tripsina y la quimotripsina, que son también enzimas del aparato digestivo animal, no se utilizan debido a su muy elevado poder proteolítico.

El coagulante de origen bovino es el que ha alcanzado mayor difusión. Puede obtenerse tanto de animales lactantes como de adultos. En los animales lactantes el porcentaje de quimosina oscila entre el 85 y el 100%, ésta es una enzima proteolítica (endopeptidasa) segregada por la mucosa del cuarto estómago de los rumiantes jóvenes alimentados exclusivamente con leche (terneros, corderos y cabritos); en el animal adulto la relación entre quimosina y pepsina se invierte siendo del 55 al 60% la cantidad de pepsina en el coagulante. Como otras enzimas digestivas, el cuajo es segregado en forma inactiva como pro-quimosina. La pro-quimosina se activa espontáneamente a pH 5 y se acelera rápidamente a pH 2. La estabilidad de la enzima está fuertemente ligada al pH y es máxima a pH entre 5.5 y 5.6 y a pH = 2. A pH superior a 7 se observa cierta desnaturalización que conduce a pH 8 a una inactivación irreversible de la enzima. Una leche alcalina, por consiguiente, no coagula en su presencia. La temperatura también regula la actividad coagulante de la enzima y ésta es máxima a 40°C. Por debajo de 20°C la actividad es muy débil.

Se pueden utilizar otros tipos de proteasas coagulantes provenientes de cultivos microbianos. Las enzimas coagulantes microbianas son elaboradas por distintos hongos siendo los más importantes *Mucor pusillus* var. Lindt, el *Mucor miehei* var. Cooney et Emerson y *Endothia parasitica* (Fox, 1987).

También se obtienen enzimas coagulantes a partir de bacterias tales como: *Bacillus cereus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus mesentericus*, pero dichas enzimas existen como parte de mezclas que contienen otras enzimas altamente proteolíticas que desfavorecen los atributos de calidad de los quesos.



### *Coagulación por cuajo o enzimática*

El cuajo actúa sobre el fosfocaseinato de la leche fraccionando la sustancia en dos partes, una soluble llamada proteosa de Hammarsten y la otra insoluble en presencia de calcio que es el paracaseinato cálcico.

Al añadir el cuajo a la leche se produce una proteólisis limitada que se verifica agregando a la leche más el cuajo, solución de ácido tricloroacético (TCA) al 12 % y midiendo la cantidad de nitrógeno en el filtrado. Esto se conoce como reacción primaria, muy rápida al principio y luego lenta hasta hacerse nula cuando la cantidad de nitrógeno liberado alcanza al 2% del contenido de nitrógeno de la caseína nativa. Esta reacción primaria se desarrolla aún a bajas temperaturas (próximas a 0°C). Al terminar la reacción primaria la cantidad de nitrógeno liberado no aumenta más y es aquí donde la leche coagula y forma un gel homogéneo. Esta es la llamada reacción secundaria, que no procede si la temperatura no es superior a 15°C. Esto puede interpretarse teniendo en cuenta que la caseína entera encierra un constituyente, la caseína  $\kappa$ , que juega el rol coloide protector manteniendo disperso el conjunto de los constituyentes de la caseína original en un medio cálcico.

Las dos etapas de acción del coagulante presentan diferentes características. La primera es una acción enzimática, independiente de los iones calcio, en el transcurso de la cual se solubiliza una pequeña parte de la  $\kappa$  caseína. La segunda etapa, o coagulación propiamente dicha, necesita de la presencia de iones calcio.

Se sabe que la  $\kappa$  caseína es la única caseína hidrolizada por el cuajo, mientras que las otras caseínas no son atacadas. Esta proteólisis es limitada y genera dos fracciones: una constituida por 64 aminoácidos, soluble en TCA, llamada caseinomacropéptido y otra formada por 105 aminoácidos, llamada  $\kappa$  paracaseína, que forma un gel retráctil que se vuelve rápidamente fibroso en ausencia de calcio. La porción de la  $\kappa$  caseína que libera el coagulante representa aproximadamente un tercio de la molécula, no contiene ningún aminoácido aromático pero en cambio conserva los residuos glucídicos de la molécula original. Esa elevada proporción de glúcidos es la que le otorga al caseinomacropéptido su gran solubilidad.

La otra porción de la  $\kappa$  caseína (paracaseína) desprovista de la parte glucídica se torna insoluble frente a los iones calcio.

El caseinomacropéptido separado de la caseína tiene una carga eléctrica particularmente elevada. La  $\kappa$  caseína descargada se desequilibra iónicamente provocando una reorganización de su estructura molecular y modificando sus posibilidades de interacción. Así la  $\kappa$  caseína pierde sus propiedades estabilizantes y la fracción  $\kappa$  caseína restante no está en condiciones de mantener la estabilidad de los complejos formados con la  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$  caseína. La solución micelar se desestabiliza y se forma un gel que ocupa todo el volumen inicial. Hay que recalcar que si no existiera fosfato de calcio cualquier caseinato flocularía pero no formaría el gel. El tiempo de coagulación disminuye cuando aumenta el contenido en fosfato cálcico coloidal para una misma concentración de calcio iónico. El fosfato confiere una verdadera estructura de sostén al coágulo, cuya consistencia es tanto más firme cuanto más elevado es el contenido de fosfato cálcico coloidal en la leche.

La acción del coagulante sobre la caseína no se limita a las dos reacciones antes mencionadas. A esto sigue una reacción de proteólisis general que se produce a baja velocidad, denominada reacción terciaria y que tiene importancia en el proceso de maduración posterior.

Durante la coagulación las micelas se agregan en flóculos y después en fibras constituyendo finalmente una red tridimensional que contiene en su interior el lactosuero y los glóbulos de grasa. El coágulo obtenido por acción del cuajo es muy distinto del obtenido por acidificación láctica. Los factores de los cuales depende el desarrollo de la coagulación de la leche por el cuajo son: la dosis de cuajo agregada a la leche (a mayor dosis mayor coagulación), la temperatura (la óptima es alrededor de 40°C), el pH de la leche (pues el cuajo se inactiva en medio alcalino y es óptimo a pH 5.5), el contenido en iones calcio necesarios para la reacción de la leche con el cuajo, el contenido de fosfato cálcico coloidal como sensibilizador de la paracaseína a los iones calcio, la dimensión de las micelas de caseína (a mayor tamaño menores tiempos de coagulación) y el contenido en proteínas solubles de la leche (mayor cantidad, menor posibilidad de coagulación).

Existen otros factores como la lipólisis a causa de la cual se generan los ácidos

grasos que se absorben en las superficies de las micelas de caseína y modifican sus propiedades superficiales. Los ácidos también pueden contribuir a la insolubilización del Ca.

El coágulo enzimático es flexible, elástico, compacto, impermeable y contráctil. Produce un buen desuerado y tolera la acción mecánica que facilita la salida del suero.

### *Coagulación láctica o ácida*

Una leche destinada a la fabricación de quesos debe contener todos los gérmenes cuya presencia es necesaria para la adecuada formación y evolución de la cuajada. Es por esto que se hace imprescindible perfeccionar la población microbiana de las leches de quesería. Se deben ajustar los contenidos de **fermentos lácticos** para obtener los distintos tipos de quesos.

En la actualidad se utilizan fermentos seleccionados como: bacterias lácticas (aromatizantes y filantes), mohos (neutralizantes), bacterias alcalinizantes (degradantes de la caseína) y bacterias propiónicas (atacan al lactato cálcico dando propiónico y gas carbónico) formadoras de ojos.

Se emplean principalmente cultivos seleccionados de bacterias lácticas y mohos. Los fermentos lácticos se clasifican esencialmente por su temperatura óptima de desarrollo. En la fabricación de quesos de pasta fresca se emplean cultivos acidificantes de *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, que se desarrollan bien entre 15 y 18°C. En los quesos de pasta blanda se utilizan cepas del mismo lactococo que se desarrollan bien entre 20 y 32°C. En la fabricación de Gruyere se emplean cultivos de fermentos termófilos como *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* y *Lactobacillus helveticus* cuyo rango de temperatura óptima de acción está entre 40 y 50°C. En general no se utiliza un solo fermento sino varios.

En la fabricación de queso Mozzarella se utiliza un cultivo termófilo constituido por *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*. El *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* es débilmente proteolítico y por sí solo no puede producir suficientes aminoácidos libres y péptidos pequeños, a partir

de las caseínas, para mantener o generar una óptima producción ácida en la leche (Kindstedt, 1993). En contraste, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* es mucho más proteolítico y estimula el crecimiento de *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*, produciendo péptidos y aminoácidos libres a partir de la caseína de la leche; se estimula el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* proporcionando dióxido de carbono, ácido fórmico y bajando el potencial de óxido-reducción de la leche y de la cuajada del queso (Matalon y Sandine, 1986; Reinbold, 1989).

Para quesos que requieren la aplicación de mohos se debe aislar un moho que presente caracteres morfológicos y bioquímicos satisfactorios. Con ayuda de este cultivo se siembra un medio líquido, constituido generalmente por suero láctico, cuyo pH se ha corregido para permitir el desarrollo óptimo del moho.

### *Desuerado*

Tiene por objeto obtener un sustrato que será sometido a la acción de las enzimas durante el afinado.

El gel, cualquiera que sea su modo de obtención, se encuentra en un estado físico inestable. El líquido que lo impregna (lactosuero) se separa más o menos rápidamente, según las condiciones en que se encuentra, y la fase sólida que queda se llama cuajada.

Con el desuerado se afecta al 95% del agua originaria de la leche.

Los geles lácticos pueden considerarse como redes formadas por un conjunto de filamentos moleculares entrelazados de manera diferente según el tipo de gel. Se puede imaginar que las micelas de fosfocaseinato cálcico forman los nudos de una red que resulta de las uniones que se establecen entre ellas.

### *Sinéresis*

Cuando los geles se dejan en reposo evolucionan según su modo de formación. Dejan escapar el lactosuero como consecuencia de la contracción de la red inicial. Esto se conoce como sinéresis. Disminuye el grado de hidratación de las micelas y luego una

fracción del líquido intersticial se escapa espontáneamente de las mallas de la red.

El otro fenómeno que sucede es el estrechamiento progresivo de las mallas del gel, debido a la creación de nuevos enlaces ó al reforzamiento de los ya existentes. Ambos fenómenos suceden simultáneamente pero sus contribuciones son diferentes y varían con el tipo de coágulo.

El comportamiento de los geles es diferente según su origen. Un gel láctico deja escapar en forma rápida y espontánea una cantidad importante de lactosuero (es una disminución del grado de hidratación de las micelas). La contracción de las micelas es débil o nula. Un gel enzimático, después de su formación, es casi impermeable. No hay deshidratación rápida de las micelas; con el tiempo se contraen y expulsan el lactosuero y de manera más fácil si se realiza el troceado para facilitar la eliminación.

Se pueden asociar estos comportamientos a la estructura de los diferentes geles. En un gel láctico, la estructura micelar original de la leche está modificada por la eliminación del Ca y del fosfato cálcico coloidal a causa de la acidificación. Los minerales se encuentran en el suero como lactato cálcico soluble. La desmineralización de las micelas disminuye sus dimensiones y aumenta su dispersión. De esta forma el gel está formado por una red de mallas muy finas en el seno de la cual la superficie de contacto entre las micelas y el lactosuero es muy extensa. La cantidad de agua ligada, retenida por la fase sólida, es grande y se opone a la deshidratación, efectuada por los procedimientos clásicos de desuerado. Por esto se explican las propiedades reológicas del coágulo láctico. Las mallas del gel desmineralizadas son de naturaleza exclusivamente orgánica. Son cadenas proteicas con cierto grado de polimerización y entrelazadas estrechamente para formar una red, por lo cual el gel no es rígido ni compacto, se desmorona rápidamente con el troceado ó agitación y se forman pequeñas partículas de cuajada que nadan en un suero turbio.

En un gel enzimático, la situación es muy diferente. La estructura original de la leche se conserva. Los nodos de la red están formados por fosfoparacaseinato cálcico, más voluminosos que las moléculas de caseína, formando polímeros complejos que constituyen el gel láctico. Las mallas del gel enzimático son más grandes y retienen en forma mecánica una importante cantidad de lactosuero que escapa cuando se corta la red. Además, la elevada carga mineral de las micelas hace que el gel enzimático sea rígido y compacto. El

carácter hidrófobo de la  $\kappa$  paracaseína explica la formación de enlaces hidrofóbicos sólidos entre las micelas de fosfoparacaseinato. Estos enlaces son los responsables de la rigidez y pueden ser el origen de la sinéresis.

En el gel láctico existe gran dispersión de los agregados moleculares de caseína, la contractibilidad del gel es casi nula y no hay carga mineral con lo cual el desuerado es difícil y se obtiene una cuajada muy húmeda. La adición de cuajo permite mejorar el desuerado. Los geles predominantemente lácticos pueden someterse a acciones mecánicas como el troceado y la agitación, pero debe prevenirse la pérdida de cuajada con el suero. Se puede regular la temperatura para controlar el proceso. Si la temperatura es menor de 10°C el desuerado es nulo, entre 10 y 20°C se acelera pero continúa siendo lento y a 30°C es rápido pues la viscosidad del lactosuero disminuye. Sin embargo, la fabricación de quesos frescos ha demostrado que es preferible desuerar a temperaturas un poco por debajo de 22°C y con mayor tiempo de desuerado, para evitar obtener pastas demasiado finas.

Para realizar el desuerado de una cuajada de tipo enzimático, permitiendo la salida del lactosuero que impregna el gel, hay que recurrir a acciones mecánicas para destruir la cohesión del coágulo y la compactación del mismo. Esto debe realizarse pues el coágulo enzimático no contiene bacterias lácticas y por lo tanto no se acidifica y no desuera cuando se deja en reposo. Durante el desuerado se produce la contracción del coágulo, las micelas se acercan y la malla de la red se estrecha.

Las acciones mecánicas que se ejercen en quesería son el troceado y la agitación, controlados por la acidificación y la temperatura.

### *Troceado*

Consiste en la ruptura de la película que se forma por asociación de algunos componentes de la leche pertenecientes principalmente a la fase grasa. De esta forma se multiplica también la superficie exudativa. Según el tipo de queso el troceado se hace más o menos intenso. En quesos de pasta blanda, donde el troceado se hace menos intenso, se obtienen pastas más húmedas, con cuajadas menos desueradas. En quesos de pasta dura,

con un troceado intenso y altas superficies exudativas, las cuajadas son más desueradas. Si el lirado es muy intenso las partículas resultantes son a su vez muy pequeñas y retienen una cantidad de suero mayor que la prevista. Al existir mucha superficie expuesta se favorece la hidratación de las partículas muy pequeñas. Existe una dimensión óptima de grano para cada tipo de queso.

Es también importante el momento en el que se realiza el lirado después de la formación del gel. El período transcurrido entre la coagulación y el lirado es un parámetro importante en el proceso tecnológico de fabricación de quesos.

### *Agitación*

Casi siempre el lirado va seguido de agitación de los granos para acelerar y completar el desuerado, renovando así continuamente la superficie de exudado e impidiendo la adherencia de los granos, que formarían apegados que retendrían el suero. La agitación debe realizarse con cuidado para no romper la cuajada y para que los granos conserven su integridad, pues de esto depende el rendimiento quesero.

### *Temperatura en el desuerado*

En el desuerado del gel enzimático su acción es fundamental. La elevación de la temperatura permite disminuir el grado de hidratación de los granos favoreciendo la sinéresis. En quesos de pasta dura, que sufren un desuerado mecánico importante, el troceado y la agitación deben realizarse sobre un coágulo a 32-35°C. Si se enfriara bruscamente la velocidad de desuerado disminuiría hasta bloquearse. La elevación de la temperatura debe hacerse progresivamente; en calentamientos bruscos se forma una costra sobre la superficie de los granos que los impermeabiliza, dificultando el desuerado. Además, si la temperatura de cocción es muy elevada, se modifica la estructura proteica y puede haber desnaturalización. Asimismo el desarrollo de algunos microorganismos indispensables puede verse comprometido.

### *Acidificación*

En los geles enzimáticos es necesaria la acción del proceso biológico de acidificación, que le confiere al queso la textura y la plasticidad conveniente.

La acción de la acidificación es la responsable del armazón mineral de la cuajada. La acidificación favorece el drenado del suero aumentando la permeabilidad del gel, debido a la disolución de la armadura cálcica. La acidificación regula el contenido de minerales de la cuajada y con ello la evolución y características finales del queso.

Los factores que regulan la acidificación son: la población de bacterias lácticas acidificantes en el coágulo, la aptitud del coágulo para el desarrollo de esta población microbiana, la temperatura y la velocidad del desuerado.

En quesos de pasta dura la acidificación se realiza progresivamente durante el troceado y agitación, mientras que en los quesos de pasta blanda y en algunas de pasta firme, la acidificación se realiza antes de cualquier acción mecánica (Veisseiyre, 1980).

### *Lavado de los granos*

En algunos procesos de fabricación de quesos de pasta prensada se efectúa un lavado de los granos después del troceado y eliminación del suero. Este lavado se realiza con agua o salmuera de poca concentración. La operación tiene como objetivo diluir los componentes solubles del coágulo y extraer la fracción del suero retenida en el interior de los granos. Con el lavado, cuando el tiempo de contacto es suficientemente largo, se extrae como componente soluble la lactosa, con lo cual la cuajada tiene pocas posibilidades de acidificación.

### *Prensado de la cuajada*

Con el prensado se completa el desuerado y se confiere al queso su forma definitiva. Si durante el prensado la salida del suero es lenta se puede ocasionar un desuerado insuficiente y una acidificación y desmineralización excesiva de la pasta con lo



cual esta resulta seca y poco flexible. El aspecto y la acidez del suero obtenido son parámetros que determinan la calidad del producto. Las condiciones del prensado son distintas para cada tipo de queso: la presión a aplicar, la duración de la operación, etc.

### *Salado*

Mediante el salado se regula el desarrollo microbiano. El salado se realiza en seco ó por inmersión en baño de salmuera. En el caso de salado en seco el NaCl añadido, que recubre la superficie del queso, absorbe agua de las capas superficiales del queso y del interior del mismo. La absorción del agua por la capa de sal y la evaporación atmosférica traen como consecuencia la formación de la costra superficial y la deshidratación parcial de la pasta, favorecida por la contracción de las proteínas, causada por la disminución del grado de hidratación de las mismas.

El salado en salmuera contribuye al desuerado de la pasta. La composición de la salmuera cambia con el tiempo, "envejece", lo cual prueba el pasaje de agua hacia ella, comprobado por el descenso del contenido de NaCl y por el incremento de los componentes del lactosuero. Tiene como ventajas un salado más regular y economía de mano de obra. Se modifica el reparto de las sustancias minerales: el calcio tiende a abandonar la pasta mientras que el sodio de la salmuera y el potasio de la pasta tienden a acumularse en el interior del queso. Estos intercambios dependen de la temperatura y de la concentración salina.

### **1-4 Maduración o afinado de la cuajada**

Esta es la última etapa de la fabricación del queso. Después del desuerado la cuajada tiene forma, volumen y un grado de compactación ya determinados, al igual que su composición química. En estas condiciones la cuajada suele ser ácida por la presencia de ácido láctico. En los quesos frescos la fabricación se interrumpe en esta etapa.

El resto de los quesos sufre una maduración biológica más o menos pronunciada a los fines de desarrollar su aroma y sabor y modificar su aspecto, textura y consistencia.

La maduración modifica también la digestibilidad y el valor nutritivo de los quesos. Todos los quesos sufren fermentación. El afinado es diferente para los distintos tipos de quesos.

El proceso de afinado comprende tres grandes fenómenos: fermentación de la lactosa, hidrólisis de las grasas y proteólisis de la caseína. A esto se suman procesos físicos como la evaporación del agua o la difusión de la sal.

### *Agentes del afinado*

Comprenden las enzimas endógenas de la leche, las enzimas coagulantes y las segregadas por la flora microbiana tanto del cultivo iniciador como de las restantes bacterias presentes ( Fox y Law, 1991).

### *Enzimas de la leche*

La leche contiene alrededor de 30 enzimas nativas ya sea en el suero, en las micelas de caseína, en el glóbulo graso o en partículas microsómicas. De estas enzimas algunas son proteasas, siendo la más estudiada la alcalina (MAP). También se detectó en leche la presencia de plasminógeno, precursor inactivo de la MAP. La MAP está asociada a la micela caseínica, lo mismo sucede con el plasminógeno. La plasmina también se ha detectado en la membrana del glóbulo graso.

La MAP hidroliza las caseínas  $\alpha_{s2}$  y  $\beta$  a mayor velocidad que la  $\alpha_{s1}$ . La plasmina muestra máxima actividad a pH 7.5 (Kaminogawa y col., 1984) pero es aún activa bajo condiciones de coagulación de la leche y de maduración del queso. Esta proteínasa que se demostró era igual a la enzima de la sangre (una serinoproteínasa), está presente en la leche en relativamente pequeñas pero significativas cantidades como precursor inactivo (Eigel y col., 1979; Kaminogawa y col., 1984; Haasnoot y col., 1989). Estos precursores pueden ser convertidos en plasmina activa por activadores naturales presentes también en la leche. Al pH normal de la leche y en leche fresca, la enzima activa se encuentra asociada con las micelas de caseína y en una pequeña parte con las membranas de los glóbulos de grasa de la leche. La asociación desaparece si el pH desciende. Los

activadores plasminogénicos también están unidos a las micelas de caseínas y pueden entonces ser incorporados junto con la plasmina a la cuajada del queso. Bajando el pH de la leche o agregando Na Cl a ésta se permite la separación de la plasmina de las micelas de caseína (Richardson y Creamer, 1973; Grufferty y Fox, 1988). El pH al cual la disociación completa tiene lugar (pH=4.8) es lo suficientemente bajo para que la enzima esté presente en las cuajadas de casi todas las variedades de quesos.

Otras proteasas neutras de la leche, asociadas a la fracción  $\kappa$  caseína y ligada a las micelas, son termoresistentes (resisten 30 minutos a 63 °C), tienen pH óptimo 8-8.5, que está bastante alejado al pH de la cuajada (5-5.5), y existen en baja concentración en la leche. Por esto se considera que no cumplen un importante papel en el afinado sobre todo si se las compara con las proteasas microbianas.

Las lipasas endógenas se las considera más importantes. La lipasa plasmática, asociada a la  $\kappa$  caseína, y localizada en el seno de las micelas, con pH óptimo a 8.5-9 mantiene su actividad aún a pH 5-6. Es poco termoresistente e interviene sólo en los quesos de pasta blanda.

La fosfatasa ácida tiene pH óptimo entre 4.6-4.8 y es termoestable. Actualmente se sabe que la caseína desfosforilada es más sensible a la acción de las proteasas. Por consiguiente la fosfatasa ácida puede intervenir en la maduración.

De lo anterior se deduce que las enzimas endógenas de la leche tienen un accionar limitado en la maduración del queso.

### *Enzimas coagulantes*

Las enzimas coagulantes de la leche tienen alta actividad a pH bajo. Durante la manufactura del queso y durante su maduración, su acción a pH entre 4.5 y 6.5, es de particular interés. La función primaria de las enzimas coagulantes de la leche es como ya se mencionó, la de iniciar la coagulación en la leche destinada a la fabricación de queso. Esto incluye la rápida y específica división de la parte de la molécula de  $\kappa$  caseína localizada en la periferia de las micelas de caseína (Schmidt, 1982; Walstra, 1990). La acción enzimática inestabiliza las micelas, que se hallaban dispersas coloidalmente por

repulsión electrostática y estérica. Luego la leche empieza a coagular, a una temperatura adecuada, bajo la influencia de los iones Ca del medio. El cuajo como enzima proteolítica no sólo interviene en la formación del coágulo sino en su evolución posterior. Durante la maduración la acción endopeptidásica del cuajo recae sobre el conjunto de proteínas de la cuajada. Las moléculas proteicas se fragmentan en cadena liberando productos de pesos moleculares elevados (polipéptidos).

Durante la coagulación, una pequeña parte de las enzimas del cuajo se incluyen en el gel proteico formado y contribuyen a iniciar las etapas de la maduración por una lenta degradación de las proteínas de la cuajada (principalmente  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  caseína). La cantidad de cuajo remanente depende de factores tales como qué cantidad del mismo se agrega a la leche para queso, el pH de la leche y el del cuajo mismo, la temperatura de cocción y la velocidad de producción ácida por el agregado de bacterias ácido lácticas.

La velocidad de hidrólisis inducida por la quimosina sobre la  $\alpha_{s1}$  y  $\beta$  caseína está determinada por los estados de agregación de las moléculas de sustrato, que pueden afectar el acceso a los puentes peptídicos que podrían ser potencialmente rotos.

El coagulante juega el principal papel en la ruptura inicial de la  $\alpha_{s1}$  caseína (Bertola y col, 1991), hasta llegar a su desaparición si el tiempo de maduración es suficiente. Aquí se ven involucrados dos factores: 1) la especificidad enzimática y 2) la accesibilidad de la enzima a los puentes peptídicos.

La caseína  $\alpha_{s1}$  en solución tiene algunas uniones susceptibles a la quimosina cuya hidrólisis es dependiente del pH y del cloruro de sodio. La caseína  $\alpha_{s1}$  se hidroliza inicialmente a  $\alpha_{s1}$ - I (25-199) y luego a  $\alpha_{s1}$ - V (30-199) que son los más importantes productos de la acción del coagulante (Fox y Law, 1991).

La  $\beta$  caseína permanece casi sin hidrolizar por acción del cuajo en las etapas finales de la maduración, para casi todas las variedades de queso; algunas variedades, en las cuales la presencia de algún hongo específico ataque a la  $\beta$  caseína, presentan hidrólisis de la misma.

La insensibilidad de la  $\kappa$  caseína y de la  $\alpha_{s2}$  caseína al ataque de la quimosina puede deberse a la estructura entrecruzada de las mismas. En los quesos que contienen muy poco o nada de coagulante, la plasmina aparece como responsable del inicio de la degradación

de las caseínas.

La participación del cuajo en el fenómeno de afinado varía con el tipo de queso. El lavado y la cocción entorpecen la retención de la enzima o la inactivan parcialmente.

Por acción del cuajo se liberan grandes moléculas nitrogenadas que son utilizadas por enzimas microbianas que las transforman en moléculas de bajos pesos moleculares que dan así al queso aromas y sabores característicos (Visser, 1993).

En resumen el cuajo inicia la proteólisis cuando el sustrato es aún ácido y prepara la acción de las enzimas microbianas.

### *Enzimas microbianas*

Un aporte muy significativo al proceso de maduración lo realizan las enzimas provistas por los microorganismos que se hallan presentes en el queso. Las enzimas microbianas específicamente incluyen las de las bacterias lácticas mesófilas y termófilas que se encuentran presentes en los fermentos o starters utilizados. Además están las enzimas aportadas por microorganismos que se hallan en tipos particulares de quesos como son los enterococos, pediococos, micrococos, bacterias propiónicas, diversos hongos y levaduras y las enzimas de microorganismos de contaminación (Zalazar, 1994).

El cultivo iniciador proporciona las enzimas proteolíticas originadas por las bacterias ácido lácticas que lo constituyen. Estas enzimas pueden subdividirse en proteinasas y peptidasas (endopeptidasas, aminopeptidasas, di y tripeptidasas), algunas de las cuales juegan un papel específico en las sucesivas etapas de degradación proteica.

### *Flora microbiana*

En la cuajada coexisten una población microbiana formada por distintas especies. El sustrato se modifica por aparición, multiplicación y muerte de esta población, así como por la secreción celular y la degradación y consumo de algunos componentes. Se establece un equilibrio dinámico y cambiante ocasionado por la diversidad de microorganismos presentes y por sus condiciones de desarrollo, asociación, simbiosis y antagonismos.

Cada tipo de queso tiene una microflora específica actuando sobre un sustrato.

Las bacterias lácticas son Gram +, generalmente inmóviles, no esporuladas, catalasa negativas, oxidasa negativas.

Los principales géneros de bacterias lácticas presentes en fermentos lácteos son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

**Estreptococos lácticos:** Los estreptococos lácticos mesófilos se encuentran actualmente clasificados como género *Lactococcus* (Leveau y Bouix, 1993).

Las bacterias lácticas heterofermentativas mesófilas que se encuentran en quesos de pasta blanda son: *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subesp. *diacetylactis* y en los de pasta cocida se encuentran bacterias termófilas como el: *Streptococcus salivarius* subesp. *termophilus* (Leveau y Bouix, 1993). La principal función de estas bacterias es la de transformar la lactosa en ácido láctico.

**Lactobacilos:** Son parte de la flora habitual de todos los quesos. Dentro de las especies mesófilas pueden citarse *Lactobacillus casei* subesp. *casei* y *Lactobacillus plantarum* que proceden de la contaminación de la leche y la cuajada; mientras que las especies termófilas (*Lactobacillus delbrueckii* subesp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*) (Leveau y Bouix, 1993) son aportados por los fermentos lácticos en los quesos de pasta cocida y contribuyen a la acidificación durante el prensado.

**Enterococos:** Tienen gran poder acidificante y se encuentran en todos los quesos. Son termorresistentes y tienen gran actividad proteolítica.

**Micrococos, estafilococos y especies afines:** Los micrococos están presentes en todos los quesos. La sal y las salmueras son las principales fuentes de micrococos. Intervienen en la evolución de las pastas por su actividad proteolítica.

Los estafilococos acompañan a los micrococos en la flora de algunos quesos como el Roquefort.

Las corynebacterias son utilizadas en la industria quesera; *Brevibacterium linens* intervienen en los procesos de maduración como el Brie, Munster, Tilsit.

**Otras bacterias:** Bacterias como *Propionibacterium shermanii* se multiplican en la pasta del queso debido a su carácter anaerobio. A partir del ácido láctico forman ácido propiónico, ácido acético, compuestos volátiles diversos y gas carbónico, responsable de la formación de ojos.

*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* son indeseables por su actividad lipolítica que puede conducir a sabores indeseables de los quesos (butírico). Los clostridios, si se encuentran en gran cantidad, producen el hinchamiento tardío de los quesos de pasta cocida.

**Levaduras:** Se encuentran en todos los quesos, principalmente en la superficie. Los géneros más frecuentes son *Saccharomyces*, *Cándida* y *Torulopsis*. Metabolizan el ácido láctico y por consiguiente producen desacidificación de las pastas. Algunas especies fermentan la lactosa con formación de alcohol. La mayoría de las levaduras secretan esterasas que producen acetato de etilo. Algunas especies por su poder proteolítico y lipolítico intervienen directamente en la maduración de la cuajada.

**Mohos:** En algunos quesos son agentes esenciales del afinado. En otros casos se produce el enmohecimiento superficial (*Geotrichum candidum*) al comienzo del afinado de los quesos de pasta blanda; luego el salado inhibe el crecimiento que influiría desfavorablemente por sus propiedades proteolíticas y lipolíticas.

### *Modo de acción de los microorganismos:*

Los microorganismos actúan:

- por excreción al medio de enzimas extracelulares
- por liberación de enzimas intracelulares debida a autolisis

Debido a la gran población microbiana presente en la cuajada resultante del proceso

de fabricación existen varios sistemas activos enzimáticos.

Muchos microorganismos desaparecen durante la maduración y la desintegración de las células genera múltiples enzimas que se suman a las ya existentes.

Los modos de degradación de los componentes de las pastas se revelan mediante el aislamiento de los sistemas enzimáticos microbianos. La producción de enzimas por una especie microbiana determinada es una característica de cada cepa y está sujeta a variaciones notables.

Las bacterias lácticas son nutricionalmente exigentes y tienen requerimientos complejos de aminoácidos. La concentración de aminoácidos libres en la leche no es suficiente para satisfacer estas necesidades, pero estas bacterias tienen sistemas proteolíticos que incluyen proteinasas y peptidasas que pueden hidrolizar las proteínas de la leche hasta aminoácidos. Las proteinasas del starter contribuyen poco a la formación de péptidos grandes siendo responsables de la formación de pequeños péptidos y aminoácidos libres (Zalazar, 1994). Las proteasas microbianas degradan los productos de la acción del coagulante sobre la caseína  $\alpha_{s1}$  mostrando una acción complementaria.

Las bacterias lácticas mesófilas han sido más estudiadas que las termófilas. En quesos duros el coagulante es casi totalmente desnaturalizado por el calor, pero la plasmina es muy activa y podría ser el mayor responsable de la proteólisis primaria de las caseínas; asimismo, el sistema proteolítico de las bacterias lácticas termófilas tendría participación en la formación de pequeños péptidos y aminoácidos.

Además de las bacterias lácticas en los quesos elaborados con leche cruda están presentes una gran variedad de microorganismos. En quesos de más largo período de maduración se observa una sucesión en los microorganismos predominantes que encuentran posibilidades de evolución y que producen las características organolépticas distintivas. Además de los lactobacilos y estreptococos contribuyen las bacterias propiónicas, los micrococos, enterococos y estafilococos.

Las bacterias propiónicas conducen a la formación de ácido propiónico, acético y dióxido de carbono a partir del ácido láctico, produciendo ojos en el queso y aromas particulares. Tienen asimismo una actividad lipolítica marcada pero su actividad caseinolítica no es importante.



Cepas no patógenas de micrococos y estafilococos han mostrado actividad en la degradación de las caseínas.

Los enterococos en general poseen una buena aptitud para acidificar la leche. Su presencia en distintos tipos de quesos, provenientes de la leche cruda o de los fermentos naturales utilizados puede llegar a ser significativa. El empleo de enterococos no sólo es aconsejado para lograr una adecuada acidificación sino para estimular otras bacterias lácticas.

Los quesos madurados con adición de hongos, tales como *P. roqueforti* o *P. caseicolum*, deben considerarse en forma particular por los cambios que se inducen en las grasas y en las proteínas. Estos dos tipos de hongos tienen sistemas proteolíticos muy potentes. El micelio de los mismos también contiene proteinasa y peptidasas intracelulares liberadas al medio cuando los hongos mueren y se lisan. La liberación de aminoácidos y la posterior desaminación de los mismos conduce a la formación de amoníaco, lo cual eleva el pH y otorga a los quesos sabor y aroma particulares.

Entre los sistemas enzimáticos puestos en evidencia, que tienen interés en el afinado, figuran las proteasas, lipasas, decarboxilasas, desaminasas, deshidrogenasas y fosfatasas.

**Proteasas:** Los microorganismos proteolíticos (mohos, levaduras, enterococos y micrococos) generan proteasas extracelulares. La actividad de dichas proteasas depende del pH óptimo para cada una. Las diferencias de pH óptimos sugiere que las proteasas fúngicas actúan al principio de la maduración cuando la pasta es ácida, mientras que las proteasas de los micrococos actúan al final cuando la pasta es casi alcalina. Las bacterias lácticas tienen enzimas proteolíticas intracelulares (pH óptimo 6-6.5) y probablemente son los principales implicados en la degradación de quesos de pasta firme.

Los lactobacilos también poseen proteasas intracelulares y generan proteasas extracelulares.

Las proteasas neutras suelen ser agregadas para acelerar la maduración (Law y Wigmore, 1982).

**Lipasas:** Los mohos y las levaduras, así como las bacterias psicrótrofas, micrococos y bacterias lácticas generan lipasas extra e intracelulares. La mayor parte de los estreptococos lácticos y lactobacilos tienen actividad lipásica escasa pero susceptible de intervenir de manera significativa en la degradación de grasas de las pastas.

**Otras enzimas:** Lactobacilos, bacterias coliformes, bacilos y clostridios poseen decarboxilasas que actúan sobre aminoácidos, participando en el afinado de las pastas blandas produciendo aminas y gas carbónico.

Estreptococos lácticos y lactobacilos producen desaminasas que actúan sobre los aminoácidos dando compuestos fenólicos y amoníaco que contribuyen al aroma de los quesos de pasta blanda.

### *Mecanismos bioquímicos de la maduración del queso*

La maduración implica la degradación de los componentes de la cuajada y la síntesis de nuevos componentes por acción de los microorganismos. Los productos de degradación pueden sufrir también transformaciones enzimáticas.

En los mecanismos bioquímicos del afinado ocurren tres procesos: la glicólisis, la lipólisis y la proteólisis.

### *Glicólisis*

La transformación de la lactosa en ácido láctico se realiza a través de las bacterias lácticas. La glicólisis comienza durante la coagulación y el desuerado y continúa durante la maduración con mayor o menor intensidad culminando con la desaparición casi completa de la lactosa en algunos quesos.

La formación de ácido láctico cumple un rol tecnológico de importancia ya que favorece el secado de la cuajada durante la cocción, actúa impidiendo la contaminación por microorganismos no casearios y en los quesos blandos genera un ambiente de bajo pH que favorece la acción proteolítica del coagulante. Prácticamente el 98% de la lactosa de la

leche se pierde en el desuerado ya sea como lactosa o ácido láctico. La lactosa que queda en la cuajada disminuye hasta desaparecer totalmente a las pocas horas desde su elaboración. El ácido láctico es neutralizado a lactato y su concentración sube durante el primer período en la cuajada y luego disminuye debido a su metabolización por distintas vías que dependen del tipo de queso. Mediante la glicólisis no sólo se origina ácido láctico sino también otros componentes responsables del aroma (etanol, gas carbónico, acetoína y diacetilo).

Otras bacterias, además de las lácticas, fermentan la lactosa en la cuajada. Las bacterias coliformes generan ácido láctico, butírico y acético, gas carbónico e hidrógeno.

Las levaduras originan alcohol etílico, acetaldehído, glicerol, ácidos orgánicos, gas carbónico, etc.

Las bacterias lácticas forman productos cetónicos que son los precursores de aromas en los quesos (aminoácidos, acetoínas, diacetilo y ácido acético).

### *Lipólisis*

La materia grasa juega un rol importante en las características químicas y fisicoquímicas del queso. Está compuesta fundamentalmente por triglicéridos y debido a la acción hidrolítica de ciertas enzimas se desdobla en glicerol y ácidos grasos libres los que a su vez se convierten en otros productos.

Los ácidos grasos liberados y sus productos de transformación influyen en el perfil organoléptico del queso. El grado de lipólisis varía con el tipo de queso.

Las lipasas responsables de la hidrólisis de las grasas pueden tener distinto origen. Las naturales o constitutivas de la leche son de dos tipos, la mayor o plasmática asociada a la micela caseínica y la de membrana asociada al glóbulo graso; sin embargo estas lipasa no tienen gran interés en la maduración de los quesos elaborados con leche pasteurizada ya que se inactivan por tratamientos térmicos.

Tampoco se puede atribuir a las lipasa aportada por los coagulantes un rol trascendente en la lipólisis ya, que los coagulantes de origen bovino o microbiano han alcanzado una pureza tal que se excluyen de su composición las lipasas.

Las bacterias psicrótrofas de contaminación son muy lipolíticas y elaboran enzimas muy termoresistentes que pueden alterar las características organolépticas del queso.

Las lipasas fúngicas producen en cambio modificaciones deseables y en general controladas; los hongos que las originan son agregados especialmente para obtener variedades particulares de queso.

La lipólisis no siempre es el origen de los ácidos grasos libres; la degradación de la lactosa es la fuente de los ácidos acético y propiónico y la proteólisis es el origen de acético, propiónico y ácidos volátiles ramificados como isobutírico, isovaleriánico e isocaproico.

### *Proteólisis*

Las proteínas y especialmente la caseína, constituyen los componentes que juegan el rol más importante en la maduración de los quesos. Por acción del cuajo, la caseína pasa a para-caseína, lo que constituye el principio del conjunto de transformaciones causadas por acción de las enzimas de procedencia microbiana y las aportadas por el cuajo y la leche cruda.

Durante la maduración, la mayoría de las proteasas actúan sobre la  $\alpha_{s1}$  caseína hidrolizándola. Aunque casi siempre la  $\alpha_{s1}$  caseína es la primera en ser hidrolizada y generalmente es la más extensamente degradada, también la  $\beta$  caseína puede sufrir el ataque de las proteasas y peptidasas dando polipéptidos que luego son degradados formando péptidos o aminoácidos de menor peso molecular.

Estos cambios producidos sobre las  $\alpha$  y  $\beta$  caseínas pueden ser definidos como una proteólisis primaria, principalmente debida a la acción de las proteasas del cuajo y de las nativas de la leche; mientras que las enzimas de los fermentos lácticos tienen mayor importancia en la fase secundaria de la proteólisis, liberando péptidos y aminoácidos que son solubles en la fase acuosa del queso. La importancia de esta fracción soluble en agua es la de constituir un conjunto de compuestos precursores para el desarrollo del flavor (Visser, 1981; Rank y col., 1985; Lawrence y col., 1987).

En queso hay que considerar como medio la matriz compacta de caseína, entonces

el estado inmovilizado de las enzimas del cultivo iniciador sigue manteniéndose durante la maduración por períodos prolongados, sin migrar al medio. Por ello el efecto proteolítico tiene lugar, a causa de estas enzimas, durante la maduración (Thomas y Pritchard, 1987).

Durante la maduración no toda la caseína es degradada. En las pastas blandas más afinadas, menos del 35-45 % del nitrógeno total se encuentra como nitrógeno no caseínico.

La gran variedad de productos que se acumulan en la pasta durante la maduración (proteasas, péptidos, aminoácidos, aminos, amoníaco, sulfuro de hidrógeno, ácidos volátiles, aldehidos, cetonas, etc) se deben a la complejidad bioquímica de las sustancias nitrogenadas del queso, a los muchos agentes proteolíticos presentes y a la gran cantidad de vías metabólicas que el proceso degradativo puede seguir.

### *Factores condicionantes de la maduración*

Los factores que regulan la maduración son la aireación, la humedad, la temperatura, el contenido de sal y el pH.

*Aireación:* permite asegurar las necesidades de oxígeno de la flora superficial de los quesos: mohos, levaduras, micrococos, etc.

*Humedad:* favorece el desarrollo microbiano. Las pastas de quesos blandos se maduran rápidamente mientras que las pastas de quesos de pasta cocida lo hacen lentamente. La humedad relativa del medio regula el agua libre necesaria para el desarrollo de los microorganismos. Algunos gérmenes satisfacen sus necesidades a niveles bajos de actividad acuosa, por lo cual se desarrollan en medios salados, con presión osmótica elevada.

*Temperatura:* regula el desarrollo microbiano y la actividad enzimática. Los microorganismos de la flora superficial de los quesos tienen un desarrollo óptimo entre 20 y 25°C; las bacterias lácticas proliferan más rápidamente a 30-35°C si son mesófilas (*Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, *Leuconostoc*

*citrovorum*) y a 40-45°C si son termófilas (*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*)

La temperatura óptima no es la misma para el desarrollo de bacterias, para la actividad enzimática y para la producción de las enzimas.

En la práctica industrial el afinado de las pastas se realiza a una temperatura muy inferior a la temperatura óptima de actividad enzimática (7 a 10 °C para pastas blandas, 10 a 12°C para pastas prensadas, 12 a 13°C en la cava fría y luego 16 a 20°C en la cava caliente para pastas cocidas).

Está demostrado que la hidrólisis de la  $\alpha_{s1}$  caseína disminuye a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento de los quesos, aunque no muy marcadamente. Sin embargo es importante la hidrólisis de la  $\beta$  caseína con la disminución de la temperatura. Ya que la  $\alpha_{s1}$  caseína es el elemento estructural más importante en la fabricación del queso, esto explicaría que almacenando entre 2 y 10°C los cambios de textura no sean excesivamente diferentes (de Jong, 1978). Un aumento en las temperaturas de almacenamiento, cuando se trata de temperaturas de alrededor de 10°C, tiene un efecto significativo en los cambios de textura, aunque no tan grandes como el efecto en el desarrollo del sabor. A mayores temperaturas, los cambios más grandes son en la hidrólisis de las proteínas y por consiguiente en los cambios de la textura. Estudios en queso Cheddar mostraron que el desarrollo de la textura, para una temperatura de almacenamiento de 8°C y un tiempo de almacenamiento de 16 semanas era equivalente al que correspondía a una temperatura de almacenamiento de 15°C durante ocho semanas (Fedrich y Dulley, 1984).

**Contenido de sal:** regula la actividad del agua en la pasta y produce así una selección de microorganismos.

El contenido de sal referido a la fase acuosa en la que está disuelto es de alrededor de 4-5%, cantidad suficiente para inhibir el desarrollo de la mayoría de las bacterias lácticas. Sin embargo se constata que se mantiene una flora predominantemente láctica, probablemente porque algunos microorganismos proteolíticos (estafilococos, micrococos y enterococos) incrementan la resistencia a la sal de las bacterias lácticas.

A altas concentraciones de sal y a altas temperaturas, la hidrólisis de las  $\beta$  caseínas por acción de la quimosina se ve fuertemente retrasada, probablemente por asociación hidrofóbica de las moléculas de sustrato. La  $\alpha_{s1}$  caseína es mucho menos afectada por la concentración de sal, sus moléculas no se asocian y entonces la ruptura inducida por el cuajo sobre las  $\alpha_{s1}$  caseínas procede con mayor rapidez que sobre las  $\beta$  caseínas.

La proteólisis en quesos durante la maduración se ve muy afectada por la relación sal/humedad. Está demostrado que para un tiempo de maduración de 28 días a 10°C, para queso Cheddar, cuando éste tiene una relación sal/humedad del 4%, el 5% de la  $\alpha_{s1}$  caseína y el 50% de la  $\beta$  caseína permanecen intactas. Cuando la relación es del 6%, el 30% de la  $\alpha_{s1}$  caseína y el 80% de la  $\beta$  caseína permanecen sin modificarse. Cuando la relación sal/humedad es del 8%, el 60% de las  $\alpha_{s1}$  caseína y el 95% de la  $\beta$  caseína permanecen sin hidrolizar (Thomas y Pearce, 1981).

*pH*: gobierna la multiplicación de los gérmenes y sus actividades bioquímicas. Mohos y levaduras se desarrollan en medios ácidos (pH 4.5 o menores). Las bacterias se desarrollan en medios neutros y se inhiben a pH menor de 5, aunque los lactobacilos soportan pH de 3.5. El pH es un condicionante del desarrollo microbiano y a la vez un resultado del mismo.

La distribución de la quimosina en la cuajada y en el suero es pH dependiente (Holmes y col., 1977). Sin embargo la distribución de cuajo microbiano entre cuajada y suero no depende del pH. La cantidad de  $\alpha_{s1}$  caseína del queso que se hidroliza es prácticamente la misma, independientemente del pH inicial de la leche.

Durante el drenado la mayor parte del coagulante se pierde con el suero; pero el coagulante retenido en la cuajada depende del pH y de la proporción de suero retenido. Si se baja el pH de la cuajada por adición de ácido, la mayor parte del cuajo es retenido en la cuajada y la mayor proporción de la  $\alpha_{s1}$  caseína es hidrolizada por la quimosina del cuajo bovino.

Es adecuado frenar el desarrollo de la acidificación lavando los granos de la cuajada, disminuyendo así el contenido de lactosa residual o mediante la cocción de los granos que permiten un desuerado intenso.

### **1-5 Aroma y sabor en quesos.**

El desarrollo del "flavor" (aroma y sabor) es sumamente importante para la aceptabilidad de los quesos. El flavor del queso se atribuye a una mezcla compleja de compuestos químicos aromáticos, volátiles y no volátiles. Son importantes los metabolitos producidos a través de la fermentación de la lactosa, los productos de la proteólisis y los de la lipólisis. Los perfiles de sabor de los quesos son complejos y variables dependiendo de qué tipo de queso se trate. Estos perfiles se ven influenciados por muchas sustancias: ácidos orgánicos, compuestos sulfurados, aminoácidos libres, lactonas, metil cetonas, alcoholes, sustancias fenólicas, etc (Seitz, 1990; Urbach, 1993).

La acción residual de enzimas coagulantes de la leche, proteinasas de la leche y proteinasas del cultivo iniciador proveen un sustrato adecuado para las peptidasas, que en última instancia generan pequeños péptidos y aminoácidos (Visser y col., 1975; Law, 1982; Thomas y Pritchard, 1987; Exterkate y col., 1992).

La actividad microbiana del cultivo iniciador residual en el queso, como así también de la flora propia durante la etapa de maduración influyen en el aroma y sabor del queso (Gilles y Lawrence, 1973; Lawrence y col., 1983, 1984; Grazier y col., 1991, 1993).

Los aminoácidos libres influyen en el aroma de los quesos y al conjunto de ellos se le atribuye el "aroma de fondo" de los quesos madurados. Se ha informado la existencia de una relación definida entre el aroma del queso y la concentración de determinados aminoácidos libres como la tirosina, triptofano, prolina y ácido glutámico. La proteólisis de la caseína no termina en los aminoácidos. Algunos de ellos se encuentran en mayor proporción en los quesos que en la leche y otros nuevos aparecen. También se detecta la presencia de aminos no volátiles o de amoníaco libre.

La idea de que los aminoácidos libres y sus productos de descomposición pueden ser importantes en la formación del flavor del queso fue aceptada hace años (Malder, 1952; Marth, 1963). El contenido de nitrógeno amínico refleja la cantidad de aminoácidos libres y pequeños péptidos presentes en el queso.

Defectos desagradables del flavor se manifiestan durante la maduración de quesos



cuando se inhibe la degradación, por parte de las peptidasas bacterianas, de péptidos amargos originados a partir de las  $\beta$  caseínas que se acumularon lentamente. El sustrato específico de las proteinasas del cultivo iniciador particular determina la cantidad de péptidos desfavorables formados. Una vez formados estos péptidos pueden ser degradados por una acción secuencial por los varios tipos de peptidasas presentes y el flavor de los quesos puede ser generado en forma posterior por la conversión no proteolítica de aminoácidos por vía enzimática y no enzimática ( Reiter y col., 1969; Stadhouders y Hup 1975; O'Keefe y col., 1976; Law y Sharpe, 1977; Desmazeaud y Gripon, 1977; Lawrence y col., 1983; Lee y col., 1990).

La degradación de los aminoácidos puede tener lugar por los pasos de la vía enzimática (Law, 1987). Los tipos de enzimas que se incluyen en cada reacción involucran desaminasas, decarboxilasas, transaminasas y enzimas que convierten las cadenas laterales de los aminoácidos. Ya que los productos formados son aminas,  $\alpha$ -cetoácidos y otros aminoácidos que pueden convertirse en aldehídos y después de una reducción y/u oxidación en alcoholes y ácidos, el flavor particular del queso puede ser vinculado con la conversión de sólo un número limitado de aminoácidos. Se deben considerar aquellos aminoácidos disponibles como sustratos.

Los ácidos grasos son elementos esenciales para el sabor y el olor. Las diferentes proporciones de estos ácidos en las distintas variedades de quesos les confieren los sabores y aromas característicos. Los ácidos grasos de cadena corta ( $C_4$  a  $C_{10}$ ) se asocian con la actividad lipolítica de las bacterias (Green y Manning, 1982; Singh y Kristoffersen, 1970).

La lipólisis genera la formación de ácidos grasos libres pero existen ácidos como el propiónico que es generado a partir de ácido láctico por bacterias propiónicas; asimismo el ácido butírico puede originarse no sólo de la grasa sino también a partir de la proteólisis y posterior desaminación de la caseína.

De una manera general se puede establecer que la presencia de ácidos grasos libres de cadena corta en queso, tales como acético, propiónico y butírico está relacionada con la intensidad de la fermentación bacteriana que ha ocurrido durante la maduración. La presencia de ácidos grasos libres de peso molecular medio y alto se asocia con la lipólisis de la grasa y si son volátiles de cadena ramificada se puede inferir una importante

degradación proteolítica de las caseínas.

Algunas enzimas derivadas de los cultivos utilizados como iniciadores y otras pertenecientes a la flora secundaria introducida durante la manufactura del queso, son responsables de los cambios químicos (Bhowmik y Marth, 1990). El metabolismo heterofermentativo de la lactosa, por acción de la flora del cultivo no iniciador, da como resultado, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético y etanol (Law, 1984).

El pH de un queso juega un papel particular en el desarrollo del tipo de flora del queso y esto hace que los componentes químicos sean diferentes en calidad y cantidad, dando diferentes características de flavor. Esto está ligado, en los quesos duros y semiduros con la desnaturalización proteica (Adda y col., 1982).

Altas temperaturas de almacenamiento llevan a la producción de sabores no característicos (Aston y col., 1985). Estas temperaturas favorecen la muerte de las bacterias del cultivo iniciador, antes de completar la utilización de la lactosa (Grazier y col., 1991, 1993).

El cultivo iniciador no es inhibido totalmente por los procesos de salado y puede entonces metabolizar la lactosa (Lawrence y col., 1984). El cultivo no iniciador también puede afectar la velocidad del metabolismo de la lactosa. La fermentación de la lactosa residual por ambos cultivos se asocia con el flavor desarrollado (Fryer, 1982).

Los lactobacilos heterofermentativos metabolizan el citrato o inducen la actividad de la enzima oxidasa que actúa sobre el NADH dando ácido acético, etanol y otros compuestos carbonílicos (Aston y Dulley, 1982; Laleye y col., 1990). La desaparición de citrato puede suceder por más de un camino: algunos microorganismos como *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* y *L. brevis* utilizan citrato como fuente de energía en ausencia de carbohidratos. El citrato es convertido a piruvato y luego usado para generar los componentes celulares. El ácido acético que se produce a través del citrato puede dar una indicación del grado de metabolismo heterofermentativo de la lactosa. La producción de ácido propiónico se atribuye a contaminación de la flora no iniciadora (Whitehead y col., 1993). Otra posibilidad es la producción de propiónico a partir de los aminoácidos de la caseína lo cual sería una fuente importante de ácidos grasos volátiles (acético a caproico) (Nakae y Elliot 1965; Dulley y Grieve, 1974). Las lipasas intracelulares,

excretadas durante la muerte de las bacterias del cultivo iniciador, con un aumento de la temperatura, hace que se espere una mayor concentración de butírico (Grazier y col., 1991, 1993).

Por otra parte los quesos duros Romano, Provolone y Parmesano tienen un agudo flavor picante debido a altos niveles de ácidos orgánicos de cadena corta, especialmente butírico (Guinee y Fox, 1987).

Compuestos derivados de las meticetonas tienen destacada participación en el aroma y sabor de los quesos, especialmente en los elaborados con hongos.

Los aldehidos y cetonas, compuestos con grupos carbonílicos, tienen un papel específico. También los compuestos sulfurados tienen importancia.

### **1-6 Textura en quesos**

La textura de los quesos es una importante propiedad por la cual el consumidor identifica la variedad específica de un queso. Además, según las diferentes variedades de quesos en estudio, estas cualidades son propias y distintas.

Todos los quesos tienen como componentes mayoritarios caseína, grasa y agua que contribuyen a la estructura de los mismos y por consiguiente a las propiedades reológicas. Las caseínas forman una malla en la cual atrapan a la grasa que en origen son los glóbulos de grasa de la leche. El agua, que normalmente contiene las sales disueltas que fueron agregadas en el curso de la manufactura, está parcialmente ligada a las proteínas rellenando los intersticios entre la matriz de caseína y la grasa. Esta estructura es la misma para todos los quesos. La variación en esta estructura está producida por las variaciones en los procesos particulares de manufactura, que dan las diferencias entre los distintos quesos.

La naturaleza sólida del queso está determinada principalmente por las caseínas. La estructura primaria está dada por una celda tridimensional cuyos lados consisten en cadenas de moléculas de caseína. Esta estructura es la que le confiere rigidez. Las cadenas no son lineales pero tienen una estructura semejante a un tornillo helicoidal. Esto le da cierta elasticidad que modifica la rigidez de la celda.

Durante la coagulación estas cadenas se han formado en el suero alrededor de los glóbulos grasos de la leche, de manera que inicialmente encierren al menos un glóbulo de grasa. El tamaño y la distribución de tamaños de estas celdas está controlada por los glóbulos grasos. Es así que el queso consiste en un agregado de estas celdas caseínicas más grasa, bañadas por la salmuera (Fox, 1987).

Si se aplica una fuerza a esta estructura matricial, la rigidez de la celda y la elasticidad de sus partes estructurales controlarán la deformación. En ausencia de grasa y salmuera se esperaría un comportamiento similar a cualquier otra estructura abierta, un sólido relativamente blando cuya deformación estaría caracterizada por un único módulo de elasticidad. Sin embargo, la presencia de grasa limita la deformación. A bajas temperaturas la grasa dará mayor rigidez. A las temperaturas de maduración de quesos la grasa se comporta como un material plástico. Cualquier deformación de la matriz caseínica requerirá que la grasa se deforme también. Al mismo tiempo el movimiento de la caseína con respecto a la grasa es lubricado por la salmuera. Como resultado la rigidez de la grasa se suma a la de la caseína de una forma compleja, exhibiendo características viscoelásticas.

La masa total del queso consiste en un agregado de los gránulos obtenidos durante el lirado. Esto forma una estructura secundaria con propiedades reológicas propias, que pueden ser modificadas durante el prensado, definiéndose una estructura terciaria. Esta estructura básica puede ser modificada durante la maduración tanto por los tratamientos mecánicos y térmicos como por la acción bacteriana y enzimática. Como resultado de todo esto, la estructura proteica puede modificarse, los glóbulos de grasa contiguos coalescen y se puede perder agua por evaporación en la superficie.

No es posible considerar aisladamente la contribución de cada constituyente a las propiedades reológicas del queso, es su interacción la que produce la viscoelasticidad. Sin embargo es posible examinar algunas de las particularidades con cada uno de los constituyentes mayoritarios. Si consideramos la caseína, es ella la que le da al queso su aspecto sólido. Dado que las cadenas caseínicas se forman dentro de los espacios que quedan entre los glóbulos de grasa, debe necesariamente existir una cantidad mínima de caseína por debajo de la cual no se puede formar una red continua. Por encima de esta cantidad la caseína adicional servirá para fortificar las ramas y uniones. Es de esperar

entonces que exista una relación general entre la cantidad de caseína presente en el queso y su firmeza. En contraste con la caseína, la grasa es reológicamente muy sensible a los cambios de temperatura y por lo tanto impartirá esta sensibilidad al queso. A 5°C muchos de los triglicéridos de la grasa de la leche son sólidos. A medida que aumenta la temperatura la proporción de grasa sólida disminuye. Esta disminución es muy marcada entre 12 y 15°C, que corresponde a la temperatura de maduración y almacenamiento de quesos duros. A 35°C la grasa se encuentra prácticamente líquida, siendo esta la temperatura que tendrá una porción de queso al ser masticada.

El agua, o más estrictamente el contenido de salmuera del queso, influye en la firmeza del mismo. Actúa como lubricante de baja viscosidad entre las superficies de la grasa y la caseína. A mayor contenido acuoso, y consecuentemente mayores espacios disponibles para que el agua fluya, habrá menor impedimento para el movimiento de la celda proteica alrededor de la grasa encerrada. Este movimiento más libre se manifiesta como una menor resistencia global a la deformación y como una mayor facilidad para recobrase después de haber sido deformado (Fox, 1987).

Existen buenas correlaciones entre firmeza de un queso y la cantidad intacta de  $\alpha_{s1}$  caseína en el queso (de Jong, 1976). Debido a que la hidrólisis de pequeñas fracciones de  $\alpha_{s1}$  caseína dan, por la acción del cuajo, péptidos, resulta un debilitamiento general de la red caseínica. Esto es concordante con el hecho que los productos de ruptura de las caseínas son muy solubles en agua y no pueden contribuir a la matriz proteica (Walstra y van Vliet, 1982). Existe otro aspecto importante de la proteólisis: como cada puente peptídico está anclado se generan dos nuevos grupos iónicos y cada uno de ellos puede competir con el agua disponible en el sistema. Entonces, el agua previamente disponible para la solvatación de las cadenas proteicas puede verse restringida por los nuevos grupos iónicos (Matheson, 1981). Bertola y col. (1991, 1992) estudiaron la degradación de caseínas por electroforesis y la compararon con los parámetros reológicos y viscoelásticos obtenidos con el test de compresión uniaxial y con ensayos de relajación en quesos Tybo Argentino y Port Salut, observándose una fuerte correlación entre los estudios texturales y químicos que reafirman los efectos de la proteólisis sobre la textura del queso. Tunick y col. (1991), a través de análisis electroforéticos de muestras de queso Mozzarella de bajo

contenido graso y alta humedad, relacionaron la proteólisis ocurrida durante el almacenamiento refrigerado de las mismas a 4°C con los cambios texturales observados mediante un análisis de perfil de textura.

### *Evaluación de la textura instrumental*

Otro aspecto importante que hace a la maduración de los quesos, resultado de todas las transformaciones fisicoquímicas producidas, es la evaluación de la textura utilizando ensayos de fuerza-deformación. La velocidad a la cual la muestra es deformada es una variable a tener en cuenta en los ensayos fuerza-deformación ya que produce curvas mejor definidas cuando sus valores son bajos (Vernon-Carter y Sherman, 1978). Cambios de velocidad de 1 a 100 mm min<sup>-1</sup> incrementan ligeramente la fuerza de compresión. La temperatura a la cual se encuentre la muestra también tiene influencia sobre la dureza y fuerza en el punto de ruptura que disminuyen a medida que la temperatura aumenta, razón por la cual se hace necesario fijarla y mantenerla constante en los distintos ensayos (Lee y col., 1978).

La otra variable a considerar es la relación de compresión. Es la variable más importante respecto de la variación en la respuesta mecánica del queso cuando es comprimido. La dureza aumenta rápidamente cuando se comprime la muestra más del 60% (Imoto y col., 1979).

Los ensayos de relajación consisten en someter al alimento a una deformación constante y analizar la variación de tensión durante un tiempo determinado.

### **1-7 Maduración en películas plásticas**

Se han realizado muchos estudios para medir y predecir el curso de la maduración de los quesos monitoreando la proteólisis y parámetros químicos objetivos (Barlow y col., 1989; Christensen y col., 1989; Humbert y col., 1990; Ollikainen, 1990; Cliffe y Law, 1991).

Uno de los procesos tecnológicos que modifican la maduración tradicional es la

utilización de películas plásticas de permeabilidad gaseosa y al vapor de agua controladas.

### *Envasado en películas plásticas flexibles*

El envasado con películas implica casi siempre la combinación de envasado al vacío y de películas capaces de poder encogerse luego del envasado, por aplicación de altas temperatura. Se observó una excelente estabilidad con la utilización de esta técnica de envasado, para todo tipo de quesos, además de permitir un manejo correcto de los mismos. Las películas que encogen con el calor son adecuadas para quesos de formas irregulares y para quesos blandos también, a pesar de que los materiales de empaque suelen ser más caros.

Durante la maduración tradicional los quesos sin ningún tipo de envase se almacenan en cámaras bajo condiciones controladas. El agua se evapora desde la superficie del queso y se forma la corteza del mismo. Usualmente se desarrollan hongos sobre la superficie y para removerlos se hace necesario el raspado y/o el cepillado y en algunos casos se utiliza el lavado con agua. Todas estas operaciones producen pérdidas significativas.

Frecuentemente quesos con largos períodos de almacenamiento presentan problemas secundarios como color, desarrollo de aromas no característicos y sabores amargos. La oxidación e hidrólisis de las grasas conduce a productos oxidantes, a la formación de ácidos grasos libres y al oscurecimiento del queso (Scott, 1981; Topal, 1991).

Cuando el período de maduración es completado los quesos son cubiertos con pastas especiales o con distintos films; las pastas para cubrir pueden ser ceras, parafinas, etc, y los films son películas de materiales plásticos (Gudkow y col., 1980).

La maduración en película bajo condiciones de envasado al vacío, y en films de bajas permeabilidades gaseosas fue adoptada en los últimos años (Hakkaraien, 1978). Los quesos madurados de esta manera no poseen corteza ya que no se produce la evaporación del agua desde la superficie. Los materiales plásticos utilizados poseen características físicas y mecánicas específicas. El envasado al vacío de quesos madurados por largos períodos de tiempo ha sido aplicado a muchas variedades de quesos como Cheddar, Edam,

Emmenthal, Gouda, Grana Padano, Manchego, Port-Salut, Tybo, etc. (Massoni y col., 1985; Nuñez y col., 1986; Bertola y col., 1991, 1992). En nuestro país es una técnica aún no aplicada ampliamente, excepto para algunos quesos blandos de cortos períodos de maduración, pero sí se aplica en otros países del mundo aún sobre quesos duros.

Los materiales de envasado impiden el contacto entre el queso y el oxígeno del aire y previenen el desarrollo de hongos en la superficie, al mismo tiempo que permiten que el dióxido de carbono y otros gases permeen a través de la película, impidiendo así que el envase se hinche. Las propiedades de barrera de las películas de envase protegen al queso de ser contaminado con los aromas de otros productos.

El deterioro de los quesos puede ser causado por varios factores: la calidad de la leche utilizada para la elaboración, el estado sanitario de la planta de elaboración, los procedimientos de manufactura y envasado, la manipulación y las prácticas de almacenamiento. Cabe aclarar que la mayoría de los quesos no tiene agregados de conservadores ni tratamientos térmicos para el control de mohos, si bien en algunos casos la extensión de la vida útil se obtiene por aplicación de algún tratamiento de pasteurización o por el agregado de algún agente antimicótico (Chandan, 1982).

En quesos con un embalaje adecuado se puede disminuir los daños producidos por procesos de oxidación que determinan cambios de color y flavor, y además se protege al queso de la pérdida de agua. Los quesos envasados en plástico no forman corteza en su periferia por lo que existe mucha disponibilidad de agua y de nutrientes que favorecerían el crecimiento de hongos, siempre y cuando hubiese suficiente cantidad de oxígeno disponible; con lo cual es importante la elección de la película respecto de su permeabilidad a los diferentes gases, más aún recordando que los hongos, contrariamente a la mayoría de las bacterias, pueden crecer en amplios rangos de pH y a temperaturas normales de refrigeración.

Para la mayoría de las variedades de quesos la principal causa de deterioro es el crecimiento de mohos indeseables. El envasado al vacío es una de las técnicas utilizadas para excluir el oxígeno y evitar así la oxidación y prevenir el desarrollo de hongos.

Existen distintos tipos de películas adaptables a los diferentes quesos, con distintas permeabilidades para controlar el pasaje de oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua.



Las películas de envasado no deben ser atacadas químicamente por el agua o el suero de la fabricación y deben mantener su resistencia mecánica en presencia de agua. Además no deben transferir a los quesos ninguna sustancia extraña que modifique el flavor o cause perjuicio a la salud del consumidor. La permeabilidad al vapor de agua determina la pérdida de peso durante el almacenamiento. Cuando se utilizan películas de baja permeabilidad al vapor de agua la distribución del agua es uniforme en las capas externas e internas del queso; la humedad prácticamente no se reduce durante la maduración y almacenamiento. Las películas que se pueden encoger por calor permiten un excelente contacto entre ellas y el cuerpo del queso, quedando el envase con un mínimo contenido de oxígeno. Cuando se envasan quesos muy blandos o de dimensiones no uniformes en estas películas que se encogen por calor, no quedan espacios disponibles para el oxígeno.

Si se utilizan películas de baja permeabilidad a gases la concentración de oxígeno dentro del paquete puede disminuir debido a la evolución de los gases durante la maduración del queso. La concentración de oxígeno baja rápidamente después de los primeros días de almacenamiento, mientras que la concentración de dióxido de carbono aumenta en ciertos tipos de quesos; la película debe permitir el pasaje de CO<sub>2</sub> y de otros gases innecesarios para evitar la hinchazón de la bolsa. No existe crecimiento de hongos cuando la concentración de oxígeno es menor del 2% (Chandan, 1982).

Las condiciones mecánicas que debe reunir la película son la dilatabilidad, la resistencia a la rotura y a los desgarros y , en las que son compuestas, la adherencia entre las distintas capas. También es importante considerar el comportamiento de la película respecto de la temperatura, ya que de él depende el cierre de los envases por soldadura o sellado y la termocontracción. La celulosa regenerada, poliéster y los copolímeros de cloruro de vinilo y vinilideno deben ser recubiertos con polímeros especiales antes de ser termoselladas.

La variedad de quesos y las condiciones de almacenamiento afectan las necesidades de barrera que tenga que tener la película. Las películas modernas de envasado proveen una buena barrera al vapor de agua. El procedimiento de encerado, en una maduración tradicional, hace que los quesos tengan una corteza protectora, producto de la deshidratación superficial. Esta corteza debe luego contabilizarse para el consumidor como

una pérdida de peso que se desecha, situación que no se produce con los quesos envasados en películas plásticas.

### **1-8 Congelación**

Otro proceso tecnológico utilizado para la conservación del queso y la prolongación de su vida útil es la aplicación de temperaturas de congelación. La congelación es un método efectivo para la conservación del color, flavor y valores nutritivos de los quesos.

A pesar de que la congelación es un proceso adecuado y aceptado universalmente a los fines de extender la vida útil de los alimentos, algunos productos como los quesos presentan varios problemas en la aplicación de este procedimiento. Autores como Fennema (1972) señalaron los daños que pueden presentarse en los quesos durante la congelación. Los daños producidos por la congelación y la modificación de las propiedades físicas dependen del tipo de queso, de su composición y procedimiento para su fabricación, de las condiciones de congelación, del tiempo de maduración del producto antes y después de la congelación y de los parámetros elegidos para evaluar el daño. Las características estacionales de la producción lechera y la inestabilidad de las propiedades físicas hacen necesaria la congelación de algunos quesos, como el Mozzarella, justo después de la manufactura a los fines de detener la maduración y prolongar la vida útil durante la comercialización (Alvarez, 1986; Kosikowski, 1982; Webb, 1977; Diefes, 1993). El queso Mozzarella puede ser congelado en bloques o puede ser cortado antes de la maduración para disminuir el tiempo de congelación y facilitar el uso cuando es descongelado (Oberg y col., 1992 ). La congelación, el almacenamiento y la descongelación pueden afectar significativamente la extensibilidad y la fundibilidad de este tipo de queso. Estas propiedades podrían usarse según sean las velocidades de congelación y el tiempo que se deje madurar. Fennema (1972) señaló la falta de unanimidad respecto del daño causado por la congelación sobre los quesos. Luck (1977) concluyó que el almacenamiento congelado fue favorable para quesos cremosos, Camembert no madurado y quesos duros, pero no para Gouda o Cheddar. Estos autores demostraron que los cambios texturales que ocurren como resultado de los ciclos de congelación-descongelación

pueden ser controlados en cierta medida por una combinación favorable entre concentración salina y tiempo de almacenamiento. Filchakova y col. (1983) estudiaron la microestructura de quesos Tvorog durante la congelación. Estos autores concluyeron que si la congelación es rápida, con una velocidad de congelación uniforme, no se producen cambios significativos en las propiedades de la matriz proteica. La integridad de la textura de los quesos se preserva debido a una cristalización uniforme del hielo y por consiguiente se tiene una menor influencia en los elementos estructurales individuales. Oberg y col. (1992) encontraron que los quesos Mozzarella congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  funden más después del almacenamiento congelado que aquellos congelados a  $-196^{\circ}\text{C}$  y luego almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; se observó que la extensibilidad, no obstante no era afectada por las temperaturas de congelación. Según Martín-Hernández y col. (1988) es de esperar que un queso que durante la congelación y conservación hayan alterado su estructura y el grado de agregación de las proteínas y durante la maduración posterior presente una proteólisis media o intensa, dé como resultado un producto similar al no congelado respecto de la textura. El tipo de queso, además de la congelación, afectará de forma notable las características del producto final. Alonso y col. (1987) trabajando en queso Cabrales concluyeron que no existían diferencias entre los quesos madurados en forma tradicional y los quesos congelados respecto de la composición química en general y los componentes grasos. Las variables estudiadas para el seguimiento de la proteólisis mostraron una leve pero significativa disminución en los quesos congelados, sin embargo la dureza y los atributos sensoriales eran comparables para los quesos congelados y los no congelados.

### **1.9 Objetivos**

Los objetivos de este trabajo de tesis abarcan dos aspectos tendientes al mejoramiento de la maduración de los quesos y de la preservación de la vida útil de los mismos.

El primer aspecto se refiere a la aplicación de películas plásticas sobre quesos duros, de alto valor comercial y cuya merma en producto, por formación de hongos y rascado de la superficie, representa una pérdida económica considerable.

Al respecto, los objetivos de esta parte del trabajo son:

- a) Analizar el efecto de las películas plásticas sobre la velocidad de degradación proteica y los cambios en la textura durante la maduración del queso Reggianito Argentino.
- b) Comparar los resultados de la maduración en película con los de la maduración tradicional.
- c) Modelar las relaciones entre los parámetros reológicos vs. el porcentaje de nitrógeno soluble en agua y el contenido de humedad.
- d) Estudiar el efecto del envasado al vacío sobre los cambios en el contenido de ácidos orgánicos (fórmico, pirúvico, orótico, láctico, acético, cítrico, úrico, propiónico y butírico) y de lactosa durante la maduración del queso Reggianito.
- e) Aplicar un análisis de discriminantes a los datos de concentración de ácidos orgánicos obtenidos por cromatografía líquida de alta presión, a los fines de analizar si los quesos pueden ser clasificados según su edad de maduración, a través del contenido de los ácidos orgánicos.

El segundo aspecto analizado se refiere a la utilización de temperaturas de congelación para alargar la vida útil de quesos de pasta hilada (Mozzarella), cuya vida promedio a temperatura ambiente abarca cortos períodos de tiempo.

Los objetivos en este caso fueron:

- a) Evaluar el efecto del tiempo de maduración en la evolución de la textura y producción de ácidos orgánicos en quesos refrigerados.
- b) Someter muestras a procesos de congelación y compararlas con muestras refrigeradas.

- c) Caracterizar las muestras según el efecto del tiempo previo de maduración a 4°C antes de la congelación a -20°C.
- d) Estudiar las propiedades funcionales del queso fundido (fundibilidad, viscosidad aparente, formación de aceite liberado) y del queso no fundido (análisis del perfil de textura) para quesos congelados y no congelados.
- e) Evaluar el efecto de las velocidades de congelación. El análisis de las velocidades de congelación, que sean tecnológicamente posibles, podría resultar de importancia en la elección de un proceso industrial apropiado.
- f) Analizar la posibilidad de completar el período de maduración luego de la descongelación, a los fines de decidir si la congelación afecta la capacidad de los quesos para alcanzar la calidad deseada.
- g) Evaluar el efecto de la duración del almacenamiento congelado (a -20°C) sobre las propiedades funcionales y la proteólisis del queso y comparar los resultados de esta evaluación con los de los quesos no congelados, de igual tiempo de maduración a 4°C (controles). Este objetivo tiene como fin diferenciar el efecto de la congelación en sí misma del efecto causado por el almacenamiento congelado.
- h) Estudiar los cambios producidos en los contenidos de ácidos orgánicos (fórmico, acético, pirúvico, propiónico, úrico, orótico, cítrico, láctico y butírico) sobre muestras de queso no fundido, durante la maduración refrigerada y compararlos con los resultados obtenidos en muestras congeladas, almacenadas a -20°C y descongeladas, con iguales períodos de afinado.
- i) Aplicar análisis de discriminantes para estudiar la clasificación del producto, según su tiempo de maduración, en base al contenido de ácidos orgánicos.

## *Capítulo 2*

### ***MATERIALES Y METODOS***

## **2-1 MATERIALES**

### *Materias primas*

Las materias primas elegidas para este trabajo fueron: queso Reggianito Argentino para los estudios de envasado en película y queso Mozzarella para los estudios de congelación. La elección de queso Reggianito se debió a que es, de los quesos duros comercializados en nuestro país, el de mayor importancia, y no se había ensayado el envasado en películas plásticas en este tipo de queso. La elección de queso Mozzarella para los estudios de congelación se realizó en base a que es un queso que posee un período de vida corto, al que es necesario aplicar algún proceso tecnológico de conservación para prolongar su vida útil y además a los fines de resolver al mismo tiempo los problemas de estacionalidad de la producción lechera; pese a que la congelación encarece el proceso el valor comercial del producto lo justifica.

### *Queso Reggianito*

Es un queso de pasta dura, similar al Parmesano italiano, elaborado con leche normatizada, acidificada por cultivos de bacterias y coagulada por cuajo y/o enzimas específicas.

Su masa es cocida, moldeada, prensada, salada y madurada. La pasta es compacta, consistente, fracturable, quebradiza y de grano fino.

El sabor debe ser dulce, ligeramente salado, de aroma suave, agradable y bien desarrollado y apenas picante y su color blanco amarillento uniforme ( Código Alimentario Argentino).

Tiene forma cilíndrica achatada, pesando entre 5 y 10 kg la horma (el italiano pesa 30 kg la horma). Mide 25 cm de diámetro y 15 cm de altura. El contenido graso promedio es de 35-40% (el mínimo según el Código Alimentario Argentino es de 30%), contiene 3.5-4% de sal y un 27-35% de agua (en base seca). Desarrolla una corteza lisa, consistente y bien formada.

El tiempo de maduración mínimo para hormas de 10 kg es de 9 meses y para hormas de entre 5 y 10 kg es de 6 meses.

El queso Reggianito Argentino es el más importante de los quesos duros que se manufacturan en la Argentina (alrededor de 3500 ton/año en la última década).

El nombre Reggianito es dado al queso Grana doméstico que es usado como ingrediente de las comidas. Por razones de preferencia del consumidor y económicas, el queso y su manufactura es levemente distinto al italiano, sin embargo, el flavor y la textura son esencialmente similares.

### *Manufactura del queso Reggianito*

Los quesos Reggianito utilizados en este trabajo fueron provistos por Cabañas y Estancia Santa Rosa S.A y preparados según el protocolo de dicha fábrica, agregando 30 mg g<sup>-1</sup> de suero starter, 0.2 mg g<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> y 0.035 mg g<sup>-1</sup> de cuajo bovino comercial a leche pasteurizada de 26 g kg<sup>-1</sup> de contenido graso y que se encontraba a 32°C. El starter estaba compuesto principalmente de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus fermenti* y en mucha menor proporción por *Lactococcus lactis* subesp. *lactis*, *Lactococcus plantarum*, *Propionibacterium shermanii* y *Propionibacterium globosum* (la composición del starter fue informada por el fabricante). La coagulación llevó de 9 a 10 min. La cuajada se cortó con una grilla cuadrículada, fue sometida a sucesivas etapas de agitación y reposo y luego fue calentada a 50°C. A continuación la cuajada fue cortada, colocada en moldes y prensada durante 8 a 9 horas. El salado se hizo por inmersión de los quesos en salmuera durante 10 días. Los quesos se almacenaron luego en cámara cuya temperatura oscilaba entre 15 y 17°C y su humedad se mantenía entre el 85 y 90%.

Tradicionalmente, el queso Reggianito se madura en cámaras a 12°C y al final del período de maduración (6 meses), a causa de la formación de hongos, su superficie debe ser rascada y una pintura negra es aplicada sobre las hormas.

La película plástica utilizada para el envasado de los quesos duros motivo del estudio, (BK1, Grace, Argentina) es una película coextrudada que consta de dos capas



externas de EVA (etil-vinil-acetato) y una capa interna de Saran (copolímero de cloruro de vinilo y cloruro de vinilideno) que le confieren una baja permeabilidad al vapor de agua y a los gases, gran resistencia química y buenas características ópticas. Su permeabilidad al CO<sub>2</sub> es de 1000 cm<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup>, al O<sub>2</sub> de 150 cm<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup> y al vapor de agua de 4 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> atm<sup>-1</sup> y su espesor es de 60 μm. Las bolsas conteniendo los quesos fueron selladas al vacío y termocontraídas en todos los casos.

### *Queso Mozzarella*

La Mozzarella es uno de los quesos de pasta hilada que si bien es original de Italia, es consumido ampliamente en el resto del mundo debido a su creciente popularidad como ingrediente de pizzas y otros alimentos similares.

Las industrias de los servicios de comidas raramente utilizan quesos Mozzarella de altos contenidos de humedad (mayores de 52% pero menores que el 60%) como ingrediente para pizza debido a que la capacidad de formar hilos es pobre y su período de vida útil es limitado.

Los quesos Mozzarella de baja humedad contienen menos del 52% de agua y son los que se usan principalmente como ingredientes para las pizzas. Generalmente estos quesos necesitan un período de tres semanas de almacenamiento refrigerado para desarrollar el punto deseado de fundibilidad, extensibilidad y palatabilidad (Kindsted, P.S 1993).

Según Kindsted (1993), el queso Mozzarella de baja humedad es usado para pizzas y muchas otras aplicaciones culinarias y es primero cortado, cubeteado o trozado típicamente a temperaturas menores de 10°C, en partículas discretas de medidas similares para facilitar la distribución uniforme y la fundibilidad. Las partículas cortadas pueden resistir la formación de hilos y amontonarse. Cuando el queso es muy blando y pastoso ocurren problemas, causando que los cortes realizados a cuchillo resulten en atascamientos y en partículas de queso que forman agregados pegajosos. Por otra parte los quesos que son demasiado firmes y duros causan también problemas, ya que resultan en partículas astilladas.

*Manufactura del queso Mozzarella*

El queso Mozzarella utilizado, provisto por Unión Gandarese S. A, es un queso de pasta hilada que fue elaborado en la planta proveedora del material, según el siguiente procedimiento: leche pasteurizada, con 26 mg de grasa por gramo de leche, es enfriada a 34°C, bombeada a la batea para hacer los quesos e inoculada con cultivo termófilo, agregándosele cuajo bovino comercial como coagulante. El cultivo iniciador consiste principalmente de *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*. Después de un período de 20 minutos la cuajada formada es cortada y se la deja en reposo cinco minutos. Luego se la agita vigorosamente, sin calentamiento, durante veinte minutos. Seguidamente se realiza un calentamiento a 45°C, durante otros veinte minutos, con continua agitación. Al finalizar este período de cocción, el pH del suero alcanza  $6.0 \pm 0.1$ . Seguidamente el suero es drenado desde la cuajada, que se moldea parcialmente; la cuajada es llevada a temperatura de cocción en una cámara termostáticamente controlada hasta que el pH alcanza 5.3, aproximadamente dos horas, y luego se muele y se corta en mezcladora de cuchillas, bajo una solución salina concentrada ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ) a 90°C. De esta manera la sal es incorporada durante el proceso de troceado. La temperatura de la cuajada al finalizar esta etapa está entre 62 y 65°C. La pasta del queso es colocada en moldes de 28 x 10 x 10 cm y enfriada a 20°C en salmuera con una concentración de 15 a 20  $\text{g l}^{-1}$  que se encuentra a una temperatura entre 8 y 10°C. Antes de que existieran las modernas tecnologías se procedía a realizar en forma manual las etapas de mezclado y amasado, que eran las que requerían el mayor esfuerzo de trabajo en el proceso de manufactura. En la actualidad, en las modernas plantas se realiza el mezclado y amasado mecánico. Estas etapas se realizan después de la maduración ácida de la cuajada y antes de que el cuajo sea escurrido. Estas dos etapas llevan a una reducción del tamaño de las unidades de la cuajada; se produce el calentamiento con agua o vapor y se obtiene una masa plástica suave y extensible que luego se fracciona para formar las hormas de peso y forma determinados.

La formación de ácido en las primeras etapas de la producción de queso Mozzarella, (por ejemplo antes del drenaje del suero) es debido principalmente a

*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus*, sin embargo *Lactobacillus delbrueckii* suesp. *bulgaricus* se vuelve más importante en las etapas finales de la manufactura del queso Mozzarella (Christensen, 1966; Roundy, 1965; Speck, 1971). Cuando se mantiene constante la cantidad total de inóculo, la velocidad de manufactura de queso Mozzarella depende de la relación de bacilos a cocos que esté presente. Además la producción de ácidos, medida como los cambios de acidez titulable y pH, también depende de esta proporción (Yun y col., 1992). Por consiguiente la importancia de la relación bacilos a cocos sobre las características funcionales del queso Mozzarella puede relacionarse parcialmente con la influencia en la velocidad de producción de ácidos.

La plasmina es resistente a las altas temperaturas y la desnaturalización proteica en queso Mozzarella es atribuible a ella, no así a la quimosina que se inactiva por temperatura (Lawrence y col. 1983; 1987). La Mozzarella, que se pone en agua caliente, desnaturaliza la quimosina y las proteasas de las bacterias. Las propiedades de elongación de la Mozzarella se preservan en los períodos más largos de la maduración. Sin embargo esto no ocurre indefinidamente ya que la caseína en la Mozzarella se degrada a baja velocidad. Las características de elongación se relacionan con la relativamente alta concentración de caseína intacta y los grandes péptidos presentes en el queso (Creamer, 1976) y además con el contenido de minerales y el pH.

Los quesos obtenidos en planta fueron envasados al vacío con película BK1 (EVA-SARAN-EVA, de Grace Argentina) cuyas características fueron mencionadas anteriormente. Todas las hormas de queso se dejaron madurar en cámara de 4°C.

## **2-2 METODOS**

### **2-2-1 Contenido de humedad**

El contenido de humedad fue determinado en estufa de vacío a 80°C hasta peso constante. Este contenido fue expresado como gramo de agua por gramo de queso. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

### **2-2-2 Actividad acuosa**

La actividad acuosa de las muestras fue medida en un equipo Novasina Termoconstanter Humidat TH2/TH1 (Novasina, Zurich, Suiza). La calibración previa fue hecha con sales de  $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$  con 98% de humedad relativa a 25°C,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con 90.1% humedad relativa a 25°C,  $\text{NaCl}$  con 75.3% de humedad relativa a 25°C y  $\text{MgNO}_3$  con 52.9% de humedad relativa a 25°C.

### **2-2-3 Contenido de sal y de grasa**

El contenido de sal fue determinado en la planta elaboradora por el método 16.272 de la AOAC utilizando  $\text{NO}_3\text{Ag}$  para combinarlo con el cloruro presente en medio nítrico, libre de halógenos. Se titula el exceso de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  con  $\text{SCNK}$  0.1 N, con alúmina férrica como indicador (Assoc. of Official Anal. Chem, método 15160, 1984).

El contenido de grasa fue analizado en la planta elaboradora por el método de Babcock modificado (Kosikowski, 1982, modificación del método N° 16060 de la AOAC). Se utilizaron 9 g de queso picado y se le agregaron 10 ml de agua a 55°C. Luego se le hizo la digestión ácida de las proteínas (con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), mientras se agitaba cuidadosamente. Después se centrifugó 5 minutos y a continuación se agregó agua caliente y se centrifugó nuevamente otros cinco minutos. A continuación se colocaron cuidadosamente unas pocas gotas de parafina líquida sobre la columna de grasa y se midió el % de grasa de la columna con divisores metálicos.

### **2-2-4 Contenido de Nitrógeno**

El nitrógeno total presente incluye tanto al nitrógeno proveniente de las proteínas como al nitrógeno no proteico. Los compuestos nitrogenados solubles están formados solamente por la fracción que es soluble en solución acuosa y que resultan de la acción de proteasas, peptidasas, decarboxilasas que hidrolizan a las para-caseínas dicálcicas (que son insolubles) a para-caseína libre y luego a peptonas, péptidos y aminoácidos, siendo todos

estos compuestos solubles en agua (Kosikowski, 1982). Parte de esta heterogénea fracción es el nitrógeno no proteico que es soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 12% (120 g l<sup>-1</sup>) y está compuesto por aminoácidos libres y péptidos con peso molecular menor que 2000 (Kosikowski, 1982; Law, 1987). La determinación del contenido de nitrógeno fue realizada por el método de Kjeldhal analizando las muestras por duplicado. Se utilizó un aparato Büchi con un digestor modelo 425 y una unidad de destilación de nitrógeno modelo 320. (Büchi Laboratoriums-Technick AG, Flawil, Suiza).

### *Nitrógeno total*

La determinación se realizó por el método de Kjeldhal. Un peso constante de alrededor de 1.5 g de queso fue digerido en caliente con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado utilizando un catalizador compuesto por SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> anhidro y SO<sub>4</sub>Cu, en una relación 10 a 1. La solución obtenida de la digestión fue alcalinizada con solución de NaOH de una concentración equivalente a 300 g l<sup>-1</sup> y luego fue destilada. El NH<sub>3</sub> liberado fue recogido en un volumen conocido de HCl de concentración 0.1 N (destilándose hasta lograr un volumen de 250ml). El exceso de ácido no neutralizado por el NH<sub>3</sub> fue titulado luego con NaOH de concentración 0.1 N. La concentración de nitrógeno total (NT) fue expresada como mg de nitrógeno por gramo de queso. Las proteínas totales fueron calculadas multiplicando el contenido de nitrógeno total por el factor 6.38, que indica, según el tipo de proteína que contienen los quesos, en qué proporción se encuentra presente el nitrógeno en ellas (Kosikowski y col., 1982).

$$\% \text{ NT} = \frac{(V \text{ N}_{\text{HCL}} - V \text{ N}_{\text{NaOH}}) \text{ meq N} * 100}{\text{peso de muestra}} \quad (2-1)$$

$$\% \text{ Prot} = 6.38 \% \text{ NT} \quad (2-2)$$

*Nitrógeno soluble*

Se utilizó el método del Manual Oficial para el Análisis Bromatológico (Bertola y col., 1991). Aproximadamente 10 g de queso fueron secados en estufa de vacío a 80°C y luego fueron colocados en 500 ml de agua a temperatura ambiente durante 15 hs. Después de transcurrido este tiempo las muestras fueron filtradas y el nitrógeno soluble fue determinado sobre la solución según el método descrito para nitrógeno total. La determinación fue realizada sobre 100 ml de filtrado. El NH<sub>3</sub> desprendido fue recogido sobre 50 ml de HCl 0.1 N y se destiló hasta obtener un volumen 100 ml. Para los cálculos se tuvo en cuenta que los 100 ml equivalían a un quinto de la muestra original.

*Nitrógeno no proteico*

Unos 10 g de muestra fueron homogenizados con 40 ml de buffer acético-acetato, que fue preparado disolviendo 8.2 g de C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na anhidro con 6 ml de ácido acético glacial y llevado a un volumen de 1 l con agua destilada. El homogenizado fue agitado en baño de agua con agitación mecánica durante 1 h a 45°C. Después de este tiempo se agregaron 10 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 60% de manera de obtener una concentración final de 120 g l<sup>-1</sup>, lo que induce a la precipitación proteica. Luego fue filtrado y determinado el nitrógeno no proteico por el método de Kjeldhal sobre una alícuota del filtrado de 25 ml. Se recogió el NH<sub>3</sub> sobre 50 ml de HCl 0.1 N y se destiló hasta obtener un volumen de 200 ml.

Para los cálculos se tuvo en cuenta que los 25 ml de filtrado equivalían a la mitad de la muestra de queso utilizada.

**2-2-5 Análisis de ácidos orgánicos y lactosa**

La información sobre ácidos orgánicos es importante para comprender el metabolismo y la calidad en los productos lácteos. Los ácidos aparecen como resultado de la hidrólisis de triglicéridos, de los procesos metabólicos, de la acción enzimática o de la

adición directa de acidulantes.

Para el análisis de ácidos orgánicos se utilizaron métodos de cromatografía líquida de alta presión. Para los análisis por HPLC de queso Reggiano se utilizó un cromatógrafo Waters con inyector U6K y una bomba para solvente 6000 A, un detector de longitud de onda variable 450 y un detector diferencial refractométrico R 401 en serie utilizado para la detección de lactosa. La adquisición de los datos se realizó mediante un equipo Data Module M 730. El lazo de inyección utilizado fue de 20  $\mu$ l. Este equipo de HPLC fue utilizado en el caso de la puesta a punto del método para la determinación de ácidos orgánicos y lactosa (Bevilacqua y Califano, 1989) y en los datos obtenidos para la aplicación de técnicas estadísticas de multivariantes para la clasificación de quesos duros según su período de maduración.

Para los análisis cromatográficos de queso Mozzarella se utilizó un cromatógrafo líquido (Waters Associates, Mildford M A) equipado con un automuestreador modelo 717, una unidad controladora modelo 600, un fotodetector con arreglo de diodos UV-Visible modelo 996, un horno para columna construido en nuestro Instituto y un adquisidor de datos M 730. El detector UV fue fijado en 214 o en 280 nm y el horno a 65°C. De acuerdo con Bouzas y col.(1991), las condiciones de operación fueron, para ambos quesos: fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.009 N filtrada por membrana de 0.2  $\mu$ m (Millipore Waters Associates S M N11306) y desgasificado por sonicación. La velocidad de flujo en el circuito del cromatógrafo fue de 0.7 ml min<sup>-1</sup>.

Se prepararon cinco soluciones estándar de cada uno de los ácidos (fórmico, acético, pirúvico, láctico, propiónico, úrico, cítrico, butírico y orótico) y de lactosa cubriendo el rango de concentraciones que se preve puedan estar presentes en el queso a estudiar. De esta manera se obtuvieron las curvas de calibración para los diferentes ácidos estudiados. Para el desarrollo del método cromatográfico se tuvieron en cuenta también los espectros de absorción de cada uno de los distintos compuestos a analizar (Shimadzu double beam UV 150 digital spectrophotometer) para fijar las mejores longitudes de onda en el detector de absorbancia del cromatógrafo utilizado, logrando así las mejores cuantificaciones de los mismos (Fig.2-1 y Fig. 2-2). Se seleccionaron las longitudes de onda de 214 y 280 nm y el detector refractométrico para la detección de lactosa.

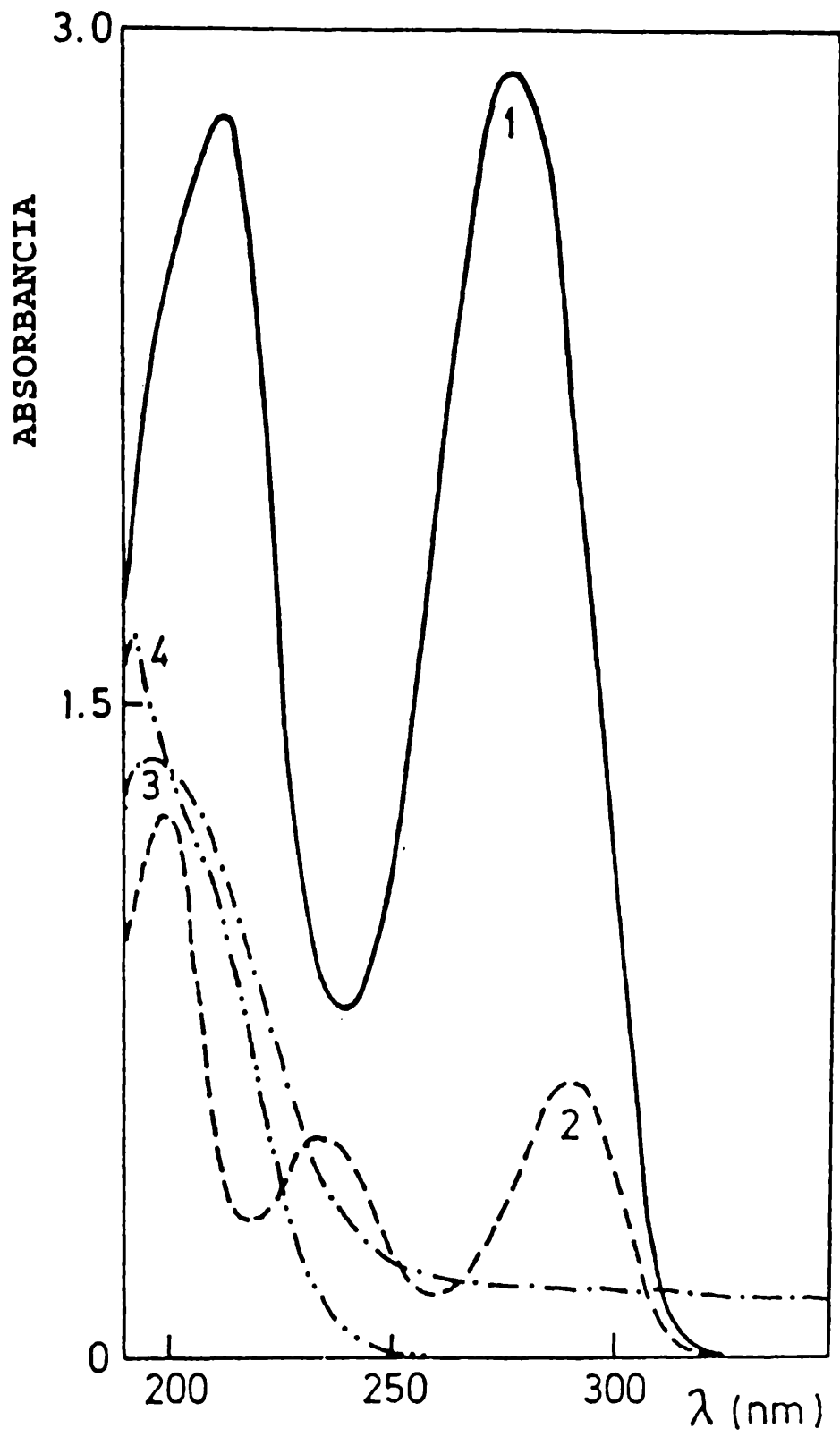


Fig.2-1 Espectros de absorción de los ácidos orótico (1), úrico(2), pirúvico (3) y láctico (4).



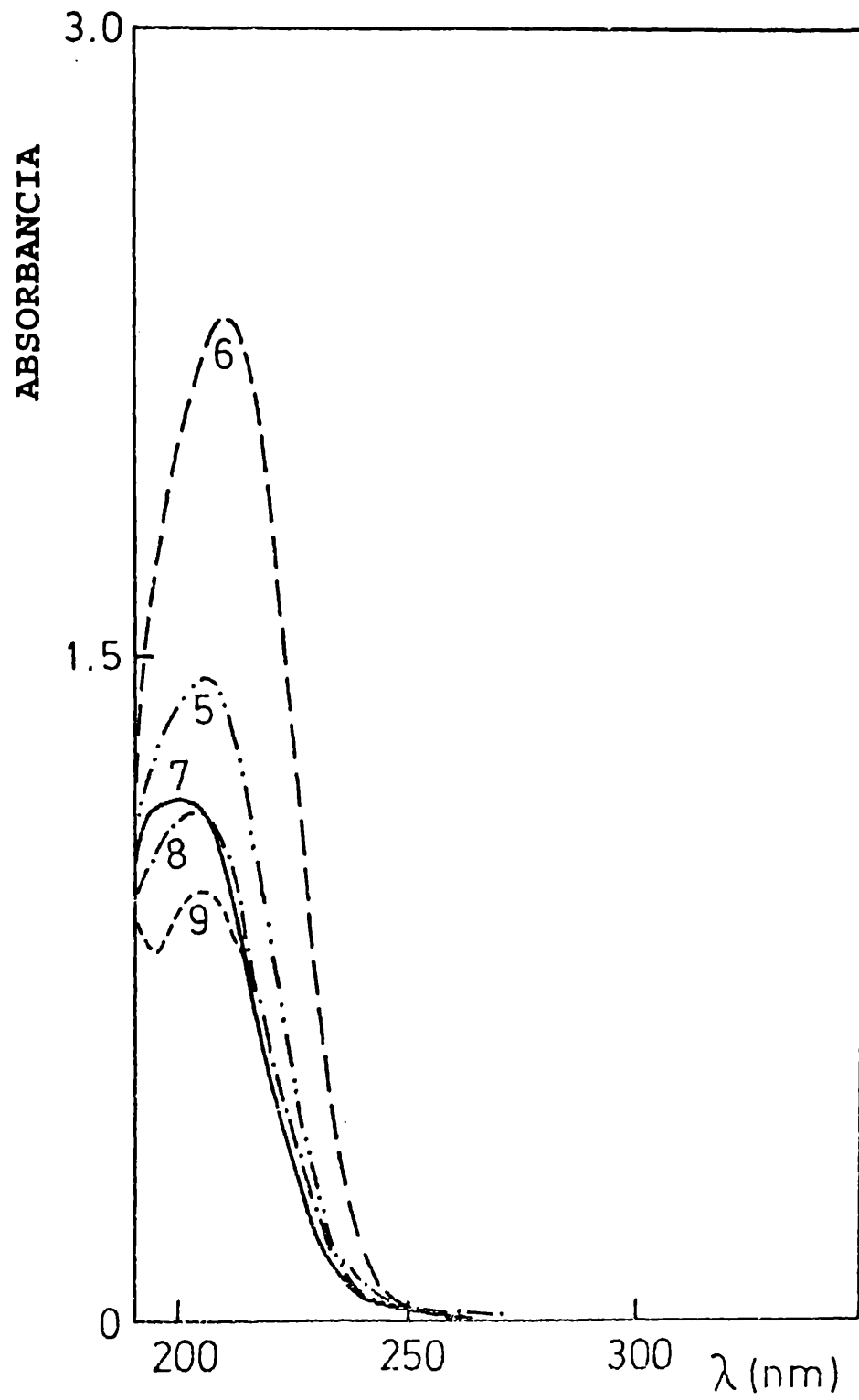


Fig.2-2 Espectros de absorción de los ácidos butírico (5), cítrico (6), acético (7), propiónico (8) y fórmico (9).

Un cromatograma típico de la solución acuosa de los estándares obtenido en la puesta a punto del método se muestra en la Fig.2-3.

El análisis de los resultados, en la puesta a punto del método, demostró que los ácidos cítrico y orótico no se resolvían completamente bajo las condiciones cromatográficas descritas. Lo mismo sucedía con los ácidos fórmico y úrico. Por este motivo tanto orótico como úrico se determinaron a 280 nm, donde cítrico y fórmico no absorbían y las mezclas fueron resueltas utilizando las absorbancias a ambas longitudes de onda de manera aditiva. Se utilizó el método del estándar externo, obteniéndose las curvas de calibración para los distintos ácidos estudiados. Dichas curvas son mostradas en las figuras 2-4, 2-5, 2-6 y 2-7.

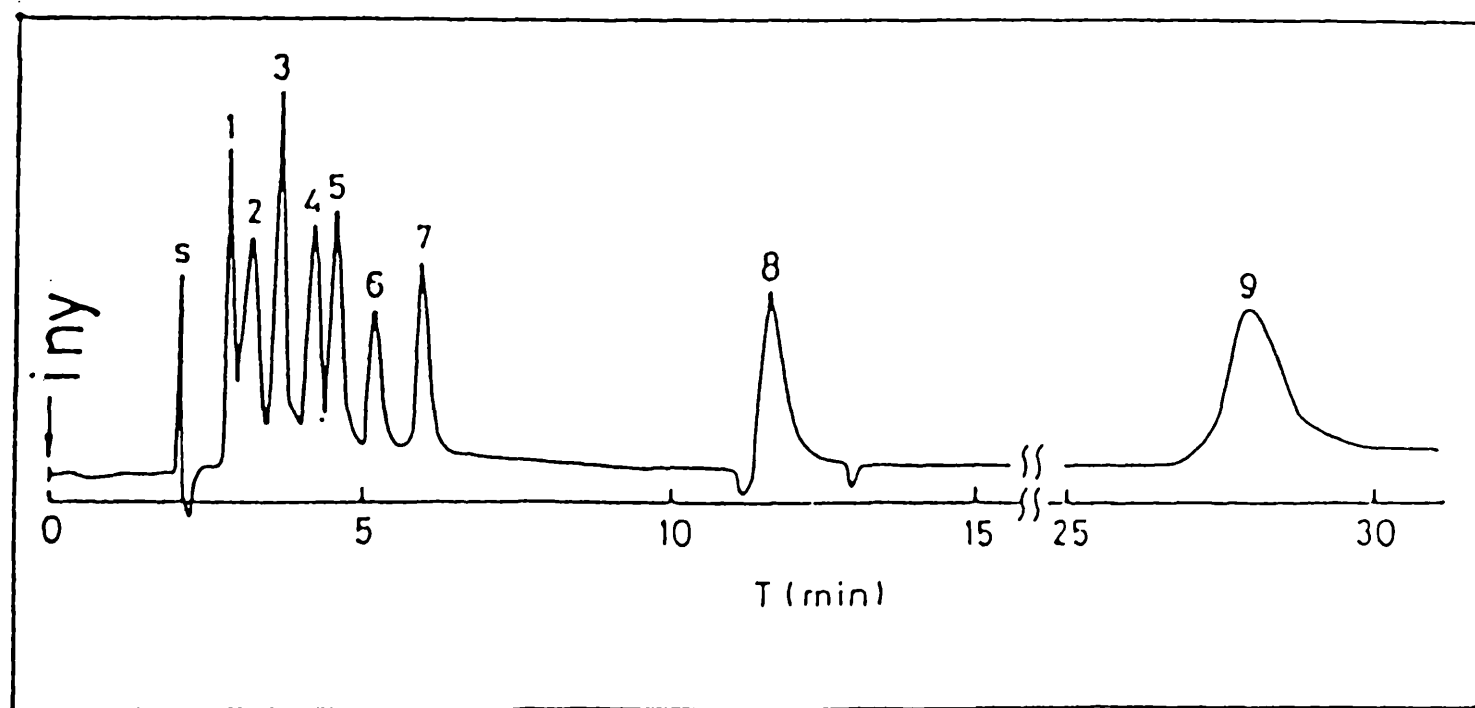


Fig.2-3 Cromatograma típico realizado con los estándares de los ácidos orgánicos estudiados: cítrico (1), orótico (2), pirúvico (3), láctico (4), úrico (5), fórmico (6), acético (7), propiónico (8) y butírico (9).

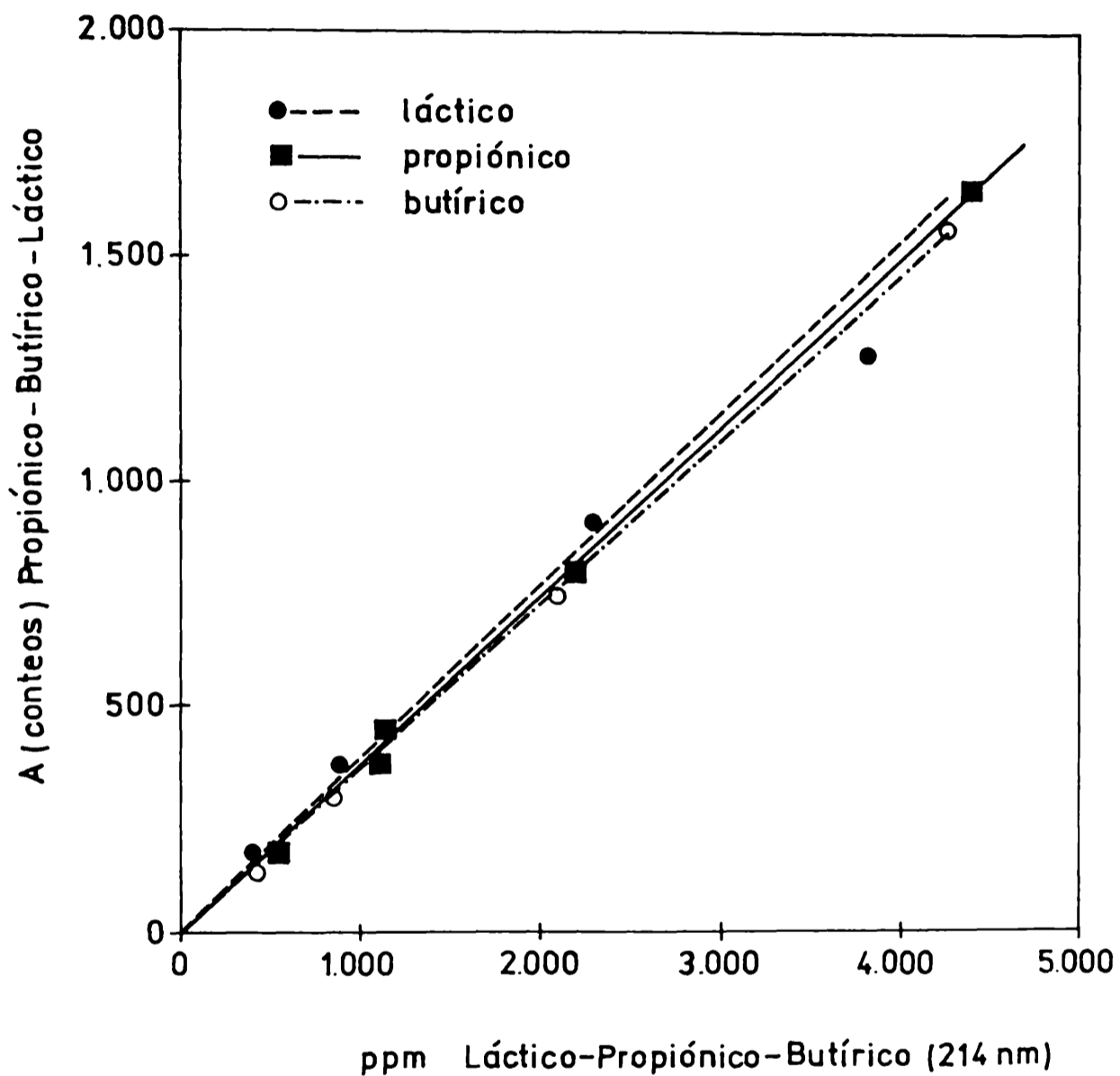


Fig. 2-4 Curvas de calibración para los ácidos láctico, propiónico y butírico.

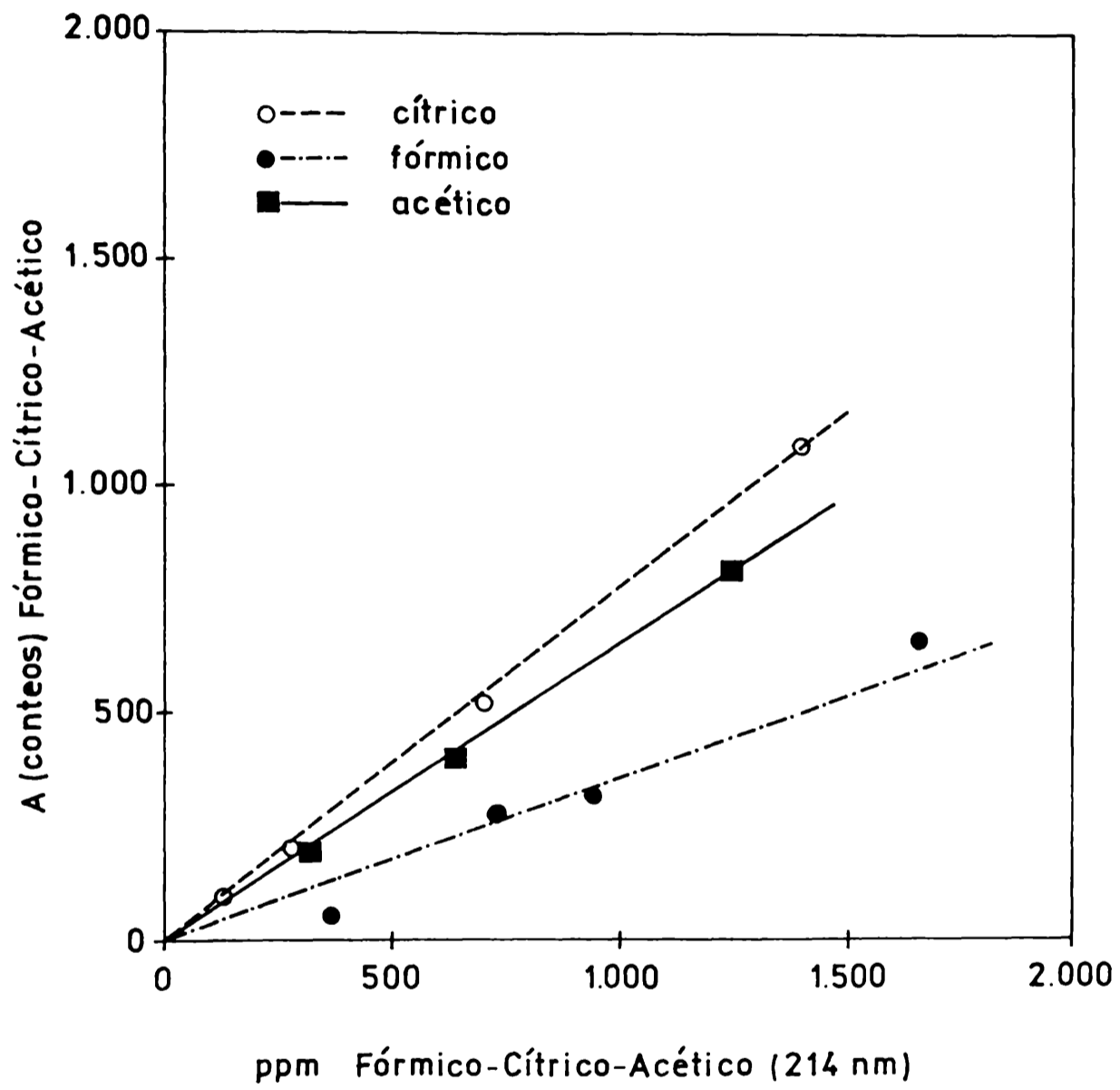


Fig. 2-5 Curvas de calibración para los ácidos cítrico, fórmico y acético.

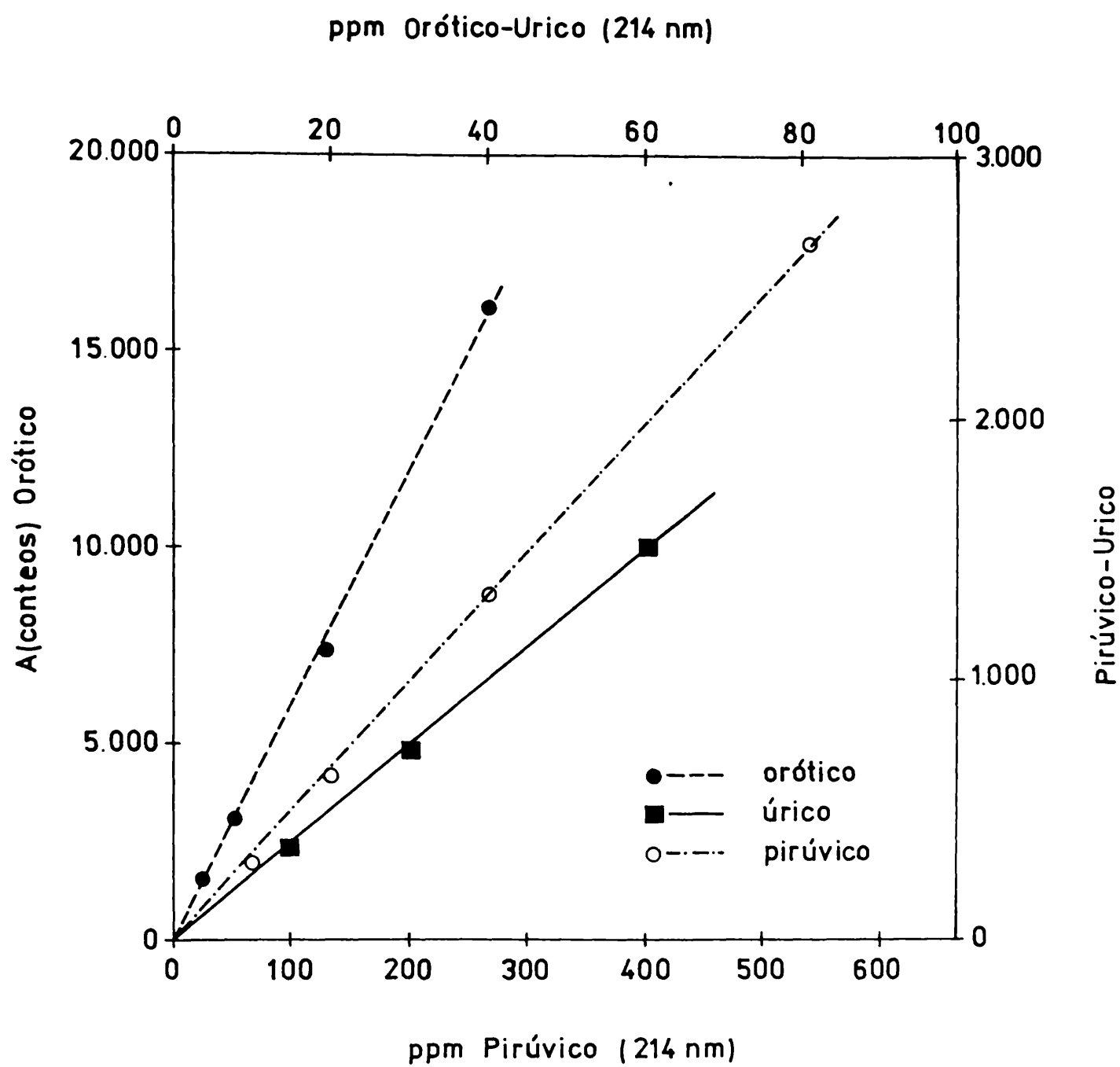


Fig. 2-6 Curvas de calibración para los ácidos orótico, úrico y pirúvico.

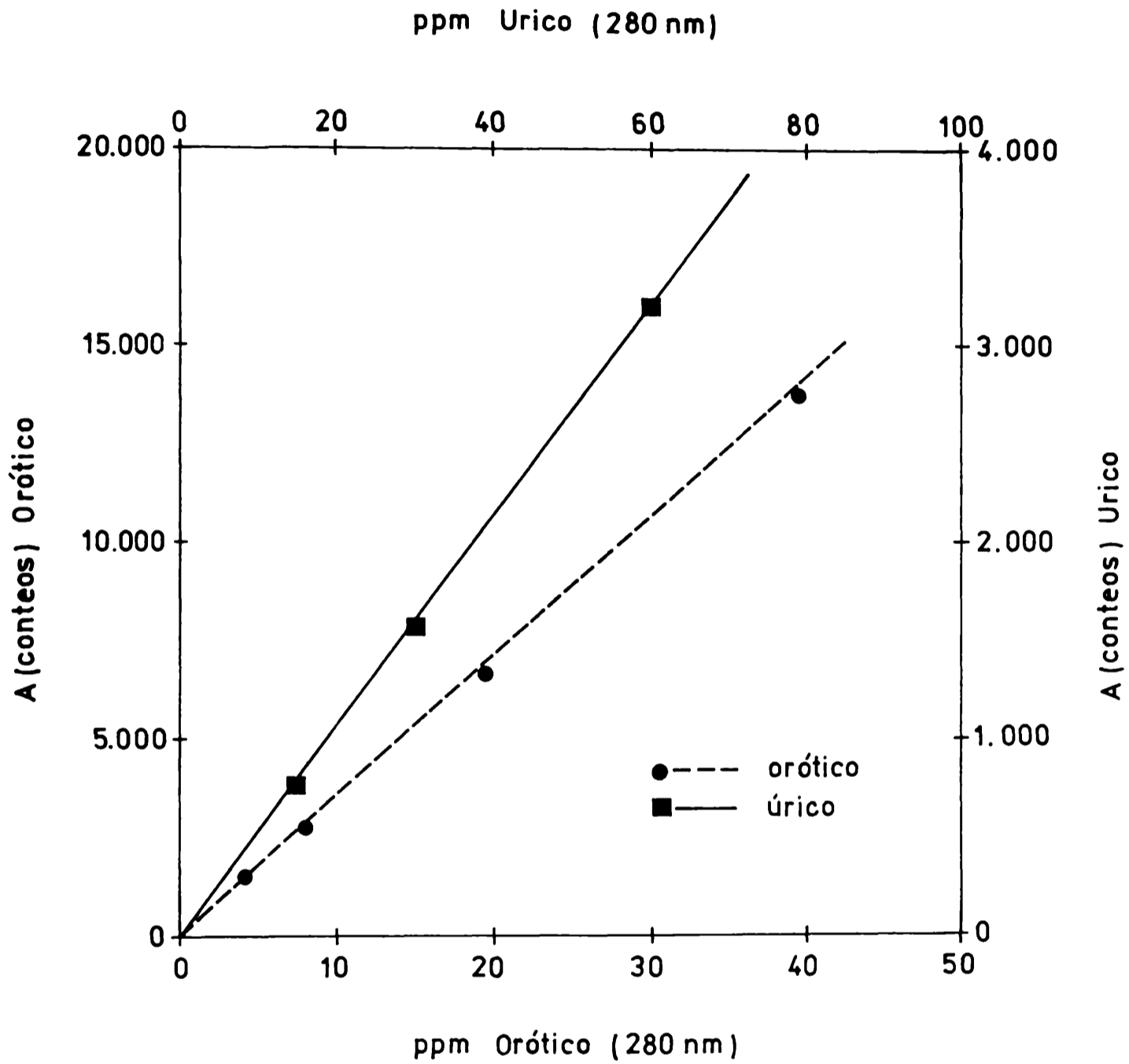


Fig. 2-7 Curvas de calibración para los ácidos orótico y úrico.

Las desviaciones promedios relativas de los replicados fueron menores del 3%. Los coeficientes de correlación entre los conteos de las áreas y las concentraciones indicaron muy buenas respuestas lineales en un amplio rango de concentraciones de los ácidos. Se determinaron los conteos correspondientes a cada área debajo de los picos del cromatograma. La cuantificación se basó en el método del estandar externo. Los tiempos de retención se determinaron primeramente por separado para cada ácido. Luego cada solución estandar original fue agregada a las diferentes corridas para tener una correcta identificación de los picos.

La eficiencia del proceso de extracción fue evaluada por la determinación de la recuperación de los ácidos orgánicos. Una cantidad conocida de solución estandar de ácido orgánico fue agregada a 7.0 g de queso y extraída como se explicará en la preparación de la muestra. Se realizaron inyecciones por duplicado de un extracto de queso y de un extracto de queso más el estandar agregado. La cantidad de estandar adicionada fue de aproximadamente el 50% de la cantidad de ácido presente en la muestra.

#### *Preparación de la muestra*

La preparación de la muestra se realizó de la siguiente manera: alrededor de 100 g de muestra representativa proveniente de cada queso fue picada congelada en molino analítico con refrigeración (A-10 Analytical Mill, Tekmar, USA). Aproximadamente 7 g de queso picado fue colocado en matraz de 50 ml y éste fue enrasado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.009N (solvente de corrida). La extracción de los ácidos se realizó agitando en un Shaker Rolco (Rolco S.R.L, Argentina) en el caso de queso Reggianito y shaker Burrell (Modelo 75, Burrell Scientific, Pittsburgh, PA, USA) para quesos Mozzarella, durante 1 h. Luego de esta operación se centrifugó a 7000 x g durante 5 min. El sobrenadante de cada muestra fue filtrado una vez por papel de filtro y dos veces más por membrana filtrante de 0.45 μm de diámetro de poro (Millipore Waters Associates, SM N 11306). Para cada inyección cromatográfica se utilizaron 10 μl, medidos con jeringa Hamilton de 25 μl (Hamilton Co., Reno, NV, USA), para queso Reggianito y 30 μl de cada muestra extraída en el caso de queso Mozzarella. Sobre todas las muestras se realizaron análisis por duplicado.

En ambos estudios la columna de intercambio catiónico utilizada fue Aminex HPX 87 (Bio Rad Laboratories, USA).

### **2-2-6 Análisis de textura**

Fue utilizado un método instrumental para la caracterización de la textura de los quesos. En este método las fuerzas ejercidas sobre el producto ensayado y las respuestas obtenidas dependen de la temperatura, de la relación de compresión, de la forma y del tamaño de las muestras (Bourne, 1982; Green y col., 1985).

Los ensayos fueron realizados a 20°C con un texturómetro Instron Universal Testing Machine modelo 1132 (Instron Corp., Canton, MA, USA) equipado con una celda de compresión de 500 N que opera a distintas velocidades de cabezal.

Esta máquina fue desarrollada para estudiar propiedades mecánicas de los materiales y sirve para realizar ensayos de compresión, tensión, flexión, puntura, extrusión, etc. Consta de dos partes: una de ellas es un mecanismo de conducción que maneja un cabezal horizontal en dirección vertical que se desplaza a velocidad controlada en el rango 0.02 - 50 cm min<sup>-1</sup>; la otra parte es un sistema de detección y registro de la fuerza ejercida consistente en celdas cuya salida alimenta al registrador.

#### *Ensayos de compresión*

El método objetivo de análisis de perfiles de textura (APT), con dos ciclos consecutivos de compresión (Szczeniak, 1975), permite calcular a través de las curvas obtenidas los parámetros dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad, fuerza y deformación relativa en la ruptura. Este método fue aplicado a una gran variedad de quesos (Lee y col., 1978; Imoto y col. 1979; Chen y col. 1979; Emmons y col. 1980).

En el test de compresión uniaxial con dos ciclos consecutivos (Bourne, 1968) la altura del pico del primer ciclo a la máxima deformación producida es tomada como valor de dureza (Sherman, 1969). La adhesividad corresponde al área del primer pico invertido (A<sub>3</sub>). La cohesividad es evaluada como la relación entre áreas bajo el segundo y el primer



pico ( $A_2/ A_1$  ). La elasticidad está representada por la altura que el alimento recupera durante el lapso entre el final del primer pico y el comienzo del segundo pico y que en la Fig. 2-8 está representada por BC. La fuerza en la ruptura es la fuerza ejercida sobre la muestra en el punto en que se produce la ruptura de la misma. La deformación relativa en el punto de ruptura se calcula como  $\epsilon_r = \Delta L_r/L_0$ , donde  $L_0$  es la altura inicial de la muestra y  $\Delta L_r = L_0 - L_r$ , siendo  $L_r$  la altura de la muestra en el punto de ruptura. En la figura 2-8 se muestra una curva típica de un ensayo de compresión.

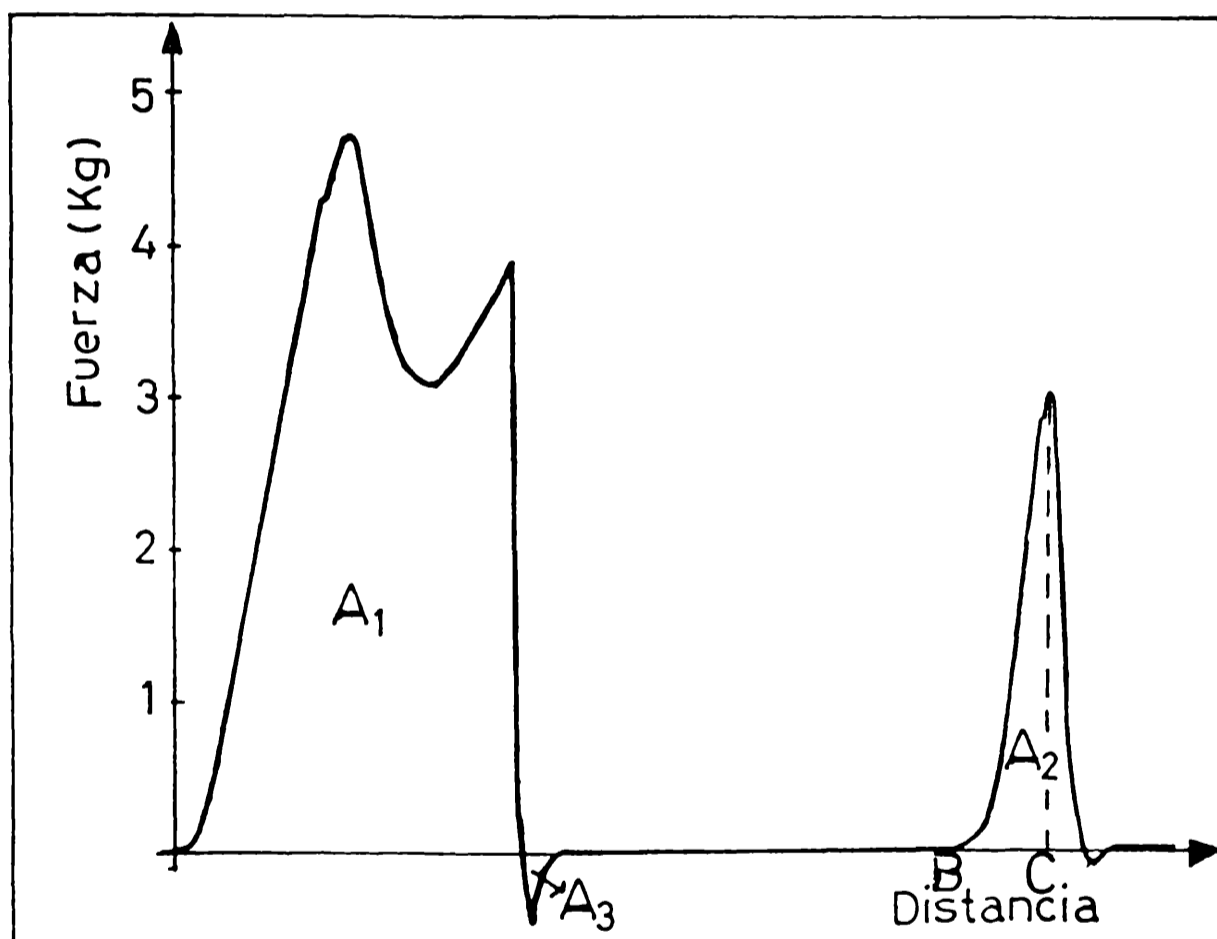


Fig. 2-8 Curva típica fuerza-deformación correspondiente a un ensayo de compresión.

Desde el punto de vista de las propiedades organolépticas, la dureza del queso es una de las características de textura más importantes con respecto a las preferencias de los consumidores y a la percepción sensorial (Lee y col., 1978). Se puede definir la dureza como la fuerza requerida para penetrar la muestra de queso con los dientes y se corresponde en un ensayo instrumental a la máxima fuerza ejercida sobre la muestra (Sherman, 1969). La cohesividad representa el grado de deformación del queso después de la ruptura (Chen y col., 1979). La adhesividad se define como la fuerza requerida para remover el queso adherido a la superficie de los dientes, que se refleja en la adherencia de la muestra al plato de compresión del equipo utilizado en el ensayo. Este parámetro resulta de interés durante el manejo y el envasado de los quesos, ya que no es fácilmente detectable como estímulo sensorial por separado (Lee y col., 1978; Chen y col., 1979).

Los valores de los parámetros determinados por métodos sensoriales e instrumentales muestran una buena correlación si la elección de las condiciones de los ensayos fue correcta (Brennan y col., 1970; Lee y col., 1978; Eberhard y Fluckiger, 1978; Green y col., 1985). Generalmente no existen condiciones únicas que resulten en un óptimo para todos los tipos de quesos ni para todas las propiedades mecánicas medidas con un test fuerza-deformación. Por lo tanto es necesario encontrar la combinación más adecuada para el queso a ser analizado y para los parámetros que se van a medir.

Para la realización de los ensayos fuerza-deformación deben tenerse en cuenta: la velocidad a la cual la muestra es deformada, la temperatura a la cual se encuentra la muestra durante el ensayo (que debe fijarse y mantenerse constante en los distintos ensayos) y la relación de compresión.

### *Curvas fuerza deformación*

Para estos ensayos fue usado el accesorio pistón de 3.5 cm de diámetro del texturómetro Instron Universal, trabajando a una velocidad de desplazamiento del cabezal de  $10 \text{ cm min}^{-1}$  y con una celda de compresión de 500 N. Las experiencias fueron realizadas a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ).

Las muestras fueron obtenidas de la zona central del queso y cortadas utilizando

un sacabocados. Se utilizó un mínimo de seis replicados por cada muestra a analizar para estimar los valores promedio. Durante los ensayos los platos de metal de la prensa Instron no fueron lubricados, pero la humedad exudada por los quesos durante la compresión sirvió para reducir la fricción entre la muestra y el plato.

Para obtener las curvas fuerza-deformación para queso Reggianito se comprimieron las muestras hasta un 80% de su altura original. Las dimensiones de las mismas fueron: 1.5 cm de diámetro y 2 cm de altura.

Fue utilizado el test de compresión uniaxial (Breene, 1975; Szczesniak, 1975; Chen y col., 1979; Lee y col., 1979; Bourne, 1982). Se determinaron los parámetros: dureza (D), fuerza en la ruptura ( $F_r$ ) y deformación relativa en el punto de ruptura ( $\epsilon_r$ ).

Para queso Mozzarella fueron utilizadas muestras cilíndricas de 1.5 cm de diámetro y de 2.5 cm de altura que fueron comprimidas hasta un 50% de su altura original. En este caso el test de compresión uniaxial fue realizado en dos ciclos de compresión sucesivos (Bourne, M.C 1982). Fueron determinados los parámetros de dureza, adhesividad, cohesividad y elasticidad.

Cada test fue repetido seis veces y los valores fueron promediados. Las áreas fueron determinadas usando una placa Digitalizadora (Jandel Scientific Digitizer, Jandel Corporation, USA) con un programa de análisis de datos (Sigma-Scan, versión 3.9).

#### *Ensayos de relajación realizados en Queso Reggianito Argentino*

La deformación sufrida por un queso al ejercerse sobre él una fuerza es debida a la tensión y a las características del material. Se podría definir al queso como un sólido considerando la propiedad de rigidez, a través de la cual el material mantiene indefinidamente su forma particular. La rigidez mide la relación entre el esfuerzo aplicado a un cuerpo sólido y la deformación resultante. Si el material es un sólido elástico, esta relación no varía y el material se recupera espontáneamente cuando el esfuerzo cesa. Contrariamente lo que caracteriza a un líquido es la propiedad de fluir y tomar la forma del contenedor. Frecuentemente se utiliza la inversa de esta propiedad que es la viscosidad, definida como la relación entre el esfuerzo aplicado a la muestra y la velocidad de flujo

producida.

Se define como material viscoelástico a aquél que muestra ambas propiedades al mismo tiempo: la de fluir y la de recobrar su forma. El queso, como la mayoría de los alimentos sólidos, es un material viscoelástico. Al ser sometido el queso a una deformación instantánea, y manteniendo esta deformación constante, la tensión soportada por el material disminuye con el tiempo. Este fenómeno se llama relajación y se representa por una curva característica, que se obtiene comprimiendo la muestra de queso hasta alcanzar el porcentaje máximo de deformación relativa para el cual el comportamiento es lineal. Cuando se llega a este punto se detiene el cabezal (tiempo=0) y se registra la fuerza en función del tiempo durante 300 s.

Para describir la respuesta de los alimentos sólidos a la aplicación de una fuerza externa y para analizar la textura se utilizan modelos mecánicos. Con ellos se interpretan los ensayos fuerza-deformación; se componen con dos elementos simples que pueden ser combinados en más de una forma y así representar el comportamiento reológico de materiales complejos. Estos elementos son: el elemento elástico ideal que se representa por un resorte y el elemento viscoso ideal o newtoniano que se representa por un amortiguador, en el que el pistón se mueve dentro de un líquido newtoniano (Peleg, 1980; Fiszman y col., 1983).

Dentro de los modelos mecánicos algunos de los más usados son el de Maxwell y el de Maxwell generalizado. En el modelo de Maxwell un cuerpo viscoelástico debe contener un elemento viscoso y un elemento elástico.

Si  $F$  es la fuerza aplicada a un elemento elástico y  $u$  es el desplazamiento  $F = E \cdot u$ , con  $E$  constante del resorte (análogo al módulo de elasticidad). Derivando respecto del tiempo se obtienen:

$$\frac{du}{dt} = \frac{1}{E} \frac{dF}{dt} \quad (2-3)$$

Para el elemento viscoso  $F = \eta \, du/dt$ , donde  $\eta$  es la viscosidad del fluido que refleja la fricción interna.

Si estos elementos se combinan en serie forman el modelo de Maxwell (Fig. 2-9), los dos elementos están sufriendo el mismo esfuerzo y diferente deformación; de manera que la deformación es la suma de las deformaciones de los dos elementos.

La ecuación que establece la relación entre fuerza y desplazamiento es:

$$\frac{du}{dt} = \frac{1}{E} \frac{dF}{dt} + \frac{1}{\eta} F \quad (2-4)$$

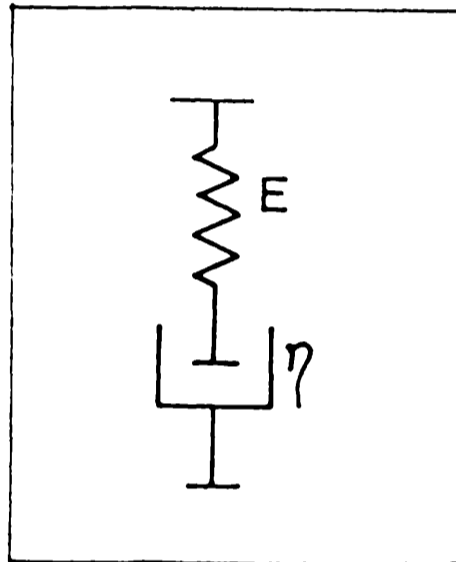


Fig. 2- 9 Esquema del modelo de Maxwell.

Considerando que en los ensayos de relajación la deformación permanece constante,  $du/dt = 0$  y se registran los cambios en la fuerza  $F$ , integrando la ecuación 2-4 con  $F = F_0$  para  $t = 0$  resulta:

$$F = F_0 \exp (-t/\tau) \quad (2-5)$$

donde  $\tau$  es el tiempo de relajación ( $\tau = \eta / E$ ) y representa cuán rápido el cuerpo se relaja. Si se dividen los dos miembros de la ecuación anterior por el área de compresión  $a$ , resulta:

$$\sigma = \sigma_0 \exp (-t/\tau) \quad (2-6)$$

donde  $\sigma$  es la tensión aplicada. Dado que  $\sigma = E \cdot \epsilon$ , con  $\epsilon$  representando la deformación relativa resulta:

$$E = E_0 \exp(-t/\tau) \quad (2-7)$$

∴

El modelo de Maxwell generalizado ha sido usado para representar el fenómeno de relajación en materiales viscoelásticos como geles, frutas, vegetales, etc (Mitchel, 1976; Peleg y Calzada, 1976; Peleg, 1979; Fizman, 1983). Se aplicó el modelo de Maxwell como herramienta para modelar el comportamiento del queso y determinar los elementos elásticos y viscosos. El modelo de Maxwell con infinitos elementos en paralelo se representa en la Fig. 2-10.

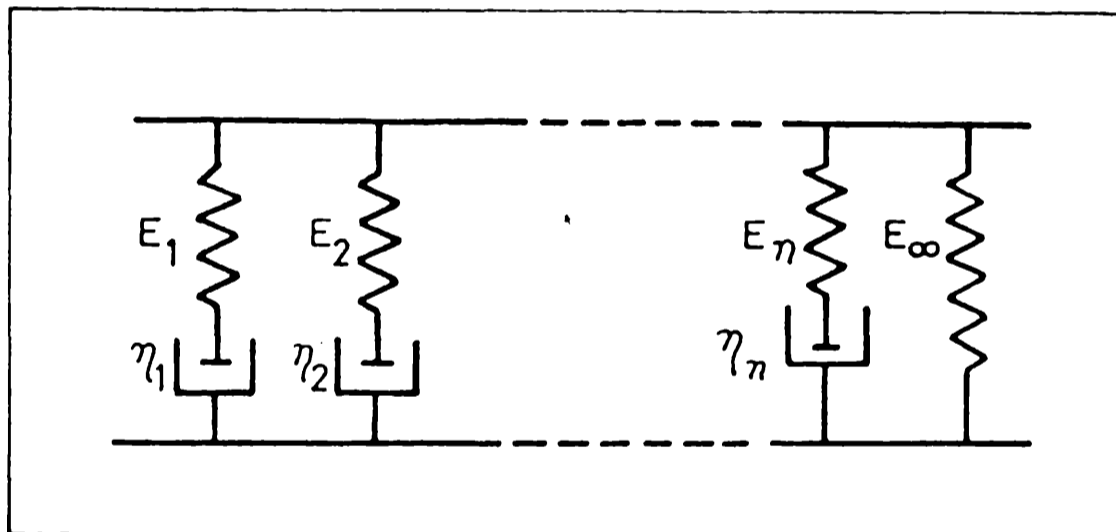


Fig. 2-10 Esquema del modelo de Maxwell generalizado.

De esta manera se evidencia el hecho de que la mayoría de los materiales viscoelásticos, incluyendo los materiales biológicos, no se relajan siguiendo una velocidad uniforme sino que lo hacen en distintas etapas con tiempos de relajación diferentes (Fizman y col., 1983).

Según el modelo, al someter a la pieza a una deformación constante  $\epsilon$ , el esfuerzo total es la suma de los esfuerzos soportados por cada elemento de Maxwell y su decaimiento con el tiempo sigue una ecuación de la forma:

$$F(t) = F_{\infty} + \sum_{i=1}^n F_i \exp(-t/\tau_i) \quad (2-8)$$

Teniendo en cuenta que la tensión es  $\sigma = F/a = E \cdot \epsilon$  se puede expresar el decaimiento de la tensión como:

$$\sigma(t) = \sigma_{\infty} + \sum_{i=1}^n \sigma_i \exp(-t/\tau_i) = \epsilon [E_{\infty} + \sum_{i=1}^n E_i \exp(-t/\tau_i)] \quad (2-9)$$

donde  $E_{\infty}$  es el módulo de elasticidad de equilibrio y corresponde en este modelo al elemento elástico puro.

A partir de este modelo se puede estudiar el comportamiento reológico de materiales viscoelásticos y calcular los parámetros que los caracterizan utilizando ensayos de relajación. Modelando matemáticamente los datos hallados se puede obtener una ecuación de la siguiente forma:

$$F^*(t) = F(t)/F_0 = A_{\infty} + \sum_{i=1}^n A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (2-10)$$

donde  $F(t)$  es la fuerza instantánea durante el tiempo de relajación,  $F_0$  su valor inicial antes del decaimiento de la tensión,  $A_i$  son coeficientes que dependen de las propiedades viscoelásticas del material y  $\tau_i$  los tiempos de relajación.

A partir de los coeficientes de la regresión  $A_i$  se pueden obtener los módulos elásticos de los distintos elementos según:

$$E_i = \frac{A_i F_0}{\epsilon a} \quad \text{con } i = 1, 2, \dots, \infty \quad (2-11)$$

Los valores de viscosidad ( $\eta_i$ ) del líquido en el amortiguador de cada elemento se pueden relacionar con los coeficientes de viscosidad, de acuerdo con Kfoury y col. (1989):

$$\eta_i = E_i \tau_i \quad (2-12)$$

Esta técnica fue utilizada por Masi y Addeo (1986) en el estudio de propiedades reológicas de quesos italianos y por Kfoury y col. (1989) en el análisis del comportamiento durante la maduración de quesos Camembert y Saint Paulin.

Para analizar el comportamiento viscoelástico durante la maduración fueron obtenidas las curvas de relajación. Se debió determinar la zona de comportamiento lineal para lo cual se calcularon  $\sigma_v$  y  $\epsilon_v$ . Según Pelegg (1977) y Nussinovitch y col. (1989) la tensión verdadera se define como:

$$\sigma_v = \sigma \left(1 - \frac{\Delta L}{L_0}\right) \quad (2-13)$$

y la deformación relativa verdadera como:

$$\epsilon_v = \ln \frac{L_0}{L_0 - \Delta L} \quad (2-14)$$

Se utilizaron muestras de 1.5 cm de diámetro y 3 cm de altura. Las muestras fueron comprimidas hasta alcanzar el porcentaje máximo de deformación relativa para el cual el comportamiento era lineal (determinado en pruebas anteriores). Llegado a este punto el cabezal era detenido (tiempo=0) y la fuerza era registrada en función del tiempo por un período de 300 seg.

Las curvas de relajación fueron modeladas con ecuaciones derivadas del modelo



de Maxwell Generalizado (Peleg y Calzada, 1976; Peleg, 1979).

Las curvas de relajación correspondientes a quesos con diferentes períodos de maduración (previamente adimensionalizados respecto a la fuerza inicial) fueron ajustadas por regresión no lineal, a los diferentes modelos mecánicos, utilizando un programa de computadora para regresiones no lineales (Módulo Non Linear Estimation de SYSTAT), obteniéndose los parámetros y sus errores.

### **2-2-7 Propiedades funcionales del queso Mozzarella fundido**

Dado que los quesos de pasta hilada (Mozzarella) son usualmente consumidos en estado fundido, las propiedades funcionales de fundibilidad, extensibilidad, elasticidad y formación de aceite liberado, son variables importantes usadas para comparar distintos procedimientos tecnológicos.

Algunos investigadores han empleado viscosimetría para estudiar el comportamiento del queso Mozzarella fundido. Kindsted y col. en 1989 utilizaron un test y Yun y col., más tarde (1993) lo modificaron, por medio del cual evaluaron la consistencia de la Mozzarella fundida utilizando viscosimetría helicoidal. En este procedimiento se mide la resistencia ofrecida por las fibras del queso formadas sobre una barra en forma de T, que gira y asciende a velocidad constante, emergiendo de una masa de queso fundido. La viscosidad aparente (VA) es una combinación de elasticidad y extensibilidad y es el término usado para expresar la resistencia medida por este procedimiento. La extensibilidad es la tendencia del queso fundido sometido a tracción, a formar hebras que se alargan sin romperse. Elasticidad es la capacidad de las fibras de resistir a la deformación permanente. La fundibilidad es la capacidad de las partículas de queso para fluir juntas y formar una masa continua y uniforme. La formación de aceite liberado es la separación del líquido graso desde el cuerpo del queso fundido hacia el exterior (Kindsted, 1993).

#### *Fundibilidad*

Para medir esta propiedad fue utilizada una modificación del método de Schreiber

(Kosikowski, 1982, Park y col 1984, Yun y col., 1993). Dos discos de 1.76 cm de diámetro y 0.7 cm de espesor fueron cortados de la parte interna de la muestra de queso usando un sacabocado. Las muestras fueron tomadas de manera que la dirección de la fibra del queso en las porciones analizadas fuera perpendicular al diámetro. Las porciones cortadas en forma de cilindros fueron colocadas en el centro de cápsulas de Petri y las cápsulas tapadas fueron ordenadas en una bandeja con un orden preestablecido. El horno fue precalentado a 100°C. Las porciones enfriadas a 4°C fueron colocadas en las cápsulas de Petri, cubiertas y dejadas a temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 30 minutos y luego colocadas en el horno a 100°C durante una hora. Después de transcurrido ese tiempo, la bandeja con las cápsulas de Petri fueron sacadas del horno y enfriadas a temperatura ambiente durante una hora. Luego se midió a cada muestra de queso fundido el diámetro en cuatro ángulos diferentes, con una aproximación de 0.01 cm y se sacaron los promedios de esas medidas.

#### *Viscosidad aparente*

La viscosidad aparente del queso Mozzarella fundido se midió por viscosimetría helicoidal según el método descrito por Yun y col. en 1993. El queso molido fue pesado en un cilindro de vidrio acondicionado con una base de plomo externa, de manera que el cilindro no fuera levantado por arrastre al girar la barra con forma de T, código E, del accesorio del viscosímetro Brookfield. Este recipiente fue colocado, tapado, en un baño de agua termostatzado (modelo D 8, Haake Mess-Technick Gmb Hn Co., Karlsruhe, Alemania) a 60°C durante 30 minutos. El nivel del agua del baño llegaba externamente hasta unos 11 cm por encima de la superficie del queso fundido. La aguja en forma de T montada en el viscosímetro Brookfield (modelo RVTD; Brookfield Engineering Lab., Inc, Sstoughton, MA) fue bajada usando un accesorio de paso helicoidal (Helipath) y posicionada a 2.9 cm del fondo del vaso. El queso Mozzarella fue calentado a 60°C durante otros treinta minutos para asegurar que todo el queso estuviera fundido y a igual temperatura a los fines de uniformizar los ensayos. La velocidad de rotación del viscosímetro fue de 1 rpm y la velocidad de desplazamiento ascendente del accesorio de

paso helicoidal fue de  $2.2 \text{ cm min}^{-1}$ . Ambos fueron accionados para comenzar a funcionar simultáneamente. El registrador fue fijado en un rango de atenuación de 10 mV y la velocidad de carta a  $3.0 \text{ cm min}^{-1}$ . Los análisis fueron completados cuando la barra T estaba enteramente afuera de la superficie del queso fundido. Sobre la carta del registrador fue medida la máxima altura de pico y luego este valor fue convertido a Pa.s usando el factor de corrección de la barra T de código E, a una velocidad de 1 rpm recomendada en el manual de operación del Brookfield. Todos los análisis fueron realizados por duplicado.

#### *Aceite liberado*

La cantidad de aceite liberado desde el queso Mozzarella durante el fundido del mismo fue medida usando una versión modificada del método tradicional de dispersión de grasa (Breene y col. 1964). Los discos de queso de 1.76 cm de diámetro y 0.7 cm de espesor fueron cortados con sacabocado en dirección perpendicular a las fibras tal como se describió para el test de fundibilidad. En las cápsulas de Petri se colocaron discos de papel de filtro de 9 cm de diámetro sobre los cuales se apoyaba la muestra de queso. Una porción de cada queso fue colocada sobre el papel de filtro y cubierta. Después de treinta minutos a  $20^{\circ}\text{C}$  las porciones fueron colocadas en el horno a  $100^{\circ}\text{C}$  durante una hora y luego enfriadas a  $20^{\circ}\text{C}$  durante otros 30 minutos. El diámetro de cada anillo de aceite formado sobre el papel de filtro, fue medido con una aproximación de 0.01 cm en cuatro direcciones diferentes; luego se calcularon las medias de las cuatro medidas.

## *Capítulo 3*

### *MADURACION DE QUESO REGGIANITO* *ENVASADO*

### **3-1 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Se usaron 27 hormas de queso Reggianito Argentino provenientes de una industria local (Cabaña y Estancias Santa Rosa) y de la misma tina, para eliminar las variaciones debidas a las condiciones de producción.

Tres quesos fueron analizados antes de la maduración, al principio del experimento.

Nueve quesos fueron almacenados en la forma tradicional (T), en sótanos de maduración a una temperatura de 15 a 17 °C con una humedad de 85 a 90%, sin ser envasados y volteándolos periódicamente. Los restantes quince quesos fueron envasados en película plástica. Ocho de esos quince quesos fueron envasados 30 días después de la manufactura (P30) y los siete restantes 45 días después de la manufactura (P45), a los fines de ver si existían diferencias entre los quesos, atribuibles al momento de la maduración en el que se realizaba el envasado.

Las bolsas conteniendo los quesos fueron selladas al vacío y termocontraídas en todos los casos. Todas las hormas de queso envasadas fueron almacenadas en la misma cámara de enfriamiento durante 8 meses.

Los quesos madurados tradicionalmente desarrollan un marcado perfil de humedades durante el almacenamiento, en comparación con los envasados en películas plásticas, por lo cual el procedimiento de muestreo fue diseñado de manera que se obtuvieran muestras representativas para ambos tipos de almacenamiento y sus resultados pudieran ser comparados.

Las muestras fueron obtenidas de un cilindro anular proveniente de las hormas de queso. Las medidas de este cilindro anular eran 21 cm de diámetro externo, 4 cm de diámetro interno y 11 cm de altura, o sea que un cilindro de 4 cm del centro de la horma y una zona de 2 cm de espesor de la zona exterior de la horma fueron descartadas para la toma de muestra.

Los quesos fueron analizados a diferentes tiempos de almacenamiento para determinar: contenido de nitrógeno soluble y nitrógeno no proteico, actividad acuosa, contenido de ácidos orgánicos y lactosa y estudiar su comportamiento reológico (ensayos de compresión y relajación). En cuanto a su comportamiento reológico las variables

analizadas fueron: dureza, fuerza en la ruptura, deformación relativa en la ruptura, módulo elástico de equilibrio y viscosidad.

### **3-2 ANALISIS ESTADISTICO**

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza multivariable (MANOVA) y luego, mediante un test de comparaciones múltiples se estudió el efecto tanto del envasado como del tiempo de maduración respecto de las variables analizadas.

Se ha demostrado que una comparación de dos medias se puede realizar con una prueba F, una prueba t o con el cálculo de un intervalo de confianza para la diferencia entre dos medias; sin embargo cuando se intenta realizar muchas o todas las comparaciones posibles, no se pueden hacer comparaciones independientes sin que exista la probabilidad de rechazo equivocado de al menos una de las hipótesis y se obtenga un error muy grande.

Por este motivo se eligió el test de Tukey para la comparación simultánea de pares de medias, ya que estos procedimientos simultáneos fueron diseñados para mantener los niveles de protección (Wilkinson, 1990). Este test permite la formación de intervalos de confianza simultáneos para todas las comparaciones pareadas. Las diferencias entre pares de medias y los ensayos F fueron considerados significativos cuando las probabilidades eran menores de 0.05.

Las curvas de relajación y los modelos matemáticos obtenidos para los parámetros de textura se determinaron mediante regresiones no lineales considerando cada tiempo de maduración como un grupo.

En análisis químico y sensorial las medidas se hacen sobre muchas variables de dos o más grupos de tratamientos con el propósito de determinar si los grupos son distintos unos de otros. Un procedimiento estadístico para identificar las variables por diferencias sucesivas es el análisis de discriminantes. El propósito esencial del análisis de discriminantes es la clasificación de un objeto dentro de uno de los muchos grupos mutuamente excluyentes, considerando sus variables medidas. Es entonces una manera de predecir la clase a la cual las variables pertenecen. El análisis de discriminantes es el

procedimiento más adecuado, entre otros procedimientos de análisis multivariantes, para predecir lo anteriormente expuesto. Antes de la existencia del análisis matemático computacional era difícil de aplicar y poco práctico. Las publicaciones existentes a partir de los años 1960 muestran que con la aparición de los módulos computacionales (como SYSTAT por ejemplo) su aplicación es posible. Fisher introdujo la función discriminante lineal. Básicamente es el concepto de transformar las variables medidas a una nueva escala. Se puede encontrar una combinación lineal de las variables tales que la distancia media entre las clases pueda ser maximizada. El análisis discriminante utiliza una combinación pesada de las variables cuantitativas para predecir la clase discreta a la cual un objeto pertenece.

La fórmula general de la función discriminante es:

$$L = b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_p x_p$$

donde L es el puntaje pesado del componente lineal.

Esta medida ha sido reducida a un sólo puntaje compuesto, L. Cuando los  $x_i$  tienen una distribución normal multivariante, entonces L tiene una distribución normal univariante. Se asume que las matrices varianza-covarianza de las p medidas son homogéneas para todas las clases. Cuando se consideran solamente dos grupos, una función discriminante lineal simple sirve para discriminar entre grupos. Cuando existen tres o más grupos de tratamientos un eje no es necesariamente suficiente para una discriminación potencial. La primera función discriminante derivada es la que separa las diferencias entre grupos. Una segunda función es luego derivada (la cual es ortogonal a la primera) y separa los grupos con la información remanente no contenida en la primera función. Este procedimiento continúa hasta que se derivan todas las funciones posibles. El número total de funciones es uno menos que el número de grupos, o igual al número de variables de respuesta (i) usadas, cualquiera sea el menor.

Dados, por ejemplo, tres grupos A, B y C y una matriz de dimensiones  $i \times p$ , donde i es el número de variables y p el número de objetos analizados, se estiman las tres funciones discriminantes para cada grupo según:

$$\text{Grupo A: } L_{Aj} : b_0 + x_{ij} b_1 + \dots + x_{ij} b_i$$

$$\text{Grupo B: } L_{Bj} : b_0' + x_{ij} b_1' + \dots + x_{ij} b_i'$$

$$\text{Grupo C: } L_{Cj} : b_0'' + x_{ij} b_1'' + \dots + x_{ij} b_i''$$

$L_{Aj}$  ,  $L_{Bj}$  y  $L_{Cj}$  se denominan puntajes discriminantes. Los coeficientes "b" se calculan de manera de obtener la mejor separación entre los grupos, maximizando el cociente entre la variabilidad entre grupos y la variabilidad dentro del grupo de los puntajes L.

Para computar las funciones discriminantes, puntajes y clasificación de probabilidades, se ensayó la hipótesis nula que los grupos eran equivalentes. Una vez obtenidos los puntajes discriminantes se calcularon los puntajes discriminantes medios de cada grupo (por ejemplo  $L_A$  ,  $L_B$  ,  $L_C$  ).

Se utilizó el método de clasificación propuesto por Mahalanobis (Pigott, 1982), el que ajusta el cuadrado de la distancia entre cada objeto y la media de cada grupo, utilizando la inversa de la matriz de varianza-covarianza combinada dentro de los grupos.

Para cada observación se calcula la distancia de Mahalanobis a cada grupo "k" según:

$$D_k^2 = (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}_k)^T \text{Cov}^{-1} (\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}_k)$$

donde  $\mathbf{x}$  denota una observación a ser clasificada,  $\mathbf{x}_k$  es el vector de respuesta media del grupo k, y  $\text{Cov}^{-1}$  es la inversa de la matriz varianza-covarianza. Una observación se clasifica en el grupo para el que  $D_k^2$  sea mínimo.

La distancia de Mahalanobis (basada en la distancia al cuadrado entre los centros de los grupos) y las probabilidades posteriores fueron calculadas porque los efectos involucran una variable clasificatoria. Las distancias fueron calculadas en el espacio mismo del discriminante. La localización de un grupo en ese espacio, el más parecido, hace que pertenezca a ese grupo.



Las probabilidades de pertenencia de los miembros del grupo fueron calculadas por estas distancias a través del código computacional (SYSTAT). Los coeficientes de clasificación ( $b$ ) y las constantes ( $b_0$ ) fueron calculadas para cada grupo de queso.

En nuestro caso, cada muestra de queso se consideró como un objeto, y la matriz de observaciones corresponde al contenido de los ácidos orgánicos analizados. La clasificación en grupos se realizó según el tiempo de maduración de las muestras.

El análisis de discriminantes dice al analista a qué grupo pertenece probablemente un objeto, pero no cuán separadas están las clases o grupos. El análisis canónico permite superar esta deficiencia, ya que establece relaciones entre conjuntos de variables. Su objetivo es encontrar una combinación lineal  $z_1$ , del conjunto  $x$ , y las medidas "y" de modo que la correlación entre  $x$  e "y" sea maximizada. Luego se encuentra un segundo conjunto  $z_2$  de correlaciones, no correlacionadas con el primer conjunto. Entonces:

$$z_1 = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_i x_i = \text{variable canónica 1}$$

$$z_2 = a'_0 + a'_1 x_1 + a'_2 x_2 + \dots + a'_i x_i = \text{variable canónica 2}$$

Se puede entonces graficar las posiciones de las muestras individuales en el espacio de discriminantes para visualizar el grado de solapamiento existente entre los grupos.

Todos los procedimientos estadísticos fueron realizados usando el software SYSTAT (SYSTAT, Inc., Evenston, I L, USA).

### **3-3 RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **3-3-1 Humedad y actividad acuosa**

Los procesos bioquímicos en quesos madurados en película son similares a aquellos que ocurren en la maduración tradicional. Sin embargo, los quesos sin corteza muestran extractos secos más homogéneos y pérdidas de peso menores (Fradin, 1984).

No fue observada formación visible de hongos en ninguna de las muestras envasadas. La humedad promedio de las zonas muestreadas (W) disminuyó con el tiempo de almacenamiento para todas las muestras de quesos: las no envasadas (control) y las envasadas después de 30 y 45 días de la manufactura (Fig.3-1). Hasta los 100 días el contenido de agua fue similar para los 3 lotes de muestras estudiadas, pero a partir de este momento y para el tiempo restante de la maduración, en las muestras envasadas se observó un contenido de agua mayor que en el control. El contenido de agua en ambos lotes, envasados a diferentes tiempos a partir de la manufactura (P30 y P45), no mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

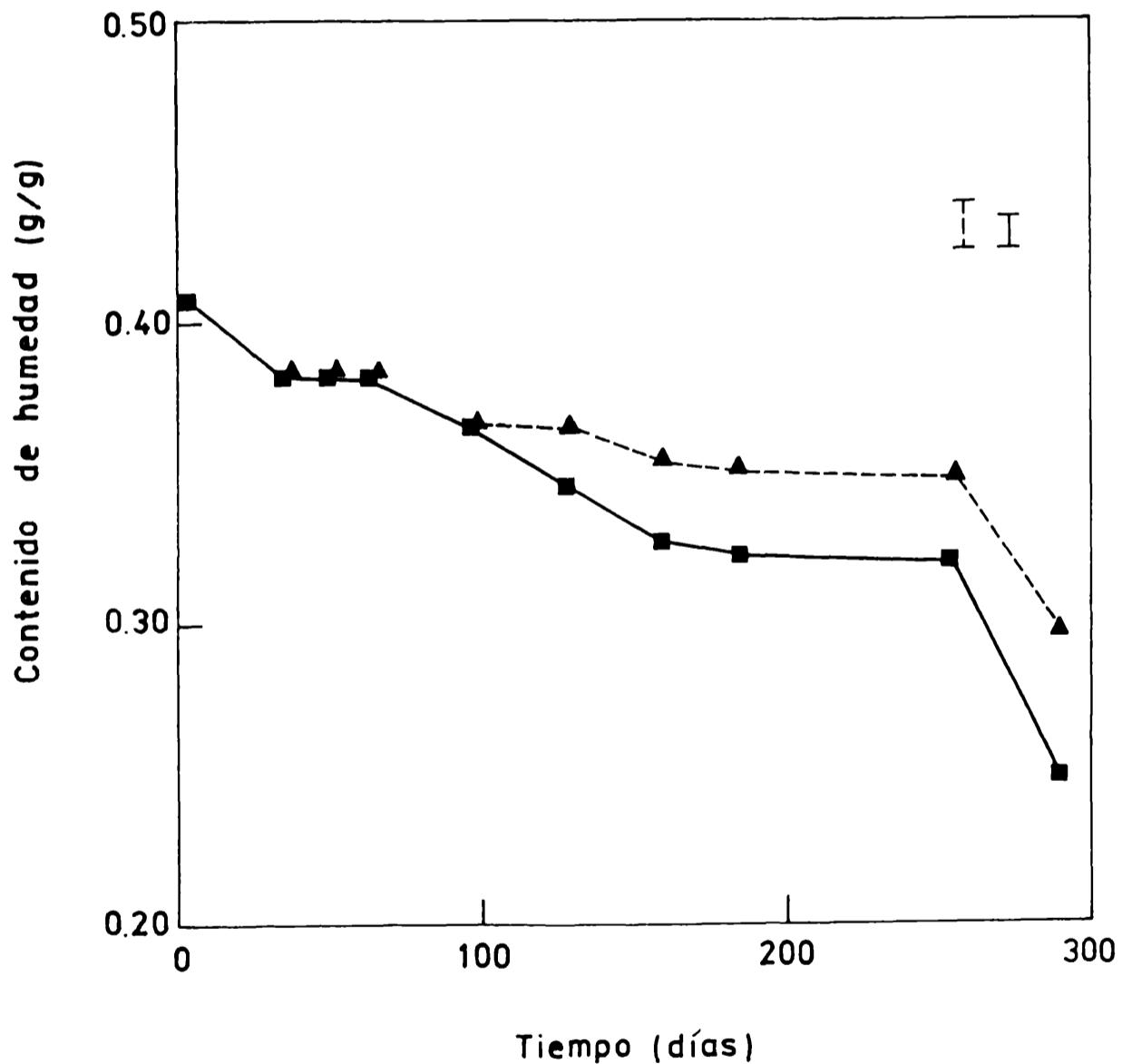


Fig.3-1. Contenido de humedad en función del tiempo de maduración en queso Reggianito Argentino. (■) Maduración tradicional (T), (▲) Quesos envasados (valores medios P30, P45). Las barras indican los correspondientes errores estándar de las medias ( $S_X$ ) obtenidos a partir de la varianza del error del ANAVA.

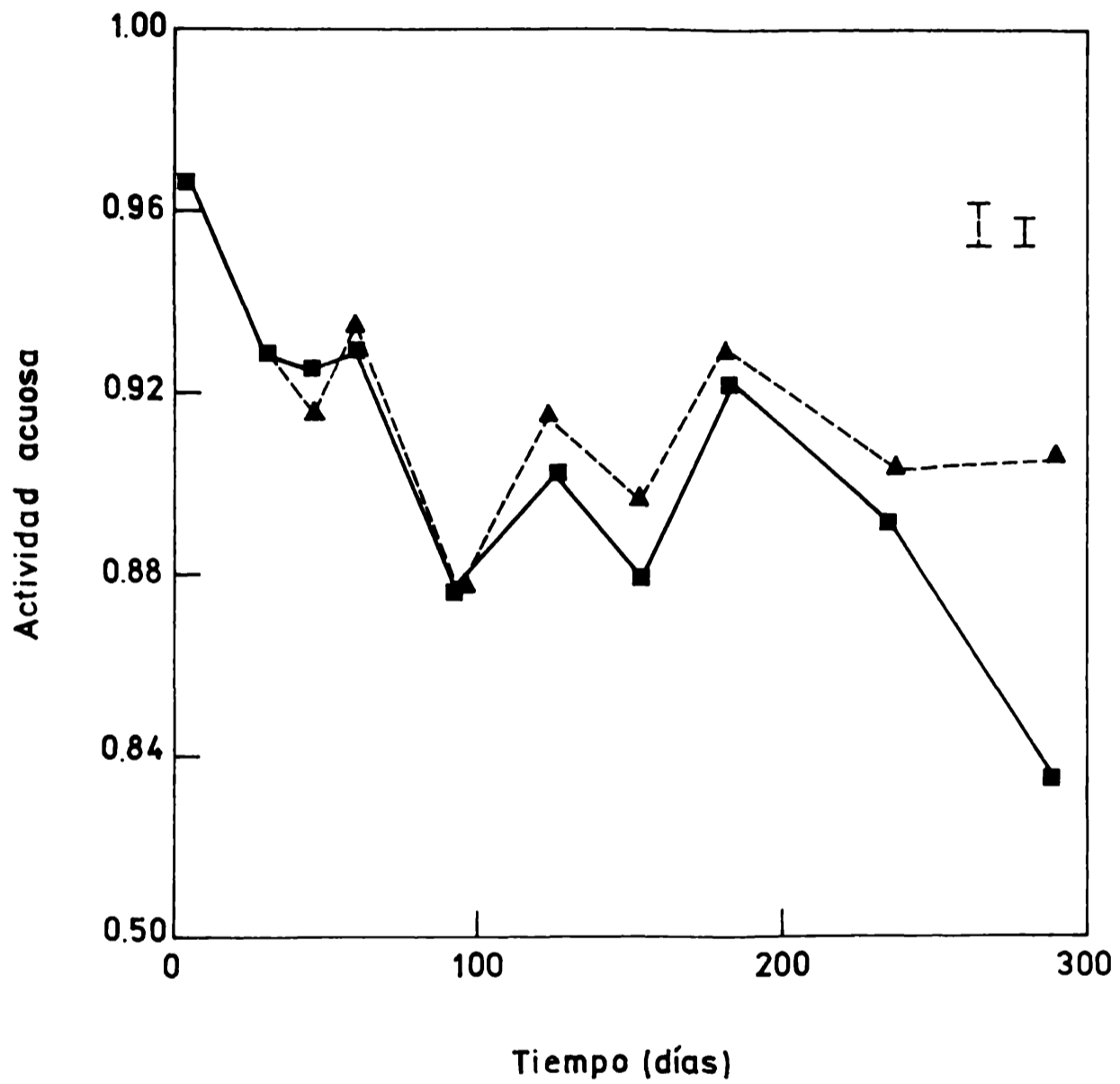


Fig.3-2. Variación de la actividad acuosa con el tiempo de maduración en queso Reggiano Argentino. (■) Maduración tradicional (T), (▲) Quesos envasados (valores medios de P30 y P45). Las barras indican los correspondientes errores estandar de las medias ( $S_{\bar{x}}$ ).

El contenido inicial de agua de las muestras de queso fue de  $406 \text{ g kg}^{-1}$ . Después de 6 meses de almacenamiento (tiempo mínimo requerido para la maduración), las muestras envasadas tenían un contenido de agua de  $350 \text{ g kg}^{-1}$ , valor que es  $20 \text{ g kg}^{-1}$  mayor que el evidenciado en las muestras sin envasar. Se debe enfatizar que este nivel de humedad está dentro de los rangos de valores permitidos (27 a 35%).

La actividad acuosa disminuyó con el tiempo de almacenamiento. La Fig.3-2 muestra una disminución más acentuada para los quesos madurados en forma tradicional. Puede observarse en la misma figura que para los quesos envasados a 30 y 45 días se graficaron los valores promedios ya que no existían diferencias significativas entre los valores hallados para ambos lotes.

### **3-3-2 Proteólisis**

Los quesos evidenciaron un contenido total de nitrógeno de  $44.0 \pm 4 \text{ mg g}^{-1}$  de queso, que corresponde a un contenido total de proteína de  $280 \text{ mg g}^{-1}$ . Tanto el contenido de la fracción de nitrógeno soluble en agua (NS, Fig.3-3) como la fracción de nitrógeno no proteico (NNP, soluble en 12 % de TCA, Fig. 3-4), aumentaron durante el período de almacenamiento para los tres lotes. Estos parámetros están relacionados con la degradación de caseínas que sucede durante el período de maduración. Sin embargo la degradación de proteínas no mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tres lotes de quesos estudiados (T, P30, P45). En los tres casos fue observado un nivel similar de proteólisis con la única diferencia que los quesos envasados contenían un mayor nivel de humedad.

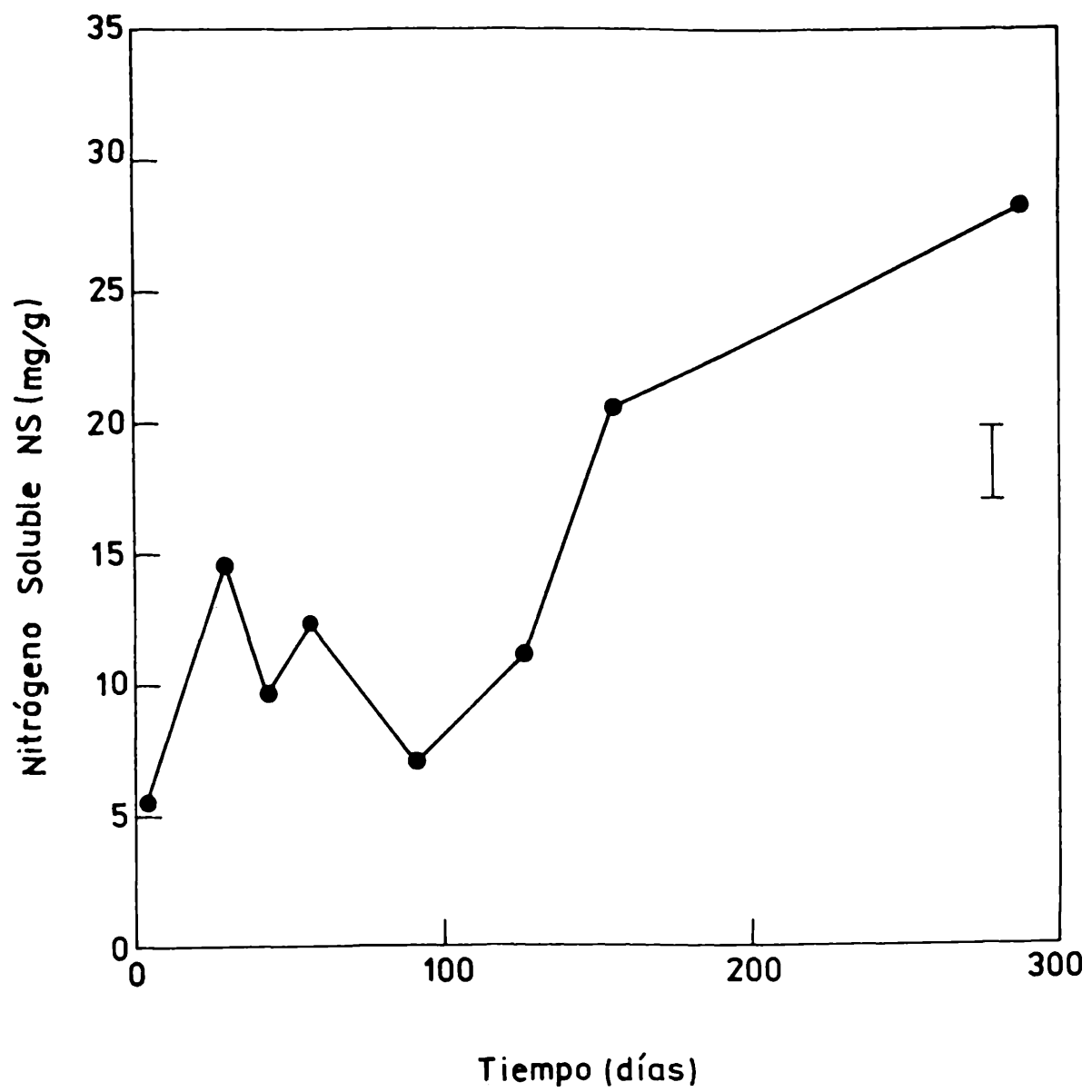


Fig.3-3. Valores medios de Nitrógeno soluble de los tres lotes (T, P30 y P45) de queso Reggianito Argentino en función del tiempo de maduración. La barra indica el error estandar de las medias ( $S_{\bar{X}}$ ).

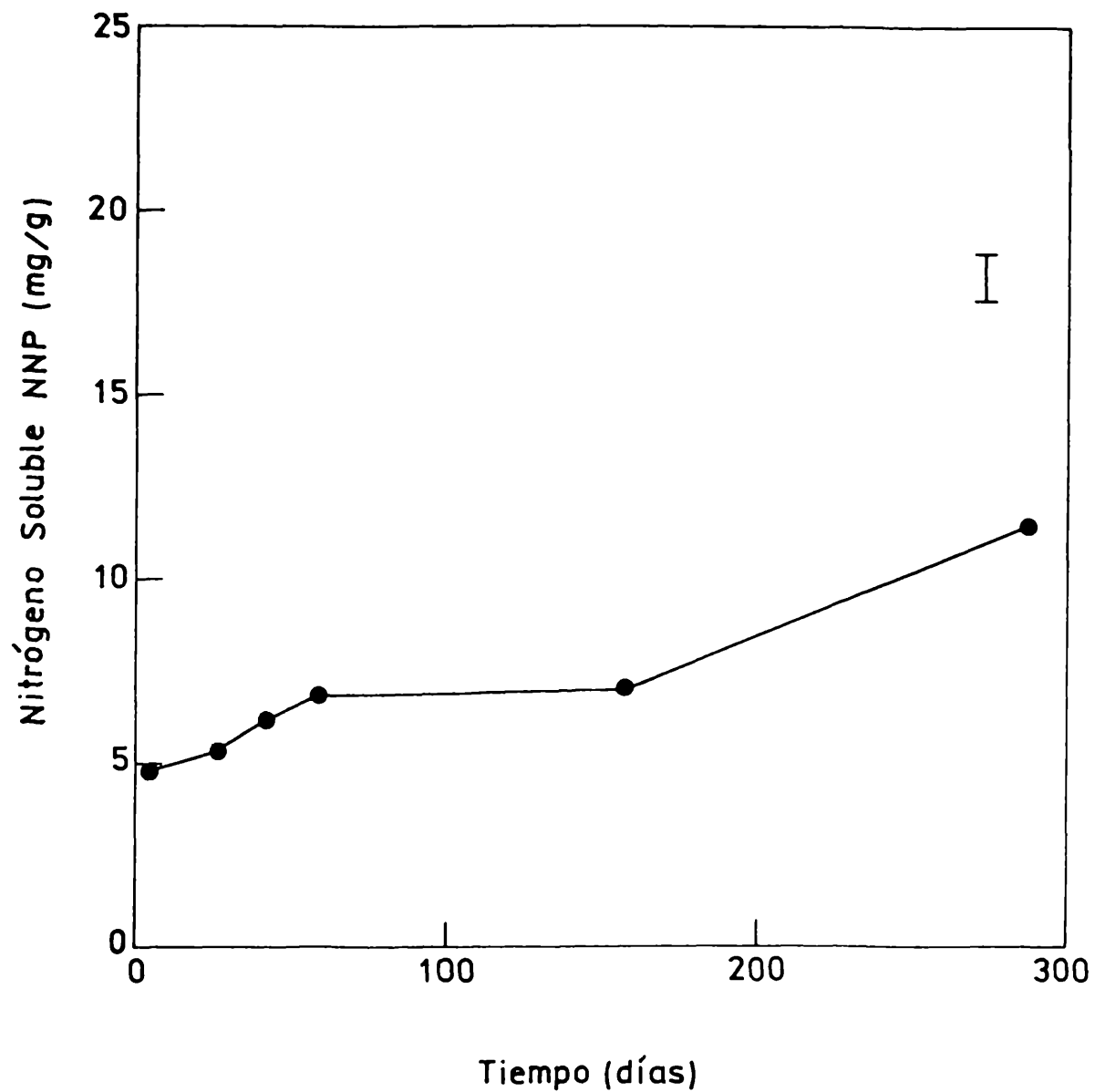


Fig. 3-4. Valores medios de Nitrógeno no proteico, soluble en TCA para los tres lotes de queso Reggiano (T, P30 y P45) en función del tiempo de maduración. La barra indica los errores estandar de las medias ( $S_X$ ).

### 3-3-3 Análisis de textura

#### *Curvas de relajación*

En este estudio se observó que se mantiene una relación lineal entre los valores de tensión verdadera ( $\sigma_v$ ) y deformación relativa verdadera ( $\epsilon_v$ ), para valores menores del 29% de deformación relativa verdadera (equivale a 20% de deformación relativa aparente).

Las curvas de relajación fueron expresadas en forma adimensional como

$F^* = F(t)/F_0$  donde  $F(t)$  es la fuerza a tiempo  $t$  y  $F_0$  es la fuerza inicial antes de la relajación al 20% de compresión. Las curvas fueron ajustadas al modelo de Maxwell generalizado por medio de una regresión no lineal (Bertola y col., 1991). El modelo consiste en un elemento elástico puro y dos elementos maxwellianos conectados en paralelo con lo cual:

$$F^*(t) = F(t)/F_0 = A_\infty + A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (3-1)$$

donde, como se mencionó anteriormente,  $A_\infty$ ,  $A_1$  y  $A_2$  son constantes que dependen de las propiedades viscoelásticas del material y  $\tau_1$  y  $\tau_2$  son los tiempos de relajación. Cuando la ecuación (3-3) es expresada en función de los módulos elásticos ( $E$ ) se obtiene:

$$E(t) = E_\infty + E_1 \exp(-t/\tau_1) + E_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (3-2)$$

Los módulos elásticos y las viscosidades de cada elemento se calcularon según las ecuaciones (2-11) y (2-12) del párrafo 2-2-6 respectivamente, considerando los datos correspondientes a 6 ensayos en cada caso, y la respectiva  $F_0$  promedio.

Ni los módulos elásticos ni las viscosidades mostraron diferencias significativas hasta llegar al día 255; después de ese tiempo fue observado un marcado incremento.

Para los cinco parámetros viscoelásticos estudiados, los valores correspondientes a los quesos no envasados fueron mayores que los de los quesos envasados. Por consiguiente los quesos madurados en forma tradicional fueron más duros (mayor viscosidad) y menos elásticos (mayor módulo elástico) que los quesos madurados envasados (Sherman, 1976).

TABLA 3-1 Valores medios de parámetros viscoelásticos correspondientes a períodos de almacenamiento entre 3 y 255 días

Parámetros viscoelásticos	Quesos no envasados	Quesos envasados
$E_{\infty}$ (kPa)	107.99	84.87
$E_1$ (kPa)	127.07	100.74
$E_2$ (kPa)	102.85	80.24
$\eta_1$ (Pa s)	$3.85 \times 10^5$	$3.17 \times 10^5$
$\eta_2$ (Pa s)	$7.84 \times 10^6$	$5.28 \times 10^6$

*Análisis de las curvas fuerza-deformación*

Los parámetros de textura: dureza (D), fuerza en la ruptura ( $F_r$ ) y deformación en el punto de ruptura ( $\epsilon_r$ ), no mostraron diferencias significativas durante el tiempo de maduración entre las muestras de quesos envasados a 30 y 45 días (P30 y P45). Los valores de dureza y fuerza en la ruptura mostraron diferencias significativas entre los quesos madurados en forma tradicional y los madurados en película. Los quesos envasados fueron menos duros y tuvieron menor fuerza en la ruptura. Sin embargo, la deformación en el punto de ruptura no mostró diferencia alguna entre los tres lotes estudiados. Los valores medios experimentales se muestran en las Figs. 3-5, 3-6 y 3-7.

*Relaciones entre parámetros reológicos, humedad y proteólisis*

Tanto la dureza como la fuerza en la ruptura disminuyeron al principio del proceso de maduración hasta aproximadamente los 60 días. Durante este período, la humedad mostró una pequeña variación, mostrando una disminución a los 30 días y permaneciendo luego prácticamente constante hasta los 60 días. Desde este tiempo de maduración y hasta aproximadamente los 120 días, la humedad mostró una disminución, al mismo tiempo que aumentaban la dureza y la fuerza en la ruptura. Entre los 120 y 255 días, la humedad no varió significativamente mientras que los dos parámetros de textura mencionados



disminuyeron. Entre 255 y 290 días, la humedad disminuyó rápidamente, mientras que la dureza y la fuerza en la ruptura aumentaron.

Diferentes ecuaciones fueron propuestas para modelar matemáticamente las relaciones entre la variación de la dureza, la fuerza en la ruptura y la deformación relativa en el punto de ruptura con el descenso de la humedad y el aumento del contenido de nitrógeno soluble que ocurre durante la maduración. El modelo probado que resultó el más adecuado para dureza (D) y fuerza en la ruptura ( $F_r$ ) fue:

$$D = \frac{B_1}{W} + \frac{C_1}{NS} \quad (3-3)$$

$$F_r = \frac{B_2}{W} + \frac{C_2}{NS} \quad (3-4)$$

Para la ec. 3-3 los coeficientes fueron  $B_1 = 14.2$  ( $\sigma = 1.4$ ) y  $C_1 = 213$  ( $\sigma = 41$ ). Siendo W el contenido de humedad (g de agua por g de queso) y NS el nitrógeno soluble (mg de nitrógeno soluble por g de queso); el coeficiente de correlación fue  $R = 0.980$ . En el caso de fuerza en la ruptura los valores obtenidos fueron  $B_2 = 7.3$  ( $\sigma = 1.4$ ),  $C_2 = 239$  ( $\sigma = 41$ ) y  $R = 0.962$ . Para la deformación en el punto de ruptura el modelo que mejor se ajustaba a los datos experimentales fue el siguiente:

$$\frac{1}{\epsilon_r} = B_3 W + C_3 \quad (3-5)$$

con  $B_3 = -0.19$  ( $\sigma = 0.02$ ),  $C_3 = 0.09$  ( $\sigma = 0.006$ ) y coeficiente de correlación  $R = 0.964$ .

Los valores experimentales de dureza (D) (Fig. 3-5), fuerza en la ruptura ( $F_r$ ) (Fig.3-6) y deformación relativa en el punto de ruptura ( $\epsilon_r$ ) (Fig.3-7) son mostrados como una función del tiempo de maduración así como los valores predichos por los correspondientes modelos. Los valores predichos fueron calculados a través de las ecs.

3-3, 3-4 y 3-5, utilizando a cada tiempo el valor experimental de contenido de agua y de

nitrógeno soluble. Para los tres parámetros estudiados se obtuvo una coincidencia satisfactoria para los valores medidos y calculados.

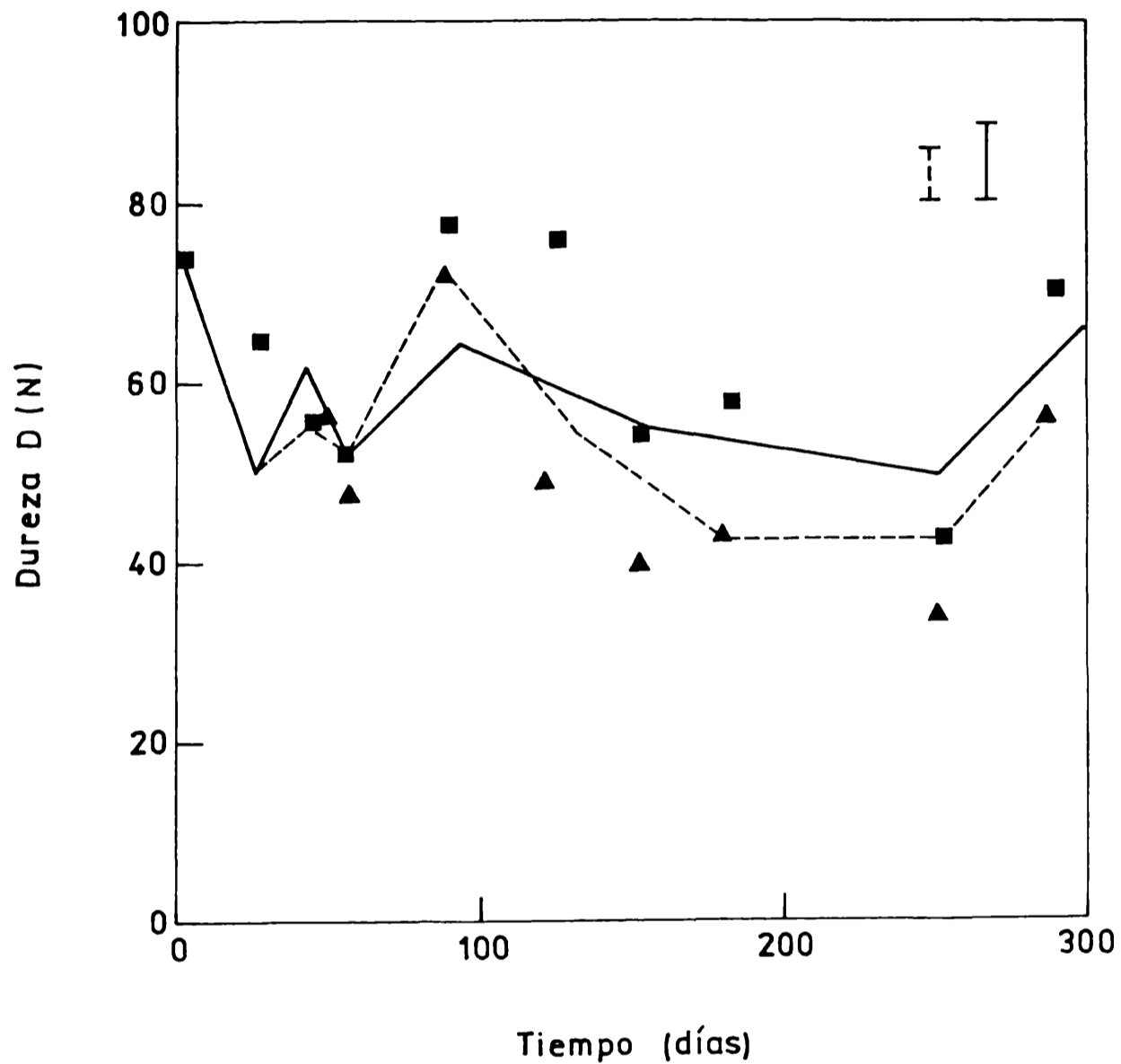


Fig. 3- 5. Dureza en función del tiempo de maduración en queso Reggianito Argentino. Valores experimentales: (■) Maduración tradicional, (▲) Quesos envasados (medias de los lotes P30 y P45). Valores predichos por el modelo matemático: (—) Maduración tradicional, (-----) Quesos envasados. Las barras indican los correspondientes errores estandar de las medias ( $S_{\bar{X}}$ ).

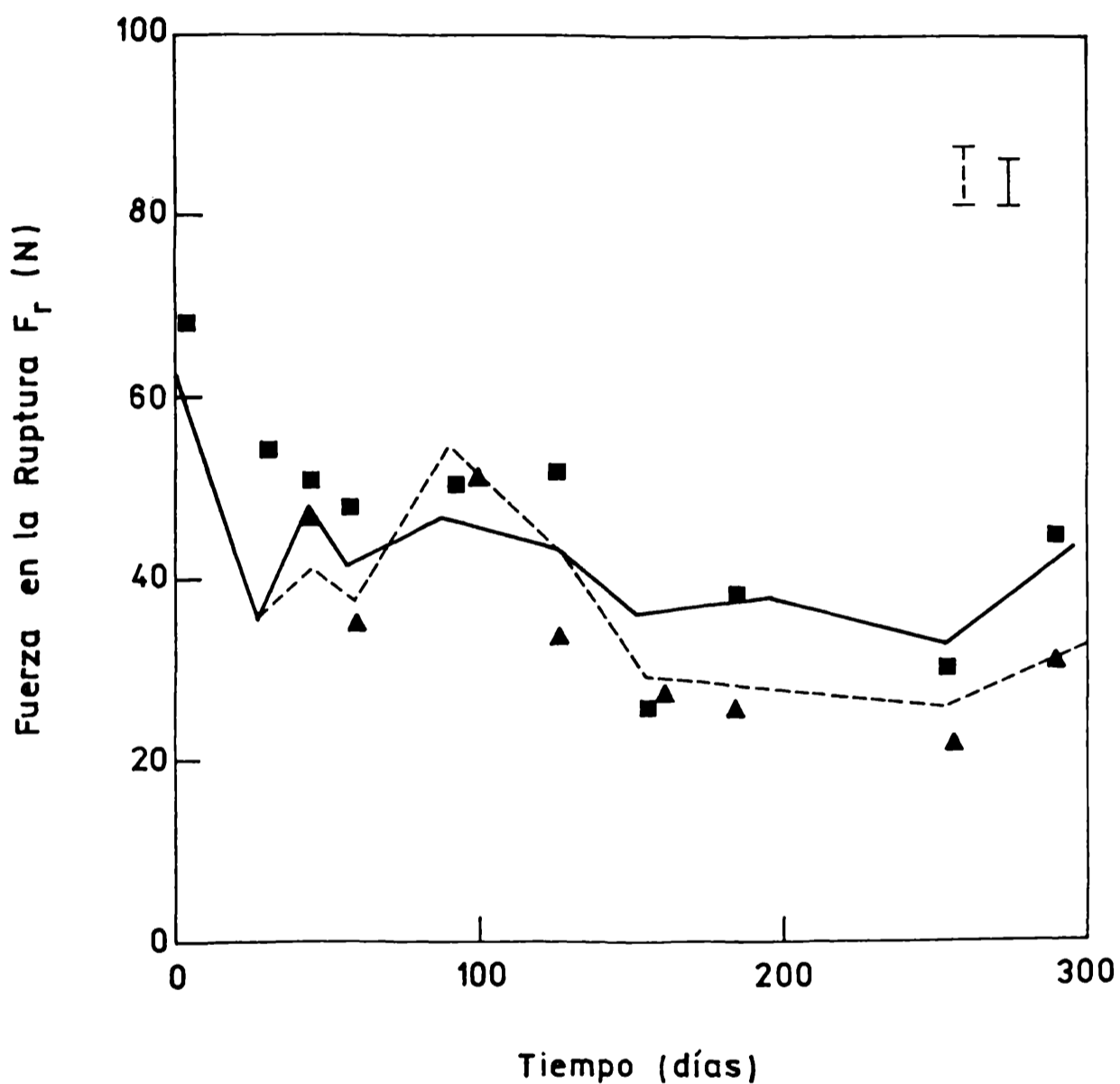


Fig. 3-6. Fuerza en la ruptura en función del tiempo de maduración. Valores experimentales: (■) Maduración tradicional, (▲) Quesos envasados (valores medios de los lotes P30 y P45). Valores predichos por el modelo matemático: (—) Maduración tradicional, (-----) Quesos envasados. Las barras indican los correspondientes errores estandar de las medias ( $S_{\bar{X}}$ ).

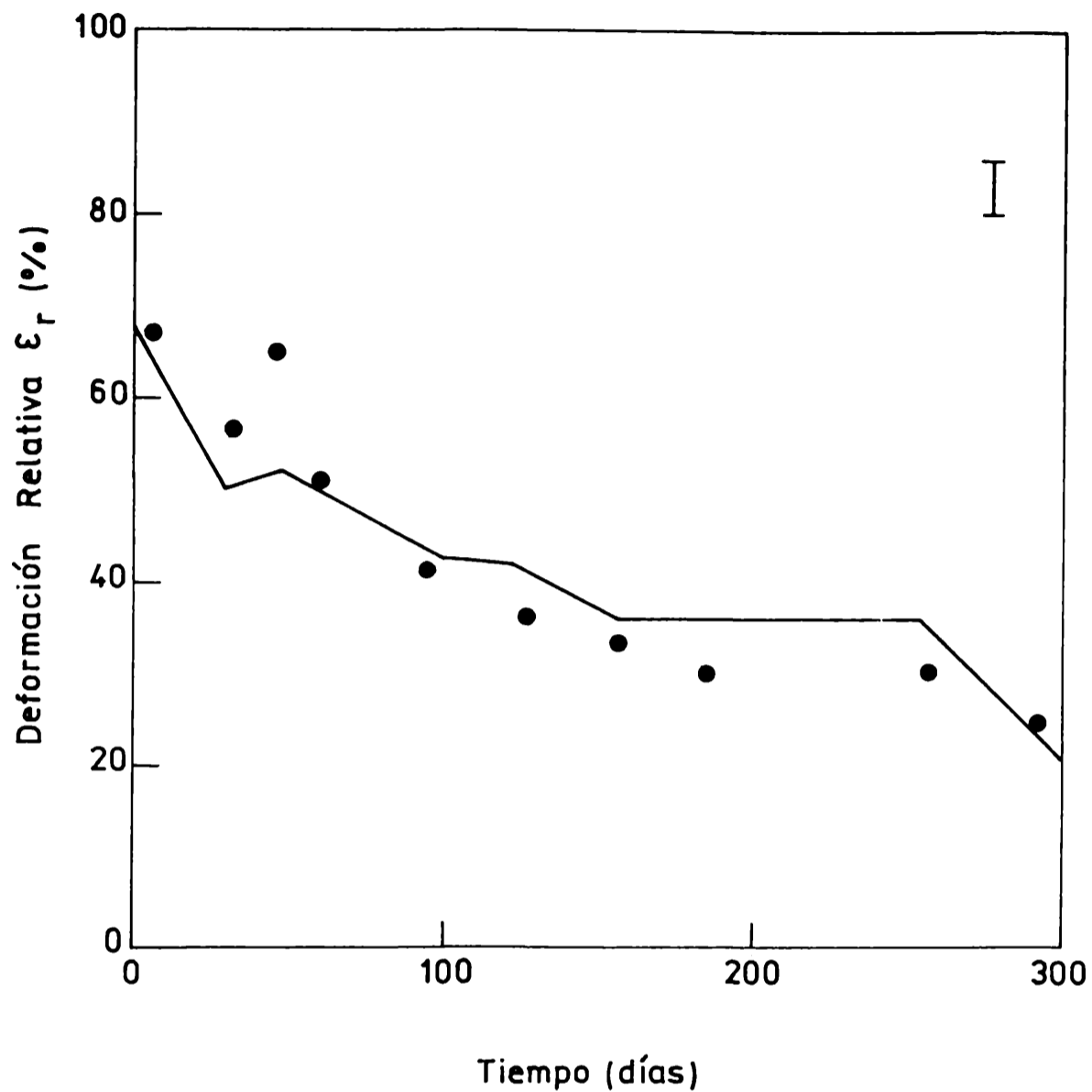


Fig. 3-7. Deformación relativa en el punto de ruptura en queso Reggiano Argentino. (●)Valores medios experimentales de los lotes de quesos tradicional y envasados (P30 y P45). (—) Valores predichos por el modelo matemático. La barra indica el error estándar de las medias ( $S_x$ ).

Debe notarse que el aumento en el contenido de nitrógeno soluble produce una disminución en la dureza y en la fuerza en la ruptura. Sin embargo esta disminución puede ser detectada solamente cuando la humedad no varía significativamente. La disminución en el contenido de agua conduce a un incremento en los parámetros de textura medidos lo cual enmascara la disminución debida a la proteólisis. La deformación en el punto de

ruptura fue independiente de la fracción de nitrógeno soluble a todos los contenidos de agua.

Los quesos en sus primeros estadios de la maduración ven modificada su estructura por los diferentes contenidos de sal, grasa y humedad. Los niveles de humedad en el queso tienen alta influencia en la estructura básica del mismo. Los quesos que tienen relativamente baja humedad tienden entonces a volverse cada vez más duros con el tiempo de almacenamiento y más resistentes a la deformación. Resulta importante la relación caseína intacta/humedad respecto de la textura. Esta relación cambia marcadamente en las dos primeras semanas de la maduración. Pequeños cambios en la relación humedad/caseína resultan en grandes cambios en la humedad disponible, ya que gran parte de la humedad actúa como puente entre las caseínas y sus productos de degradación. Aún pequeñas disminuciones de la actividad acuosa hacen disminuir la velocidad de actividad proteolítica en el queso. Además, la relación de cuajo residual a caseína es menor en quesos de baja humedad y la velocidad en los cambios de textura es entonces menor. Creamer y Olson (1982) trabajando en quesos Cheddar cuyos pH estaban entre 4.88 y 5.4 y con contenidos de humedad comprendidos entre 34.9 y 39.7% y contenidos de sal entre 1.2 y 1.79% concluyeron que en el desarrollo de la textura durante la maduración se pueden distinguir dos fases. La primera tiene lugar entre los siete y los catorce días cuando la gomosidad de los quesos jóvenes se transforma, dando un producto más homogéneo. Ya que la caseína es la única fase sólida continua, esto sugiere que la proteólisis de la caseína, que sostiene la estructura del queso, ha tenido lugar. La red de caseína se debilita cuando sólo alrededor del 20% de los puentes de la  $\alpha_{s1}$  se hidrolizan por el coagulante para dar péptidos  $\alpha_{s1}I$ . Estos péptidos están presentes en las primeras etapas de la maduración en todos los tipos de quesos.

La segunda etapa involucra un cambio más gradual de textura, a medida que el resto de la  $\alpha_{s1}$  caseína se rompe a lo largo de días o meses de almacenamiento. Los estudios en queso Cheddar mostraron que el 85% de la  $\alpha_{s1}$  caseína está intacta durante los primeros 14 días de la maduración y el restante 15% está como producto hidrolizado  $\alpha_{s1}I$ . El 95% de la  $\beta$  caseína, sin embargo, permanece constante aún después de diez semanas de almacenamiento.

### **3-3-4 Lactosa y ácidos orgánicos**

A través del análisis cromatográfico se vio que el contenido de lactosa no era afectado significativamente ni por el período de maduración, ni por el hecho de que los quesos maduraran sin envasar o fueran envasados a los 30 o 45 días. El valor medio del contenido de lactosa fue de  $4.9 \text{ mg g}^{-1}$  ( $\sigma = 0.3$ ). La concentración residual de lactosa depende, entre otras cosas, de la actividad de las bacterias ácido lácticas, de la cantidad de lactosa removida durante la manufactura del queso y de la concentración de NaCl en el queso (Olson, 1990). Según Mora y col. (1984), los resultados de la fermentación del ácido láctico en las primeras 48 horas después de la manufactura del queso, mostraron que el crecimiento de las bacterias ácido lácticas termófilas y la hidrólisis de la lactosa dependen principalmente de la velocidad a la cual la cuajada es enfriada luego de ser sacada de la batea. La temperatura en el centro de los quesos de determinadas dimensiones permanece a más de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta las 10 horas, mientras que en el exterior disminuye a aproximadamente  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  en 2 horas. Como consecuencia de esto el crecimiento bacteriano en el exterior comienza antes y es más intenso en el exterior que en el interior del queso y el metabolismo de los azúcares se ve afectado, lo mismo que el desarrollo de la acidez. Después de las primeras 48 horas el número de bacterias, el pH y la concentración de lactato no tienen los mismos valores en todo el queso y estas diferencias afectarían la maduración posterior.

La determinación cuantitativa de ácidos orgánicos y lactosa pueden ser usadas para entender el metabolismo de los microorganismos, monitorear la actividad del cultivo iniciador y seguir los cambios cualitativos durante la maduración del queso y de esta manera ser clasificados a través de este análisis según su tiempo de afinado (Bevilacqua y Califano, 1989). En particular los ácidos orgánicos contribuyen al flavor de los quesos más añejados. En la figura 3-8 se muestra un cromatograma típico de queso Reggiano Argentino para el estudio de los ácidos orgánicos. Puede decirse que la concentración total promedio de los mismos en las hormas de quesos, mostró un aumento a lo largo de todas las etapas de la maduración (Fig.3-9); además el tipo de envasado (P30 o P45) no afectó estos resultados.

La concentración inicial de ácido láctico observada fue de aproximadamente 77% del contenido total de ácidos puesto que la primera función de los microorganismos utilizados en el queso es producir ácido láctico a partir de lactosa y a grandes velocidades en las primeras etapas; el ácido láctico además actúa inhibiendo contaminantes como por ejemplo los coliformes (Scott, 1985). Después de un almacenamiento de tres meses el ácido láctico representó un 58% del contenido total de ácidos y llegó al 34% a los 255 días de maduración.

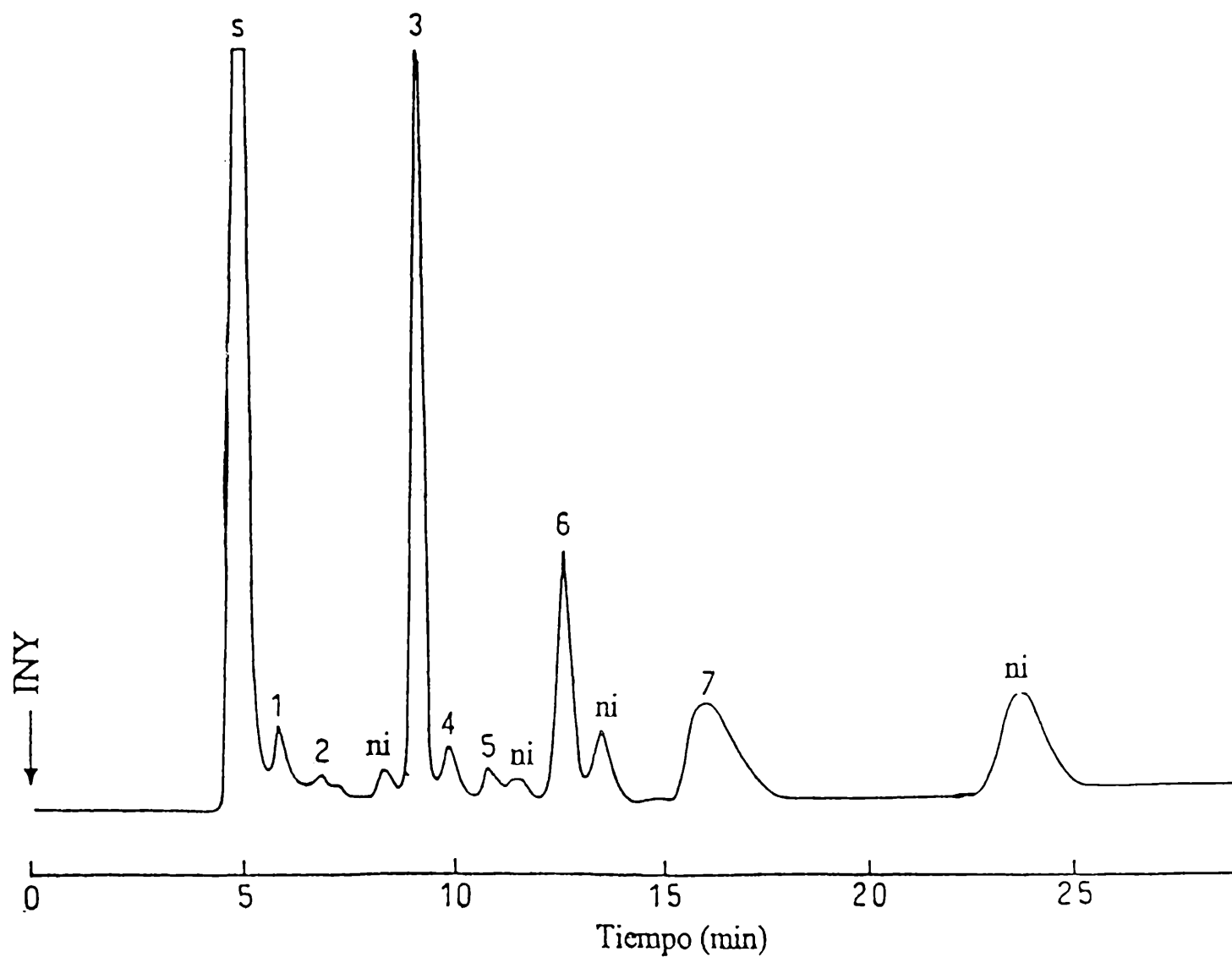


Fig. 3-8. Cromatograma típico obtenido por HPLC a 214 nm de longitud de onda de queso Reggianito Argentino (4 meses de maduración tradicional) de los ácidos: (1) cítrico y orótico, (2) pirúvico, (3) láctico, (4) úrico y fórmico, (5) acético, (6) propiónico, (7) butírico, (ni) no identificado.

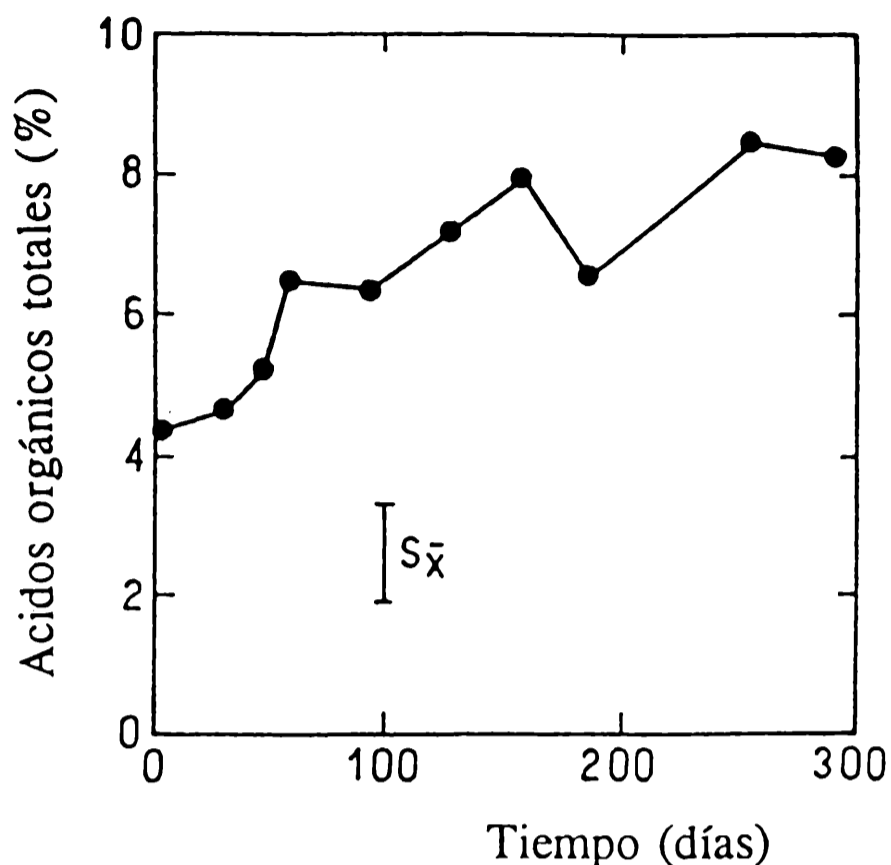


Fig. 3-9. Cambios en el contenido total de ácidos orgánicos en queso Reggiano Argentino. Valores medios de los tres lotes (T, P30 y P45). La barra indica el error estándar de las medias.

Los ácidos butírico y propiónico representaban el 16% y el 1.4% respectivamente del contenido total de ácidos orgánicos inicialmente. Después de un período de maduración de seis meses la concentración de ambos pasó a ser de 26% y 37% del total y al finalizar el experimento el ácido propiónico constituía el 42% del total. Las concentraciones de los ácidos butírico, propiónico y orótico aumentaban a medida que la maduración progresaba aunque lo hacían a diferentes velocidades (Fig.3-10). Tanto el ácido orótico como el butírico permanecieron aproximadamente constantes después de los cuatro meses de almacenamiento.



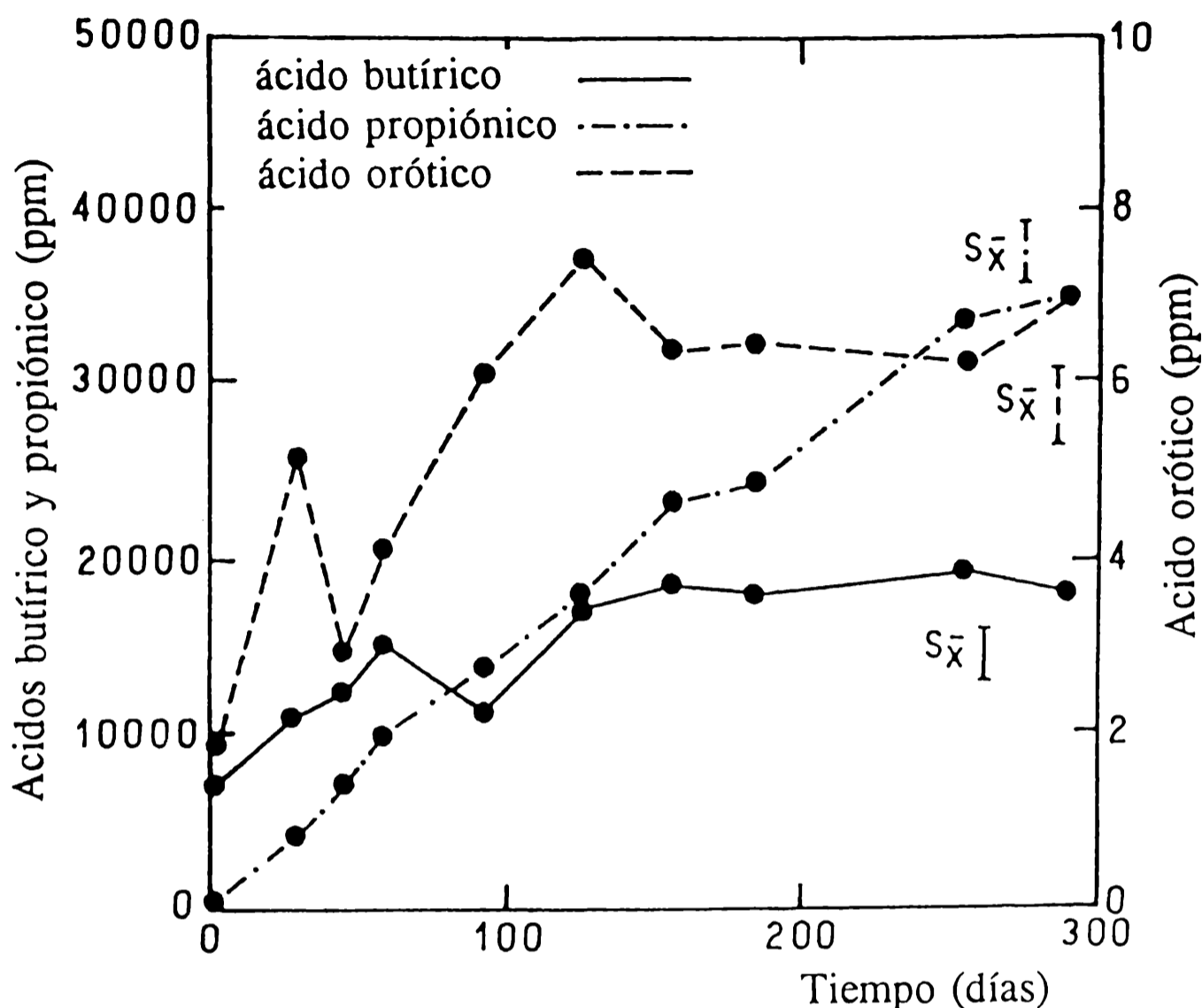


Fig. 3-10. Cambios en las concentraciones de los ácidos orótico, propiónico y butírico en función del tiempo de maduración para los tres lotes de queso Reggiano Argentino (T, P30 y P45). Las barras indican los correspondientes valores de los errores estandar de las medias.

Las propionibacterias producen sales de los ácidos propiónico y acético a través de la fermentación, la cual involucra la doble vía completa del ciclo del piruvato (Law, 1984). Carboni y col., (1990) han sugerido que como las membranas de los glóbulos de la leche se destruyen durante el proceso de maduración, probablemente la grasa es atacada por las lipasas del cuajo, las cuales liberan ácidos grasos como el butírico a partir de los triglicéridos. Arnold y col. (1975) encontraron una correlación directa entre la intensidad de sabor y aroma de queso Romano comercial y el contenido de ácido butírico en el mismo.

El ácido fórmico se formó durante los primeros 46 días de maduración, disminuyendo luego gradualmente. Thomas (1985) mostró que cuando el suministro de hidratos de carbono es limitado una gran proporción de ellos es fermentada a formiato, acetato y etanol por el *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* homofermentativo. El ácido acético mostró cambios irregulares alcanzándose su contenido máximo alrededor de los dos meses de almacenamiento y un mínimo después de seis meses de maduración (Fig. 3-11).

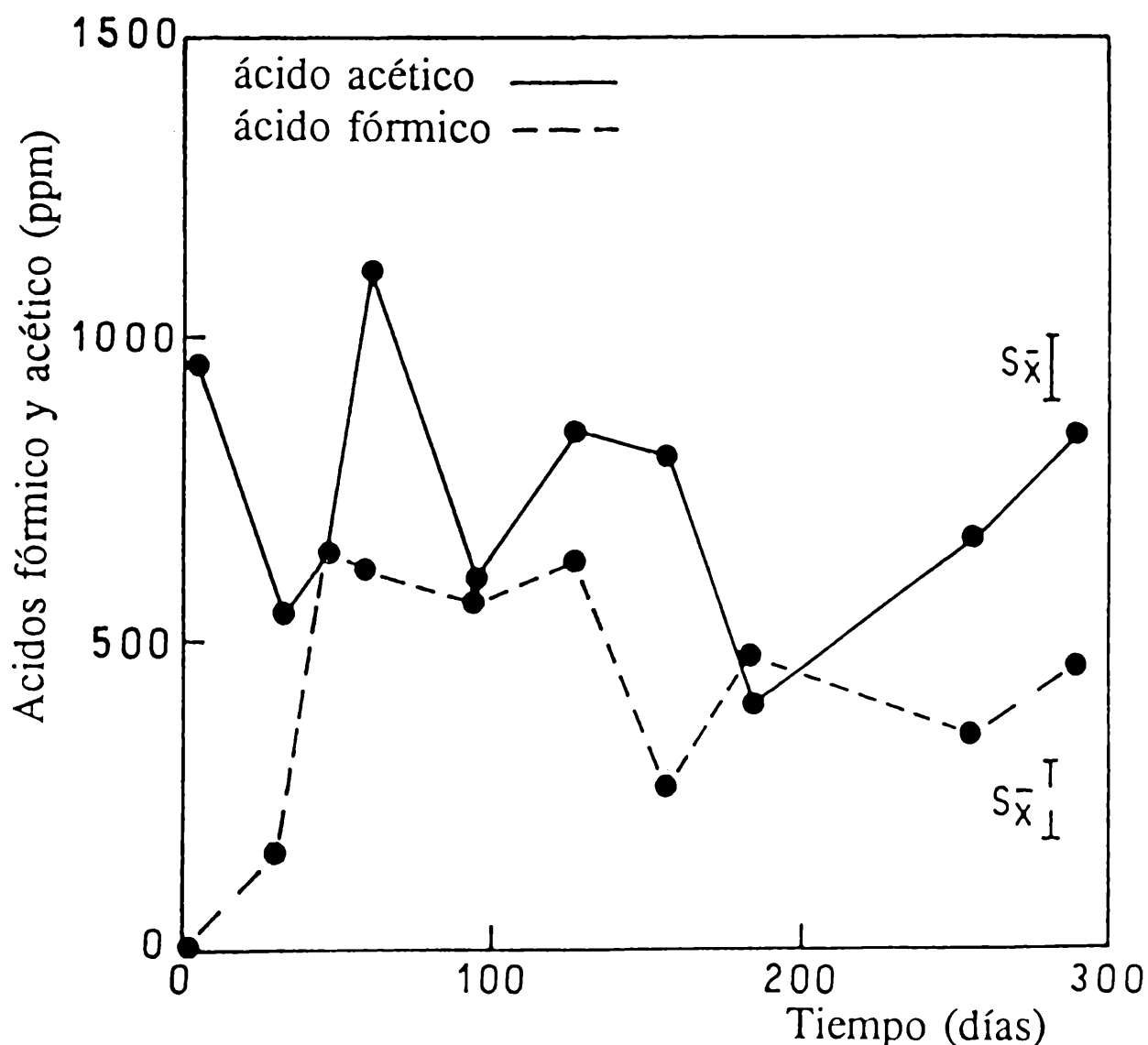


Fig. 3-11. Cambios en los contenidos de los ácidos fórmico y acético para los tres lotes de queso Reggiano Argentino (T, P30 y P45) en función del tiempo de maduración. Las barras indican los correspondientes errores estandar de las medias.

El contenido de ácido láctico presentó un valor constante máximo entre los dos y los cinco meses de almacenamiento y un mínimo alrededor de los seis meses, aumentando

cuando se aproximaba al final del experimento. El contenido de ácido pirúvico disminuyó a medida que avanzó el proceso de maduración (Fig. 3-12). La formación de piruvato es atribuída a los pasos en la vía glicolítica, pero el piruvato es también sustrato de muchas reacciones metabólicas y además puede generarse como producto intermedio en ellas. El ácido pirúvico es usado por las bacterias durante la fermentación de los productos lácteos (Chen y Larson, 1971; Empie y Melachouris, 1978; Larson y Hegarty, 1979).

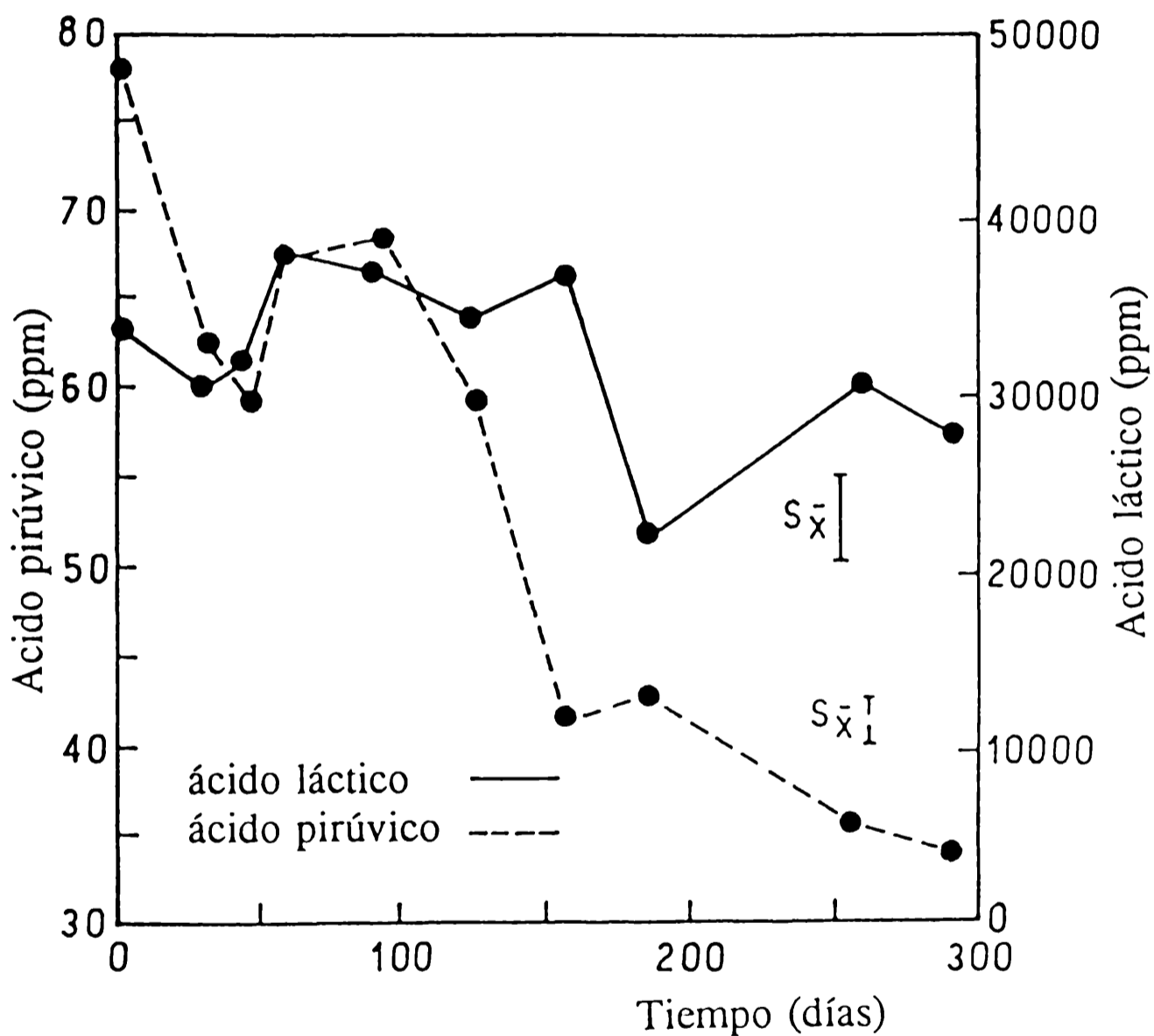


Fig. 3-12. Cambios en los contenidos de ácidos láctico y pirúvico en función del tiempo de maduración para los tres lotes de queso Reggianito Argentino (T, P30 y P45). Las barras indican los correspondientes errores estandar de las medias.

Los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los quesos envasados y no envasados (T, P30 y P45) para los ácidos fórmico, butírico, orótico,

pirúvico, propiónico, acético y láctico para los tiempos estudiados. Los contenidos de los ácidos úrico y cítrico sí presentaron diferencias significativas entre las hormas no envasadas (T) y las envasadas en películas plásticas (P30 y P45); sin embargo los dos grupos de muestras envasadas no mostraron diferencias entre ellos. El ácido úrico no fue detectado en los tres primeros meses de almacenamiento, creciendo rápidamente a partir de ese tiempo (Fig.3-13). En las muestras envasadas se alcanzó un máximo a los cuatro meses de maduración, permaneciendo luego aproximadamente constante. Las muestras no envasadas aumentaron su contenido en ácido úrico cuando se sobrepasaron los cuatro meses de almacenamiento, alcanzando un máximo que duplicaba la cantidad presente en las muestras envasadas a 30 y 45 días, para disminuir luego rápidamente hasta la última etapa del almacenamiento.

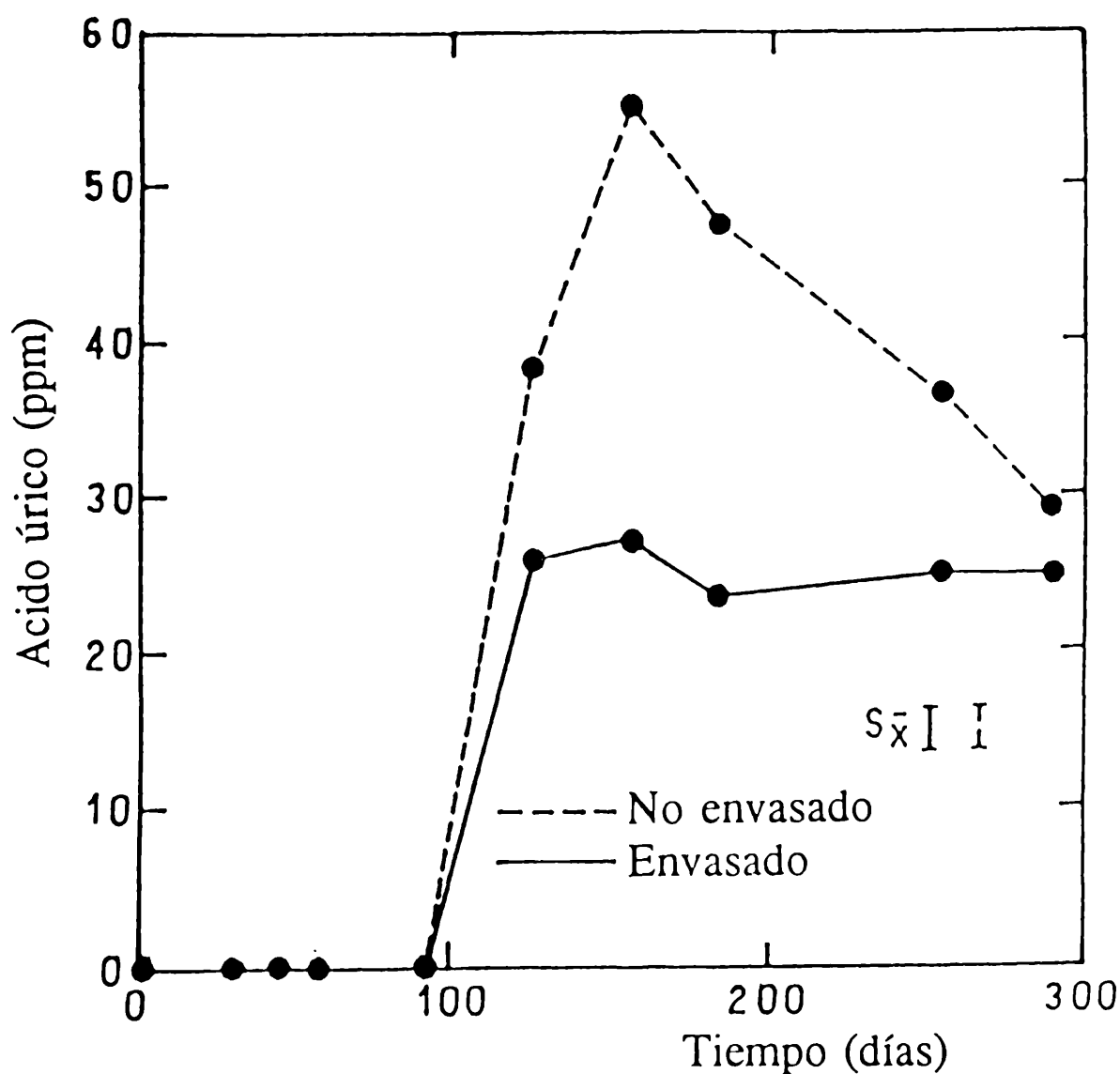


Fig. 3-13. Cambios en el contenido de ácido úrico durante la maduración de queso Reggiano Argentino en muestras envasadas y maduras tradicionalmente. Las barras indican los errores estandar de las medias.

El contenido de ácido cítrico disminuyó abruptamente entre los 46 y los 59 días de almacenamiento. Después de este tiempo tuvo un comportamiento fluctuante con una leve tendencia a disminuir hacia el final de la maduración (Fig 3-14). Esta disminución puede ser explicada por el metabolismo del citrato. Sin embargo el metabolismo del citrato suele ser importante solamente en los cultivos de mesófilos. Bottazzi y Dellaglio (1967) y Groux (1973) informaron que ciertas cepas del *Streptococcus Salivarius* subesp. *thermophilus* producían trazas de diacetilo en leche, infiriendo de esto que el citrato podría haber sido metabolizado.

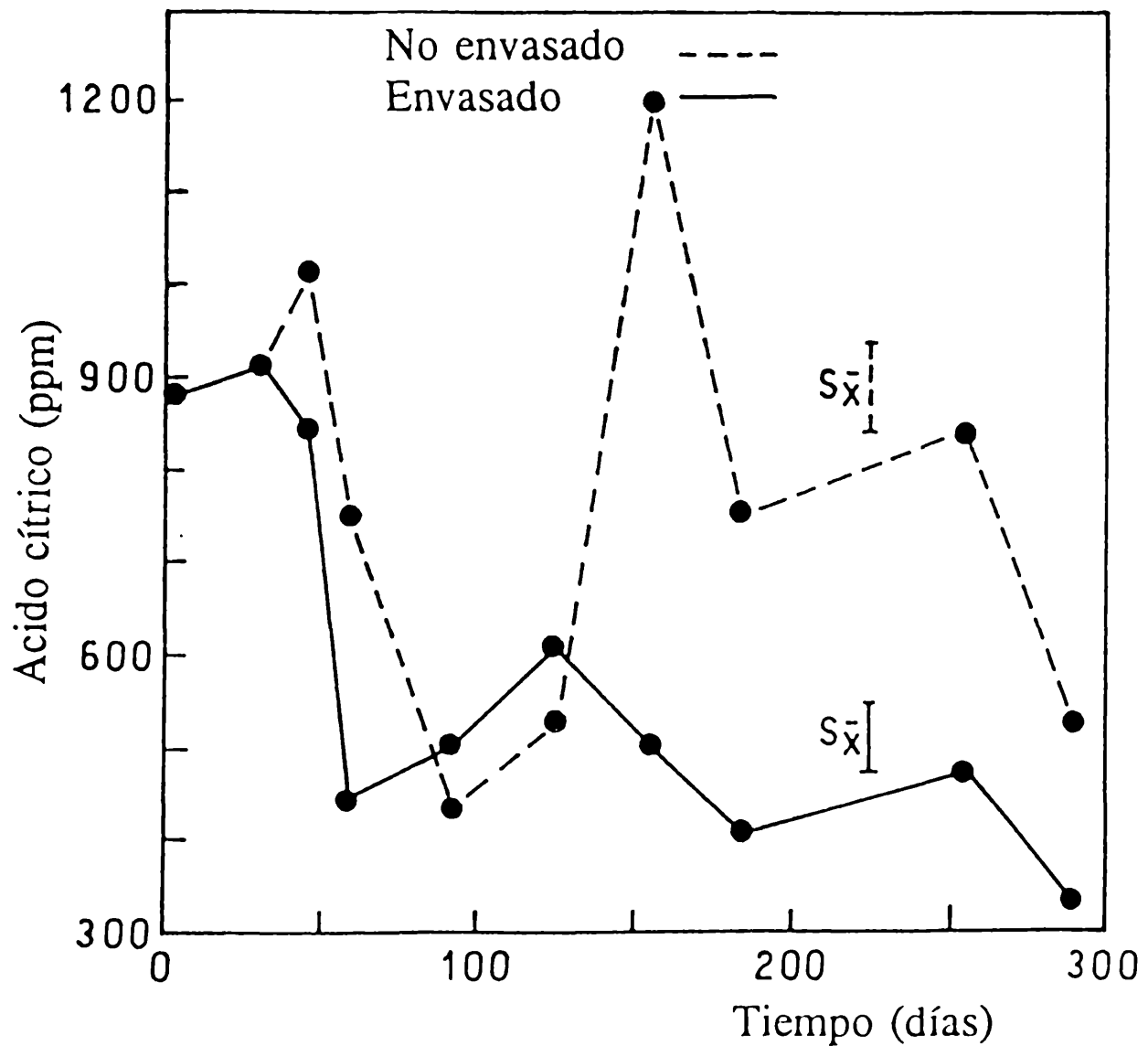


Fig. 3-14. Cambios en el contenido de ácido cítrico durante la maduración de queso Reggiano Argentino en muestras envasadas y maduradas tradicionalmente. Las barras indican los correspondientes errores estandar de las medias.

Giannuzzi y col. (1997), trabajando sobre los mismos quesos, demostraron que desde el punto de vista microbiológico no existían diferencias significativas entre los quesos envasados a 30 y a 45 días o madurados en forma tradicional, para todos los microorganismos estudiados (*Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus fermenti* y *Lactococcus lactis*). Los resultados obtenidos también demostraron que las diferencias en los valores de actividad acuosa y contenido de humedad entre las muestras envasadas y las no envasadas no tuvieron diferencias significativas en cuanto a la composición de la flora microbiana.

Algunos autores informaron que el análisis de discriminantes permitía clasificar quesos de diferentes edades cuando se consideraban los perfiles de ácidos orgánicos obtenidos por HPLC (Pham y Nakar, 1983; Alonso y col., 1987; Bevilacqua y Califano, 1992).

El contenido de los nueve ácidos orgánico estudiados y de lactosa pertenecientes a un total de 27 hormas de quesos fue utilizado como referencia para saber el tiempo de maduración, suponiendo que analizar los cambios de las concentraciones en conjunto permitiría agrupar las muestras según el tiempo de afinado. Esta fue la información introducida en el módulo de análisis de discriminantes del programa SYSTAT.

Los diferentes tiempos de envasado en películas plásticas no fueron tomados en cuenta ya que sus efectos no fueron significativos para la mayoría de los compuestos analizados.

Las muestras fueron discriminadas en nueve grupos según sus tiempos de maduración. El análisis canónico discriminante permite estimar las distancias entre clases y las probabilidades de que esas distancias sean mayores. La localización geométrica de las medias de las clases puede ser graficada para permitir la visualización de cuál clase es o cuán alejadas estén las clases. Si la posición de las muestras individuales se grafican por sus medias, la cantidad de muestras mezcladas puede visualizarse. Los gráficos canónicos de todos los quesos se muestran en la Fig.3-15. Se ve claramente que en esta figura, los quesos madurados en forma tradicional y los envasados a 30 y 45 días, según correspondan a distintos tiempos de maduración, aparecen encerrados en las distintas regiones. Además se observa que las hormas envasadas no difieren de las no envasadas en sus comportamientos con respecto a los contenidos de lactosa y de ácidos orgánicos.

Ya que la maduración es un fenómeno continuo, los grupos no pueden ser separados claramente. Los grupos I y J (que corresponden a 255 y 290 días respectivamente) no fueron discriminados por el programa, por lo que los quesos no envasados de 290 días de maduración fueron asignados de la misma manera que los de 255 días. La figura 3-15 muestra que pueden ser considerados cuatro subgrupos según sus contenidos de ácidos:

- 1) Quesos recién salidos de salmuera.
- 2) Quesos jóvenes entre 31 y 93 días (B-E), caracterizados por un aumento en los contenidos de ácido propiónico, orótico, butírico y fórmico y una disminución en los contenidos de ácidos pirúvico y cítrico.
- 3) Quesos de edad mediana, entre 126 y 184 días de maduración (F-H), los cuales corresponden a un período donde las concentraciones de ácidos propiónico, butírico y orótico aumentan y la concentración de pirúvico disminuye, mientras que el resto de los ácidos permanece aproximadamente constante, a excepción del ácido úrico que es generado abruptamente.
- 4) Quesos con largo período de maduración, entre 184 y 290 días de maduración (H-J), son quesos de alto contenido total de ácidos orgánicos, principalmente causado por el aumento en los contenidos de ácido propiónico, acético y láctico.

Se encontró que los ácidos propiónico, pirúvico, láctico y cítrico eran predictores significativos del tiempo de estacionamiento para el análisis regresional por etapas de los datos de ácidos orgánicos, cuando se usaba un modelo lineal multivariable. La ecuación estimada de la regresión fue:

$$t = 6.0 \times 10^{-3} [\text{Pr}] - 0.91 [\text{P}] - 2.0 \times 10^{-3} [\text{L}] - 4.1 \times 10^{-2} [\text{C}] + 160 \quad (3-8)$$

donde:  $t$  = tiempo de almacenamiento en días

$\text{Pr}$  = concentración de ácido propiónico (ppm)

$\text{L}$  = concentración de ácido láctico (ppm)

$\text{P}$  = concentración de ácido pirúvico (ppm)

$\text{C}$  = concentración de ácido cítrico (ppm)

Los coeficientes de la ecuación están expresados en (días ppm<sup>-1</sup>)

El coeficiente de correlación de la regresión fue  $R = 0.974$ .

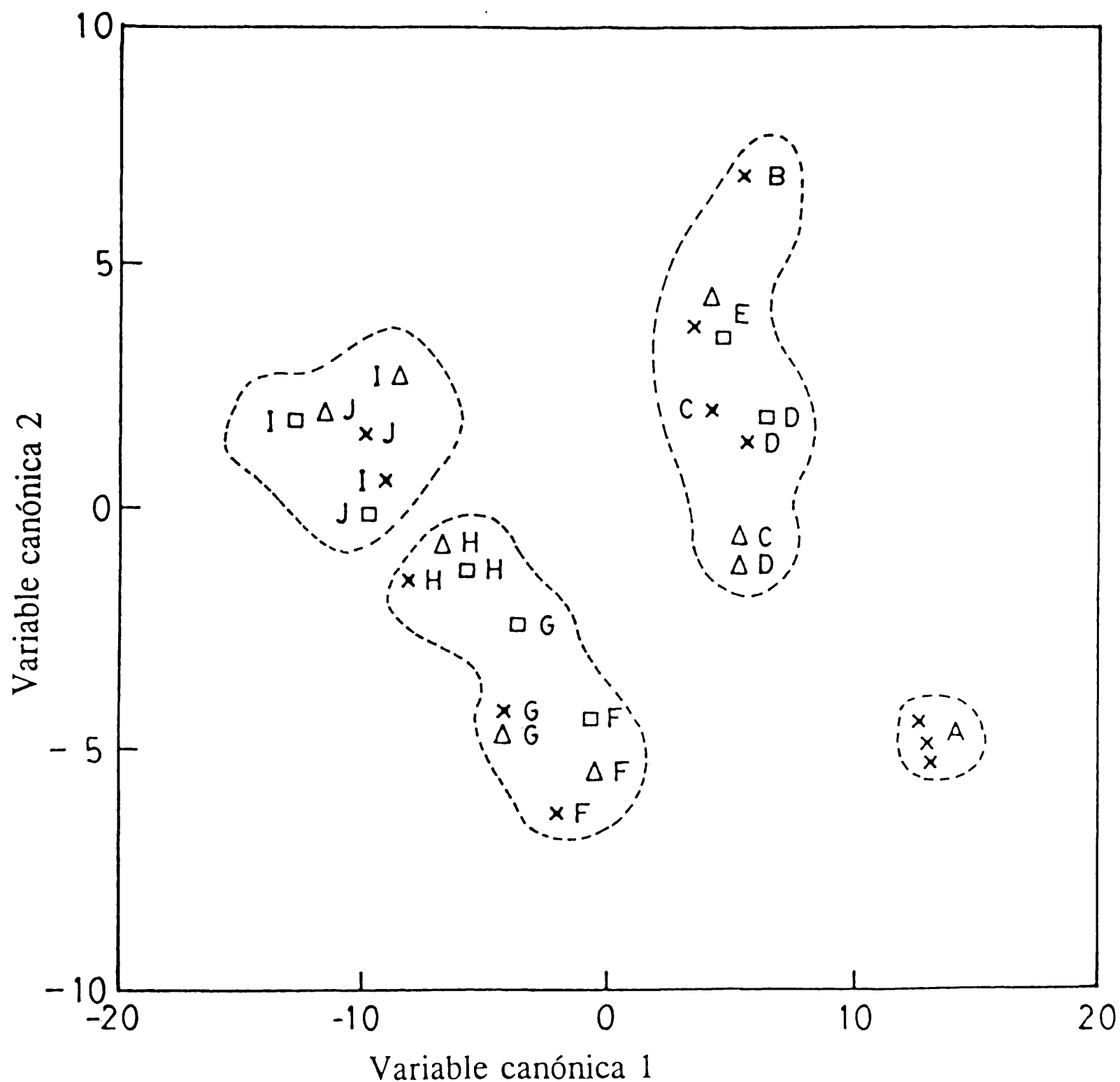


Fig. 3-15. Gráfico de las variables canónicas de 27 muestras de queso Reggianito Argentino. (X) muestra no envasadas, ( $\Delta$ ) muestras envasadas en película plástica después de 30 días de maduración, ( $\square$ ) muestras envasadas después de 45 días de maduración. Las letras indican los tiempos de maduración: (A) 0 días, (B) 31 días, (C) 46 días, (D) 59 días, (E) 93 días, (F) 126 días, (G) 156 días, (H) 184 días, (I) 255 días y (J) 290 días.



Hough y col. (1994), realizando un análisis sensorial sobre los mismos quesos, concluyó que ni aroma ni sabor cambiaban en estos alimentos, fueran envasados o no. En un trabajo posterior, Hough y col.(1996) demostró que los descriptores del flavor (la intensidad total, el gusto a queso, la salinidad, el gusto picante, la intensidad residual) en queso Reggianito eran bien predichos por los ácidos orgánicos usando correlaciones de cuadrados mínimos parciales (PLS). La intensidad total del aroma también fue bien correlacionada con los ácidos orgánicos.

Se puede decir a través de los resultados de este capítulo que las muestras envasadas no muestran crecimiento de hongos en su superficie y la evaporación de agua desde la superficie es mucho menor debido a la baja permeabilidad al agua de las películas usadas. Por consiguiente los quesos envasados tienen mayor contenido de agua que los quesos madurados tradicionalmente. El tiempo previo al envasado no afecta los resultados de las experiencias, lo cual quiere decir que envasando en el período mencionado no se observan modificaciones. Solamente los ácidos cítrico y úrico modifican sus contenidos entre las muestras envasadas y las no envasadas; sin embargo el contenido total de ácidos fue el mismo para las muestras envasadas y las no envasadas

### **3-4 CONSIDERACIONES FINALES**

A través de las observaciones realizadas en este estudio se puede decir que los quesos envasados no evidenciaron crecimiento de hongos en la superficie y además que la evaporación de agua fue mucho menor debida a la baja permeabilidad de la película utilizada para el envasado.

Por consiguiente los quesos madurados envasados presentaron mayor contenido de agua ( $350 \text{ g kg}^{-1}$ ) que los que fueron madurados tradicionalmente ( $330 \text{ g kg}^{-1}$ ), aunque dentro del rango que señala el Código Alimentario.

No se observaron diferencias significativas entre los quesos madurados tradicionalmente y los envasados a 30 ó 45 días con respecto a los contenidos de nitrógeno soluble, cuyos valores medios durante la maduración oscilaron entre  $5$  y  $27 \text{ mg g}^{-1}$ , ni para

nitrógeno no proteico cuyos valores estuvieron entre 5 y 12 mg g<sup>-1</sup> durante el período de afinado.

Los parámetros viscoelásticos estudiados (módulos elásticos y viscosidades) tuvieron mayores valores para las muestras no envasadas que para las envasadas, por lo cual los quesos madurados en forma tradicional fueron más duros y menos elásticos que los que se maduraron envasados.

El hecho de que las muestras hayan sido envasadas a los 30 ó 45 días del momento de la elaboración no afectó los valores de dureza, fuerza en la ruptura y deformación relativa en la ruptura. En cambio los parámetros dureza y fuerza en la ruptura fueron significativamente diferentes para las muestras envasadas y para las maduradas tradicionalmente.

A través del análisis de las concentraciones de los ácidos orgánicos se vio que solamente los ácidos úrico y cítrico tuvieron contenidos significativamente diferentes entre las muestras envasadas y las no envasadas.

## ***Capítulo 4***

***MADURACION Y CONGELACION DE QUESO***

***MOZZARELLA***

#### **4-1 DISEÑO DE LA EXPERIENCIA**

Se utilizaron para el estudio un total de 24 quesos Mozzarella fabricados en una planta local (Unión Gandarese, Bs. As.) provenientes de una misma tina y envasados al vacío en película BK1. De estos quesos algunos se utilizaron como muestras control, es decir se mantuvieron para su maduración en un almacenamiento solamente refrigerado, como si se tratara de una maduración tradicional del queso. Los restantes quesos se utilizaron para las experiencias de congelación y descongelación.

##### *Quesos refrigerados (control)*

Se almacenaron ocho hormas de quesos a 4°C y se fueron separando, para analizar, dos quesos elegidos al azar para cada tiempo de maduración a los 6, 14, 21 y 42 días.

##### *Quesos congelados*

Diez y seis quesos Mozzarella fueron empleados en las experiencias de congelación a -20°C. Antes de la congelación los quesos fueron almacenados a 4°C. La mitad de ellos durante 6 días y la otra mitad durante 14 días a los efectos de analizar la influencia de las condiciones de maduración previa a la congelación en la calidad del producto. Se utilizaron dos velocidades de congelación, según el tiempo que tardaran las muestras en pasar de -1.1 a -6.7°C (Cervantes y col., 1983). La congelación rápida insumía para este pasaje 0.22 horas y fue lograda por inmersión en un baño de temperatura controlada a -20°C (criostato Lauda MWG, TUK 30, que funciona con etilenglicol). En la congelación lenta las muestras tardaban 10 horas en pasar de -1.1 a -6.7°C. Esta velocidad fue lograda colocando las hormas en una cámara de aire estanco a -20°C. El tiempo requerido para congelar y descongelar las muestras bajo las condiciones de este estudio fue determinado colocando termocuplas en el centro geométrico de las piezas de queso.

De los 2 lotes de 8 quesos que fueron madurados a 4°C durante 6 ó 14 días, la mitad se congelaron rápidamente y la otra mitad lentamente es decir cuatro quesos de

cada tiempo de maduración refrigerado (6 ó 14 días), fueron congelados a cada una de las velocidades ensayadas. Ocho hormas de queso, dos de cada condición en tiempo de almacenamiento refrigerado y velocidad de congelación, fueron descongeladas al final de la congelación colocándolas a 4°C (2 hormas congeladas rápido y 2 hormas congeladas lento con 6 días de maduración y 2 hormas congeladas rápido y 2 hormas congeladas lento con 14 días de maduración). Esto se realizó a los fines de analizar el efecto producido solamente por la congelación, y no por el tiempo de almacenamiento congelado. De las ocho hormas descongeladas inmediatamente después de la congelación, una de cada condición (4 hormas) fueron analizadas inmediatamente, para determinar la influencia del tipo de congelación (rápida ó lenta) a que fueron sometidas las mismas. Las otras 4 hormas fueron almacenadas a 4°C durante ocho y siete días más hasta completar el período de maduración de 14 y 21 días.

Los restantes ocho quesos congelados fueron almacenados en cámara de -20°C inmediatamente después de la congelación, durante tres meses. Transcurrido ese período, la mitad de ellos se analizaron inmediatamente después de ser descongelados para ver la influencia del almacenamiento congelado sobre los parámetros medidos y la otra mitad se dejó a 4°C hasta completar un período de maduración total (incluyendo el tiempo previo a la congelación) de 14 y 21 días a los fines de analizar el efecto de completar la maduración luego del almacenamiento congelado a -20°C.

En la TABLA 4-1 se resumen todas las condiciones analizadas para queso Mozzarella.

**TABLA 4-1** Esquema de congelación de 16 hormas de queso Mozzarella.

Tiempo de maduración antes de la congelación	Velocidad de congelación	Almacenamiento congelado	Tiempo de maduración después de la descongelación	Tiempo total de maduración
(días)		(meses)	(días)	(días)
6	Rápida	0	0	6
6	Rápida	0	8	14
6	Rápida	3	0	6
6	Rápida	3	8	14
6	Lenta	0	0	6
6	Lenta	0	8	14
6	Lenta	3	0	6
6	Lenta	3	8	14
14	Rápida	0	0	14
14	Rápida	0	7	21
14	Rápida	3	0	14
14	Rápida	3	7	21
14	Lenta	0	0	14
14	Lenta	0	7	21
14	Lenta	3	0	14
14	Lenta	3	7	21

*Ensayos realizados sobre las muestras de queso Mozzarella*

Sobre las muestras iniciales se determinaron los contenidos de agua, grasa, sal y nitrógeno total.

Sobre todas las muestras se analizaron los contenidos humedad, nitrógeno no proteico y ácidos orgánicos (fórmico, acético, pirúvico, láctico, propiónico, orótico, úrico, cítrico y butírico).

En cuanto a las variables del perfil de textura a 20°C (en queso no fundido) se determinaron: dureza, cohesividad, adhesividad y elasticidad. No se realizaron estudios de

relajación porque la relación entre los valores de tensión verdadera y deformación relativa verdadera permanecía lineal en un rango muy pequeño de deformación verdadera (10%) lo que correspondía a una compresión de 0.3 cm sobre el tamaño en altura de la muestra de 2.5 cm y conduciría a grandes errores en este tipo de determinaciones.

Respecto de las propiedades funcionales del queso fundido se determinaron: viscosidad aparente, fundibilidad y aceite liberado a 60°C.

#### **4-2 ANALISIS ESTADISTICO**

Un análisis de varianza fue realizado separadamente para ver el comportamiento de las variables dependientes: dureza, cohesividad, adhesividad, elasticidad y nitrógeno no proteico. La variable independiente en el diseño de los quesos no congelados fue el tiempo de maduración.

Para el experimento con quesos congelados las variables independientes de diseño fueron: el tiempo completo de maduración antes de la congelación ó maduración en dos etapas (efecto fijo), la velocidad de congelación (0.22 o 10 horas para que las muestras pasen de -1.1 a -6.7°C), (efecto al azar) y las hormas de queso congeladas y descongeladas (efecto fijo). Fue considerado un modelo mixto. Para comparaciones simultáneas entre pares fue elegido el test de Tukey. Las diferencias en las medias y en el test F fueron consideradas significativas cuando  $P < 0.05$ . Los intervalos de confianza de las medias fueron calculados también a  $P < 0.05$ . Todos los procedimientos estadísticos fueron calculados usando el programa SYSTAT (SYSTAT, Inc., Evanston, IL, USA).

En forma análoga se llevó a cabo un análisis de varianza, en forma separada, para las variables dependientes: fundibilidad, formación de aceite liberado y viscosidad aparente. La variable independiente en los quesos no congelados fue como antes el tiempo de maduración. Para el experimento con quesos congelados las variables independientes de diseño fueron el tiempo completo de maduración antes de la congelación o la maduración en dos etapas (efecto fijo), la velocidad de congelación (efecto al azar) y el almacenamiento congelado (efecto fijo).

Los cuadrados medios esperados para el análisis de varianza, considerando un modelo mixto (Walpole y col., 1992), se muestran en la TABLA 4-2 para 14 días y en la TABLA 4-3 para 6 y 21 días de tiempo de maduración .

TABLA 4-2 Esquema del análisis de varianza aplicado a: viscosidad aparente, fundibilidad y formación de aceite liberado, en muestras congeladas y con 14 días de tiempo total de maduración.

Fuente de variación	df	MS esperadas	Relación F
Almacenamiento congelado (S)	1	$\sigma^2_{\epsilon} + 4 \sum \alpha^2 = MSS$	$\frac{MSS}{MSE}$
Esquema de maduración (R)	1	$\sigma^2_{\epsilon} + 4 \sum \beta^2 = MSR$	$\frac{MSR}{MSE}$
Velocidad de congelación (F)	1	$\sigma^2_{\epsilon} + 2 \sigma^2_{\alpha\delta} + 2 \sigma^2_{\beta\delta} + 4 \sigma^2_{\delta} = MSF$	$\frac{MSF}{MSSF + MSRF - MSE}$
S x R	1	$\sigma^2_{\epsilon} + 2 \sum (\alpha\beta)^2 = MSSR$	$\frac{MSSR}{MSE}$
S x F	1	$\sigma^2_{\epsilon} + 2 \sigma^2_{\alpha\delta} = MSSF$	$\frac{MSSF}{MSE}$
R x F	1	$\sigma^2_{\epsilon} + 2 \sigma^2_{\beta\delta} = MSRF$	$\frac{MSRF}{MSE}$
Error	9	$\sigma^2_{\epsilon} = MSE$	

MSS = cuadrado medio debido al almacenamiento congelado.

MSR = cuadrado medio debido al esquema de maduración.

MSF = cuadrado medio debido a la velocidad de congelación.

MSSR = cuadrado medio debido a la interacción almacenamiento congelado x esquema de maduración.

MSSF = cuadrado medio debido a la interacción almacenamiento congelado x velocidad de congelación.



MSRF = cuadrado medio debido a la interacción esquema de maduración x velocidad de congelación.

MSE = cuadrado medio debido al error aleatorio .

MS = cuadrados medios esperados.

df = grados de libertad.

$\sigma_{\epsilon}$  = Varianza del error.

$\alpha$  = efectos debidos al almacenamiento congelado.

$\beta$  = efectos debidos al esquema de maduración.

$\delta$  = efectos debidos a la velocidad de congelación.

$\sigma_{\alpha\delta}$  = componente de varianza del almacenamiento congelado y de la velocidad de congelación.

$\sigma_{\beta\delta}$  = componente de varianza de la interacción esquema de maduración y velocidad de congelación.

S x R = interacción entre el almacenamiento congelado y el esquema de maduración.

S x F = interacción entre el almacenamiento congelado y la velocidad de congelación.

R x F = interacción entre el esquema de congelación y la velocidad de congelación .

Cuando se compararon las muestras de queso congeladas con las refrigeradas que tenían el mismo tiempo de maduración, las variables independientes fueron el tiempo de maduración (efecto al azar) y el hecho de que las hormas de queso fueran congeladas o refrigeradas (efecto fijo). Aquí también se volvió a considerar un modelo mixto.

El intervalo de confianza para la diferencia entre dos medias dadas, fue estimado de acuerdo al test de Tukey según el procedimiento de comparación de medias tomadas de a pares. Las diferencias entre medias fueron consideradas como significativas para  $P < 0.05$ . Los intervalos de confianza de las medias también se calcularon para  $P = 0.05$ .

TABLA 4-3 Esquema del análisis de varianza aplicado a: viscosidad aparente, fundibilidad y formación de aceite liberado sobre muestras congeladas con 6 y 21 días del tiempo total de maduración.

Fuente de variación	df	MS esperadas	Relación <i>F</i>
Almacenamiento congelado (S)	1	$\sigma_{\epsilon}^2 + 2 \sum \alpha^2 = MSS$	$\frac{MSS}{MSE}$
Velocidad de congelación (F)	1	$\sigma_{\epsilon}^2 + \sigma_{\alpha\delta}^2 + 2 \sigma_{\delta}^2 = MSF$	$\frac{MSF}{MSSF}$
S x F	1	$\sigma_{\epsilon}^2 + \sigma_{\alpha\delta}^2 = MSSF$	$\frac{MSSF}{MSE}$
Error	4	$\sigma_{\epsilon}^2 = MSE$	

MSS = cuadrado medio debido al almacenamiento congelado.

MSF = cuadrado medio debido a la velocidad de congelación.

MSSF = cuadrado medio debido a la interacción almacenamiento congelado x velocidad de congelación.

MSE = cuadrado medio debido al error aleatorio.

$\sigma_{\epsilon}$  = Varianza del error

$\alpha$  = efectos debidos al almacenamiento congelado

$\delta$  = efectos debidos a la velocidad de congelación

$\sigma_{\delta}$  = componente de varianza de la velocidad de congelación

$\sigma_{\alpha\delta}$  = componente de varianza de la interacción almacenamiento congelado y velocidad de congelación

### **4-3 ANALISIS DE ACIDOS ORGANICOS**

#### *Diseño del experimento*

Se eligió el siguiente esquema de trabajo para el estudio de la evolución de los ácidos orgánicos durante la congelación: diez hormas de queso Mozzarella fueron usadas para los experimentos. Se tomó un trozo representativo de cada una de las 10 hormas de quesos almacenadas por tres días a 4°C, para analizar el contenido inicial de ácidos orgánicos. Inmediatamente después, cada horma fue dividida en seis partes que se envasaron al vacío en película BK1 (Eva-Saran-Eva, Grace Argentina). Tres muestras de cada horma fueron refrigeradas a 4°C por diferentes períodos de tiempo (6, 13, 20, 27, 34 y 41 días) mientras las restantes se congelaron -20°C por seis días. Después de descongeladas se almacenaron a 4°C hasta que alcanzaron los tiempos de maduración deseados (TABLA 4-4).

Se contemplaron dos causas de variación: los tiempos de maduración (6 niveles) y el hecho de que las muestras hubiesen sido congeladas o no (2 niveles). Las muestras de cada horma de queso constituyeron un bloque, para minimizar el error que implica la heterogeneidad entre hormas. Ya que se eligieron seis tiempos de maduración refrigerada, un diseño de bloques completos requerirían doce muestras de cada horma, pero sólo se contaba con seis. Entonces se asignaron los tratamientos a las muestras según un diseño de bloques incompletos balanceados (Box y col. 1978) como se muestra en la TABLA 4-4.

TABLA 4-4 Asignación de los tiempos de almacenamiento (tratamientos) a las muestras según el diseño de bloques incompletos. Los controles se refieren a las muestras almacenadas a 4°C sin ciclos de congelación-descongelación.

Hormas de queso	Tiempo de maduración (días)	
	Control (4°C)	Ciclo de congelación-descongelación
A	6, 13, 20	6, 13, 20
B	6, 27, 34	6, 27, 34
C	6, 13, 41	6, 13, 41
D	13, 27, 34	13, 27, 34
E	20, 27, 41	20, 27, 41
F	13, 20, 27	13, 20, 27
G	20, 34, 41	20, 34, 41
H	13, 34, 41	13, 34, 41
I	6, 20, 34	6, 20, 34
J	6, 27, 41	6, 27, 41

#### 4-4 ANALISIS ESTADISTICO DE ACIDOS ORGANICOS

Un análisis de varianza multivariable (MANAVA) y un test posterior de Tukey de comparaciones múltiples, fueron utilizados para estudiar tanto el efecto del procedimiento de congelación como el tiempo de maduración sobre las distintas variables analizadas.

La diferencia de medias y los ensayos F fueron considerados significativos cuando las probabilidades calculadas resultaron ser menores de 0.05.

En el caso de diseño de bloques incompletos utilizado para el estudio de la variación de ácidos orgánicos, el valor medio de cada tratamiento fue ajustado para considerar el hecho de que no todos los tratamientos ocurren en todos los bloques (Box y col., 1978).

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para conocer mejor la estructura del conjunto de datos correspondientes a los ácidos orgánicos.

PCA es un procedimiento que puede aplicarse a numerosos datos multivariantes como técnica exploratoria con grandes ventajas sobre todo para datos sensoriales. Hay dos principales funciones: la primera indica relaciones entre grupos de variables en un conjunto de datos y la segunda muestra relaciones entre objetos. La matriz de datos puede ser visualizada como describiendo un espacio multidimensional, con una dimensión para cada variable. Cada muestra puede ser representada como un punto en este espacio. En casos simples donde hay sólo unas pocas variables la estructura del espacio de muestras se puede analizar a través de un gráfico de dos dimensiones. Esto puede ser aún cuando haya muchos objetos. Las relaciones entre variables pueden entonces ser investigadas por una simple correlación o un análisis regresional. Sin embargo cuando hay más variables la visualización del espacio muestral se vuelve más dificultosa, cuando no imposible.

El efecto del PCA es reducir la dimensionalidad del espacio de muestras. Si se midieran 25 variables entonces debería haber 25 dimensiones. PCA procede a elegir una combinación lineal de variables que expliquen la mayor proporción posible de la varianza original. Si dos o más variables están fuertemente correlacionadas entonces la mayor parte de la varianza o información de los datos puede ser explicada dibujando un nuevo eje a través del centro del grupo de observaciones, de manera que la suma de los cuadrados de las distancias residuales sea mínima. La proporción remanente de varianza en el conjunto de datos puede luego ser explicada construyendo un segundo nuevo eje, ortogonal al primero. Esto se puede extender rápidamente a 3 o más dimensiones. En realidad para dar una información completa, PCA requiere de tantas dimensiones como variables hubiera en el espacio original. Sin embargo, el poder del método reside en su habilidad para seleccionar dimensiones que expliquen un mayor porcentaje de varianza que una sola variable. Existen más de un criterio para elegir el número de componentes de la solución. En este caso se consideró como criterio el punto de corte para autovalores aproximadamente iguales a 1 (Piggot y Sharman, 1986).

El análisis de discriminantes fue aplicado al conjunto de datos (ácidos orgánicos) considerando cada tiempo de maduración como un grupo; se ensayó la hipótesis nula que

los grupos eran equivalentes para estimar los puntajes, las funciones discriminantes y las probabilidades de clasificación.

La probabilidad de que una muestra sea miembro de un grupo dado fue calculada a través de la distancia de Mahalanobis. Para expresarlo gráficamente las variables canónicas fueron representadas en el espacio discriminante.

Todos los procedimientos estadísticos fueron calculados a través del software SYSTAT (SYSTAT Inc., Evenston, IL, USA).

## **4-5 RESULTADOS Y DISCUSION**

### **4-5-1 Quesos refrigerados**

#### **4-5-1-1 Contenido de agua, grasa y sal**

Las hormas de quesos iniciales, sin tratamiento alguno, revelaron un contenido de agua promedio de  $0.46 \pm 0.01$  g agua g queso<sup>-1</sup>. No se observaron variaciones significativas del contenido de agua durante el tiempo de maduración. El contenido de sal fue de  $17 \pm 3$  mg g<sup>-1</sup> y el contenido de grasa de  $0.4 \pm 0.03$  g g<sup>-1</sup> (ambos en base seca).

#### **4-5-1-2 Contenido de nitrógeno**

El nitrógeno total presente fue de  $40 \pm 1$  mg g<sup>-1</sup>. El nitrógeno no proteico aumentó con el tiempo de maduración desde un valor medio de  $0.6 \pm 0.1$  mg NNP g<sup>-1</sup> queso para 6 días de almacenamiento hasta  $0.9 \pm 0.1$  mg NNP g<sup>-1</sup> queso, al cabo de 42 días (TABLA 4-5). Estos valores bajos están de acuerdo con los informados por Creamer (1976). La baja actividad proteolítica puede ser explicada por la destrucción térmica de quimosina que ocurre durante la manufactura del queso (Matheson, 1981).

### 4-5-1-3 Análisis de Perfil de Textura

El estudio del análisis de perfil de textura en quesos refrigerados mostró que la maduración a 4°C tiene un efecto significativo sobre la adhesividad, la cohesividad y la dureza (TABLA 4-5).

TABLA4-5 Efecto del tiempo de maduración sobre el contenido de nitrógeno no proteico (NNP), Dureza (D), Adhesividad (A) y Cohesividad (C) de queso Mozzarella almacenado a 4 °C.

Tiempo de maduración (días)	NNP (mg g <sup>-1</sup> )	(D) (N)	A (J x 10 <sup>+3</sup> )	C
6	0.6 <sup>c</sup>	21 <sup>b</sup>	0.1 <sup>c</sup>	0.8 <sup>a</sup>
14	0.7 <sup>b,c</sup>	34 <sup>a</sup>	0.8 <sup>b</sup>	0.6 <sup>b</sup>
21	0.8 <sup>a,b</sup>	29 <sup>a</sup>	0.8 <sup>b</sup>	0.6 <sup>b</sup>
42	0.9 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	0.6 <sup>b</sup>

Distintos supraíndices indican que existen diferencias significativas entre los valores dentro de cada columna ( $P < 0.05$ ).

#### *Adhesividad*

La adhesividad aumentó con el tiempo de maduración refrigerado entre los 6 y los 42 días. Según expresó Sherman (1970) "la adhesividad es el trabajo necesario para vencer la fuerza de atracción entre la superficie del alimento y la superficie de otros materiales con los cuales los alimentos se ponen en contacto". Entonces, mientras el queso madura, las fuerzas de adhesión se vuelven mayores que las fuerzas de cohesión y parte de las muestras pueden adherirse al dispositivo de compresión de la prensa Instron mientras éste se mueve hacia arriba siguiendo el primer ciclo de compresión.

### *Dureza*

La dureza aumentó entre los 6 y 14 días de maduración, mientras que la cohesividad disminuyó en el mismo período. Entre los 14 y 42 días estos dos parámetros permanecieron constantes (TABLA 4-5).

Micketts y Olson (1974) observaron un aumento en la dureza del queso Mozzarella después de seis semanas de almacenamiento refrigerado, causado posiblemente por una lenta incorporación de agua libre dentro de la estructura fibrosa proteica del queso. Masi y Addeo (1986) también informaron que la firmeza aumenta durante la maduración del queso Mozzarella.

El comportamiento mecánico del queso depende principalmente de la resistencia de la red caseínica a la deformación. Según Creamer y Olson (1982), la molécula de  $\alpha_{s1}$  caseína interactuaría con otras moléculas de  $\alpha_{s1}$  caseína o con moléculas de  $\beta$  caseína y formaría un enlace en la red de proteínas. Si se corta la molécula de  $\alpha_{s1}$  caseína puede perder su capacidad para actuar como un enlace en la red proteica, disminuyendo la fuerza de la red. Sin embargo, por cada unión peptídica rota se generan dos nuevos grupos iónicos, los que pueden competir por la pequeña cantidad de agua presente en el sistema. Además, el agua previamente disponible para solvatación de las cadenas proteicas puede ser inmovilizada por los nuevos grupos iónicos, haciendo al queso más duro y menos deformable (Matheson, 1981).

### *Elasticidad*

La elasticidad del queso Mozzarella refrigerado no fue afectada por el tiempo de almacenamiento, manteniéndose en un valor medio de  $1.0 \pm 0.06$  cm.



#### **4-5-1-4 Propiedades funcionales de la Mozzarella fundida**

##### *Viscosidad aparente y aceite liberado*

En lo referente a la viscosidad aparente (VA) y aceite liberado en los quesos Mozzarella almacenados a 4°C el tiempo de almacenamiento mostró una importancia significativa. La viscosidad aparente de las muestras control disminuía rápidamente y el aceite liberado aumentaba durante las primeras dos semanas de almacenamiento a 4°C para luego permanecer constante (TABLA 4-6).

Cambios similares en la viscosidad aparente y en el aceite liberado fueron observados por otros autores en experimentos de maduración realizados en queso Mozzarella de baja humedad (Kindstedt y col., 1989; Oberg y col., 1991; Tunick y col., 1991 y 1993; Oberg y col., 1992, Kindstedt y col., 1992; Yun y col., 1993; Yun y col., 1993; Kiely y col., 1993).

Como señalara Kindstedt y col. (1992) los cambios en las características funcionales durante la maduración están relacionados con la proteólisis. Farkye y col. (1991) encontraron una proteólisis importante en quesos Mozzarella comerciales almacenados en condiciones de refrigeración durante dos semanas.

Estudios de microscopía electrónica muestran que la grasa en quesos Mozzarella existe como glóbulos dispersos en la matriz de la cuajada, a pesar de que aparecen como cavidades vacías debido a la técnica de preparación de la muestra (Paquet y Kalab, 1988). Durante la maduración tienen lugar cambios estructurales en la matriz de paracaseína y en las vacuolas de grasa (Kiely y col., 1993; Oberg y col., 1991). Después de la manufactura se presenta una fase relativamente densa, homogénea y continua de paracaseína amorfa conteniendo muchas microcavidades de dimensiones irregulares distribuidas al azar en la matriz proteica. Cuando el queso se madura, la porosidad de la matriz de paracaseína aumenta debido a la proteólisis; entonces la matriz de paracaseína presenta menor resistencia al estiramiento y mayor elasticidad. Estos cambios de las propiedades reológicas conducen a valores menores de la viscosidad aparente (VA). Sin embargo, como los glóbulos o agregados están separados por una matriz proteica, el debilitamiento por la

proteólisis de esta barrera probablemente facilita la coalescencia de los glóbulos de grasa cercanos en el calentamiento, con lo cual aumenta la exudación de grasa (aceite liberado).

TABLA4-6 Efecto del tiempo de maduración sobre la viscosidad aparente y la formación de aceite liberado en queso Mozzarella almacenado a 4°C.

Tiempo de maduración (días)	Viscosidad aparente (VA) (Pa·s)	Formación de aceite liberado (cm)
6	3148. <sup>a</sup>	3.2 <sup>b</sup>
14	2525. <sup>a,b</sup>	5.1 <sup>a</sup>
21	1886. <sup>b</sup>	5.3 <sup>a</sup>
42	494. <sup>c</sup>	5.9 <sup>a</sup>
ES	352.	.46

Las valores medios dentro de cada columna que no tienen supraíndices comunes difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

ES = error estandar del análisis ANAVA.

### *Fundibilidad*

El tiempo de almacenamiento no mostró una influencia significativa sobre la fundibilidad; el valor medio del diámetro de queso fundido obtenido fue de  $3.3 \pm 0.1$  cm, lo que representó un aumento del 87% con respecto al diámetro de las muestras antes de ser fundidas.

### **4-5-2 Quesos congelados**

Se compararon muestras de quesos que habían sido congeladas en diferentes condiciones (lenta ó rápida), cuyos procesos de maduración fueron en una etapa (6 ó 14

días previos a la congelación) o en dos etapas (6 días previos y 8 posteriores a la congelación; 14 días previos y 7 posteriores) y además según hubieran sido sometidas o no a un almacenamiento congelado de 3 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Está bien comprobado que el tiempo de maduración es el responsable de la mayoría de los cambios en las propiedades funcionales y por este motivo se tuvo especial cuidado en el hecho que las muestras congeladas que se compararon tuviesen los mismos tiempos totales de maduración a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4-5-2-1 Contenido de nitrógeno**

El análisis del nitrógeno no proteico (NNP) reveló que las muestras de queso congeladas después de 6 días de almacenamiento refrigerado mostraban una interacción significativa entre la velocidad de congelación y el almacenamiento congelado. El nitrógeno no proteico aumentó cuando las muestras congeladas con velocidades lentas se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante tres meses (Tabla 4-7). Esto podría atribuirse a los efectos de la recristalización del hielo, es decir al aumento del tamaño cristalino que afectó a la matriz proteica. Puede observarse que las muestras congeladas y almacenadas tuvieron niveles de nitrógeno no proteico 50% mayores que los correspondientes a las muestras maduras en condiciones de refrigeración por el mismo período (6 días) (TABLA 4-5).

Las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación antes de completar 14 días de maduración, (6 días a  $4^{\circ}\text{C}$ , congeladas y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por tres meses, descongeladas y mantenidas 8 días más a  $4^{\circ}\text{C}$ ), mostraron mayor contenido de nitrógeno no proteico ( $0.8 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$ ) que las muestras que fueron almacenadas durante catorce días a  $4^{\circ}\text{C}$  antes de ser congeladas ( $0.7 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$ ). Esto implica que la maduración en 2 etapas (antes y después de la congelación) induce a un mayor grado de proteólisis en el producto final. La congelación podría haber debilitado la red proteica lo suficiente como para haberla hecho más susceptible a la proteólisis.

Las muestras que completaron 14 días de maduración antes de la congelación, tuvieron un valor de NNP de  $0.7 \text{ mg g}^{-1}$ , similar al de las muestras maduras a  $4^{\circ}\text{C}$  sin congelar. Esto significa que la proteólisis no se vería afectada por los procesos de

congelación-descongelación si las muestras tuvieran un período de maduración previa a 4°C de 14 días. En los dos casos anteriores los resultados no fueron afectados significativamente ni por la velocidad de congelación ni por el almacenamiento congelado.

TABLA 4-7 Efecto de las condiciones de congelación sobre el contenido de nitrógeno no proteico en queso Mozzarella (mg NNP g queso<sup>-1</sup>) para muestras con tiempo total de maduración de 6 días.

Tiempo de maduración (días)	Tiempo de maduración antes de la congelación (días)	Velocidad de congelación	Almacenamiento congelado (meses)	
			0	3
6	6	Rápida	0.87 <sup>a,b</sup>	0.91 <sup>a</sup>
6	6	Lenta	0.81 <sup>b</sup>	0.92 <sup>a</sup>

Las medias con supraíndices distintos difieren con  $P < 0.05$ .

En el caso de los quesos congelados que tuvieron un total de 21 días de maduración a 4°C ( de los cuales 14 días fueron antes de ser congelados y almacenados a -20°C durante tres meses , y los restantes 7 días después del almacenamiento congelado y descongelamiento) el valor medio de NNP fue de  $0.8 \pm 0.1 \text{ mg g}^{-1}$  . En este caso ninguno de los factores analizados (ni la velocidad de congelación, ni el tiempo de almacenamiento congelado) mostraron efectos significativos en los valores de NNP. Además estos valores no difirieron significativamente de las muestras maduras en condiciones de refrigeración a 4°C. El hecho de haber completado 14 días de maduración antes de ser congeladas condujo a que la matriz proteica no se afecte tan severamente por la congelación y entonces no haya mayor contenido de nitrógeno no proteico en las muestras congeladas.

El contenido de nitrógeno no proteico de las muestras congeladas con 6 días de maduración siempre fue mayor que el de las muestras control. Para la muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación después de completar los 14 días de maduración el contenido de nitrógeno no proteico fue similar al de los controles refrigerados con los

mismos tiempos de maduración. Pero cuando los quesos completaban el período de maduración hasta llegar a los 14 días, después de haber sido descongelados, el contenido de nitrógeno no proteico alcanzaba valores similares a los que poseían los controles refrigerados de veintiún días de maduración.

#### **4-5-2-2 Análisis de perfil de textura**

##### *Dureza*

Tanto la velocidad de congelación como el almacenamiento congelado mostraron un efecto significativo en las piezas de queso que fueron congeladas y descongeladas luego de un almacenamiento a 4°C durante 6 días. Comparando los valores de dureza de estas muestras con los de las muestras que fueron maduras 6 días en condiciones de refrigeración a 4°C sin ser congeladas (TABLA 4-5) se observó que estos últimos eran menores que los de las muestras que fueron congeladas. En los quesos con 6 días de tiempo total de maduración, que no fueron almacenados luego de la congelación, no se observaron diferencias significativas en los valores de dureza con la velocidad de congelación. En los quesos que fueron almacenados a -20°C durante 3 meses sí se observaron diferencias significativas. En estos casos, el almacenamiento congelado tuvo un efecto endurecedor que dependía de la velocidad de congelación (TABLA 4-8).

En las muestras que tuvieron un tiempo total de maduración a 4°C de 14 días, se observó que la dureza aumentaba en las que habían sido congeladas antes de completar el período de maduración y eran almacenadas durante 3 meses a -20°C. En cambio las muestras congeladas después de 14 días de almacenamiento refrigerado a 4°C no presentaban diferencias significativas en la dureza de las mismas después del almacenamiento. Las velocidades de congelación no causaron efectos significativos en las muestras almacenadas a -20°C ni en las analizadas inmediatamente después de la congelación.

TABLA 4-8 Efecto de las condiciones experimentales de congelación sobre la dureza (N) de queso Mozzarella congelado.

Tiempo total de maduración (días)	Tiempo de maduración previo a la congelación (días)	Velocidad de congelación	Almacenamiento congelado (meses)	
			0	3
6	6	Rápida	30 <sup>c</sup>	54 <sup>a</sup>
6	6	Lenta	25 <sup>c</sup>	39 <sup>b</sup>
14	6	Rápida	34 <sup>b</sup>	46 <sup>a</sup>
14	6	Lenta	31 <sup>b</sup>	44 <sup>a</sup>
14	14	Rápida	27 <sup>b</sup>	36 <sup>a,b</sup>
14	14	Lenta	36 <sup>a,b</sup>	31 <sup>b</sup>

Las medias con un mismo tiempo de maduración total difieren cuando presentan distintos supraíndices ( $P < 0.05$ ).

Los valores medios de dureza para quesos con un tiempo de maduración de 21 días fueron  $28 \pm 1$  N. Ninguno de los factores analizados mostraron efectos significativos sobre la dureza cuando el tiempo total de maduración fue de 21 días. Así se puede ver que el valor de 28 N no difería significativamente de las muestras maduras por igual período en condiciones de refrigeración pero sin ser sometidas a congelación (TABLA 4-5).

Para quesos congelados después de sólo 6 días de maduración (con o sin almacenamiento congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) y luego descongelados las piezas de quesos congeladas y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  resultaron ser más duras que los controles refrigerados.

Los quesos congelados con un tiempo total de maduración de catorce días no vieron afectada su dureza, cuando fueron comparados con los controles refrigerados, excepto para muestras congeladas después de seis días de maduración, almacenadas tres meses a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y luego descongelados y almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  durante ocho días más. Bajo estas últimas

condiciones mencionadas, la dureza fue mayor que en las muestras refrigeradas control, haciendo que las muestras con ciclo de congelación-descongelación se parecieran a muestras control refrigeradas de mayores tiempos de maduración.

Diversos autores utilizaron métodos objetivos a los fines de evaluar la textura del queso Mozzarella no fundido determinando las propiedades funcionales con una Máquina Instron (Mickets y col., 1974; Cervantes y col., 1983; Masi y Addeo, 1986; Tunick y col., 1991 y 1993; Yun y col., 1993). Los cambios en el cuerpo y la textura de los quesos se correlacionan con los distintos tratamientos de tiempos y temperaturas de congelación (Shannon, 1975). Cervantes y col. (1983) trabajando en queso Mozzarella de baja humedad y parcialmente descremado y velocidades de congelación-descongelación rápidas, concluyeron que después de una semana de almacenamiento congelado, las muestras no se veían significativamente afectadas por los procedimientos de congelación y descongelación. Esto fue comprobado por ensayos de compresión, torsión y evaluación sensorial.

Según Diefes y col. (1993), cuando el queso Mozzarella es sometido a congelación, la deshidratación local de las proteínas causa rupturas en la estructura proteica, esto hace que los pequeños glóbulos de grasa entren en contacto unos con otros y formen gránulos. Las proteínas se vuelven más compactas o interactúan para formar puentes disulfuro alrededor de nuevos gránulos de grasa. Con el descongelamiento, las proteínas no son capaces de reabsorber totalmente el agua. Esto trae como consecuencia un queso más duro y más elástico en cuanto a su estructura. Durante el almacenamiento congelado hay un aumento en los diámetros de los cristales debido a la recristalización del hielo, haciendo que resulte más difícil la relocalización del agua en la interfase lípido-proteína después de la descongelación; esto disminuye el efecto lubricante y produce un queso de estructura más dura. Esto explicaría los resultados obtenidos en el presente trabajo.

#### *Adhesividad, cohesividad y elasticidad*

El almacenamiento congelado produjo un aumento en la adhesividad de las muestras con seis y veintiún días de maduración (TABLA 4-9), mientras que este efecto

no fue significativo en los quesos Mozzarella madurados durante 14 días. Ni la velocidad de congelación, ni la maduración en una o dos etapas, tuvieron un efecto significativo en la adhesividad.

TABLA 4-9 Efecto del almacenamiento congelado sobre la adhesividad (J) del queso Mozzarella congelado.

Tiempo de maduración (días)	Almacenamiento congelado (meses)	
	0	3
6	$1 \times 10^{-4} \text{ b}$	$8 \times 10^{-4} \text{ a}$
14	$8 \times 10^{-4} \text{ a}$	$9 \times 10^{-4} \text{ a}$
21	$6 \times 10^{-4} \text{ b}$	$10 \times 10^{-4} \text{ a}$

Las medias en una misma fila difieren si los supraíndices son distintos ( $P < 0.05$ ).

Asimismo, ninguno de los factores estudiados mostraron un efecto significativo en la cohesividad. Los valores medios obtenidos fueron  $0.56 \pm 0.02$ ,  $0.61 \pm 0.03$  y  $0.66 \pm 0.03$  para los quesos madurados durante 6, 14 y 21 días respectivamente.

Los valores de cohesividad para los quesos congelados de 14 y 21 días de maduración no difirieron con los de los quesos madurados en condiciones de refrigeración que no fueron congelados.

Sin embargo, la cohesividad de los quesos con 6 días de maduración fue significativamente más baja que la de los quesos de igual tiempo de maduración no sometidos a congelación.

Esto sugiere que la matriz proteica de los quesos sería más susceptible a sufrir alteraciones cuando sólo tiene 6 días de maduración que cuando tiene 14 ó 21 días.

La elasticidad no se vio afectada por ninguna de las variables ensayadas dando un valor medio de  $1 \pm 0.01$  cm.

La elasticidad, cohesividad y adhesividad de los quesos congelados con un tiempo



total de maduración de 14 días no difirieron de los quesos refrigerados.

Diefes y col. (1993), quienes trabajaron con queso Mozzarella, observaron grandes daños cuando las muestras de queso eran almacenadas durante 48 semanas a temperaturas de congelación. Si en cambio se dejaban los quesos durante algunos días a 4°C después de descongelar, las muestras recuperaban sus valores óptimos de cohesividad y fundibilidad.

De acuerdo con Dahlstrom (1978), el queso Mozzarella mostraba poca fundibilidad, flavor ácido, pérdida de grasas, decoloración, superficies libres de humedad y poca cohesividad inmediatamente después de la descongelación, pero regeneraba sus características normales después que el queso descongelado se almacenaba de una a tres semanas a 4°C, mejorando las propiedades funcionales. Lo mismo sucede en el presente trabajo con las muestras que se congelaron con sólo 6 días de maduración y luego se dejaron 8 días a 4°C.

#### **4-5-2-3 Propiedades funcionales**

##### *Viscosidad aparente*

Ni las velocidades de congelación ni el almacenamiento congelado tuvieron efecto significativo sobre la viscosidad aparente en las muestras de quesos maduras durante 6 días; el valor medio fue de  $3275 \pm 277$  Pa.s. Para muestras maduras durante 14 días y luego congeladas y almacenadas a -20°C durante 3 meses, la viscosidad aparente disminuyó en comparación con las muestras descongeladas inmediatamente después de la congelación, independientemente de la velocidad de congelación. Las muestras de queso que habían sido congeladas lentamente después de 6 días de maduración refrigerada y que completaron los 14 días de maduración después del almacenamiento congelado, aumentaron el valor de la viscosidad aparente (TABLA 4-10).

TABLA 4-10 Efecto del tiempo de maduración antes del congelamiento, de la velocidad de congelación y del almacenamiento congelado sobre la viscosidad aparente (Pa.s) de queso Mozzarella congelado cuyo tiempo total maduración fue 14 días).

Tiempo de maduración previo a la congelación (días)	Velocidad de congelación	Almacenamiento congelado (meses)	
		0	3
14	NS	2446. <sup>a</sup>	1614. <sup>c</sup>
6	Rápida	1940. <sup>b,c</sup>	1648. <sup>c</sup>
6	Lenta	1700. <sup>c</sup>	2250. <sup>a,b</sup>

Medias sin supraíndices comunes son diferentes ( $P < .05$ ).

NS = no significativo

ES = 249 Pa.s

Las muestras maduras 21 días, congeladas pero no almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mostraron un valor medio de viscosidad aparente de 1066 Pa.s con  $P < 0.05$ , lo cual podría explicarse porque a mayor grado de proteólisis la VA es menor. Este valor también es menor que el correspondiente a los quesos refrigerados del mismo tiempo de maduración pero no congelados, lo que señalaría que la congelación induce a mayor grado de proteólisis. Tres meses de almacenamiento congelado aumentaron la viscosidad aparente a 1780 Pa.s con  $P < 0.05$ .

Los quesos congelados después de ser madurados durante 14 días mostraron que después del almacenamiento congelado (tres meses a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), la viscosidad aparente disminuyó a valores similares a aquellos obtenidos sobre muestras maduras refrigeradas durante veintiún días (muestras control). En las muestras maduras y no sometidas a congelación, la viscosidad aparente disminuyó en los primeros 14 días debido a la proteólisis.

Las muestras de quesos maduras durante 14 días previos a la congelación, sin almacenamiento congelado, no difirieron de las muestras control refrigeradas durante 14 días en los valores de viscosidad aparente. En cambio cuando se completó la maduración

después de permanecer almacenadas durante 3 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$ , la viscosidad aparente fue comparable a la de los controles refrigerados de 21 días. El almacenamiento congelado disminuyó la viscosidad aparente haciendo que las muestras fueran equivalentes a aquellas con una semana más de almacenamiento refrigerado.

#### *Aceite liberado*

En las muestras que tuvieron un período de maduración de 14 días y que fueron congeladas y almacenadas congeladas se liberó mayor cantidad de aceite que en las no almacenadas. El almacenamiento congelado influyó sobre la cantidad de aceite liberado. Sin embargo en el caso de las muestras congeladas rápidamente, que terminaron su maduración después de haber sido almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses y luego fueron descongeladas, se vio que liberaban menos aceite que las no almacenadas. Para las mismas muestras cuando la congelación era lenta, el almacenamiento congelado no modificaba el valor de esta variable (TABLA 4-11).

Se debe recordar según lo mostrado en la TABLA 4-6 que el aceite liberado aumentaba con el tiempo de maduración en las muestras maduras en condiciones de refrigeración y no congeladas. La destrucción de la red proteica debida al almacenamiento congelado, facilitaría la coalescencia de los glóbulos de grasa lo cual aumentaría el aceite liberado.

Ni el almacenamiento congelado ni la velocidad de congelación afectaron el aceite liberado cuando las muestras de queso fueron maduras con un período total de 6 ó 21 días. Los valores medios de aceite liberado fueron  $3.2 \pm 0.2$  y  $5.8 \pm 0.2$  cm para 6 y 21 días respectivamente.

Las muestras de quesos congeladas después de ser maduras durante 14 días no vieron afectadas las propiedades funcionales a  $60^{\circ}\text{C}$  en comparación con los controles refrigerados; pero después del almacenamiento congelado (tres meses a  $-20^{\circ}\text{C}$ ), el aceite liberado fue mayor que para las muestras control de cuarenta y dos días.

TABLA 4-11 Efecto del tiempo de maduración previo a la congelación, de la velocidad de congelación y del almacenamiento congelado sobre el aceite liberado (cm) en queso Mozzarella congelado cuyo tiempo total de maduración fue de 14 días.

Tiempo de maduración previo a la congelación (días)	Velocidad de congelación	Almacenamiento congelado (meses)	
		0	3
14	NS	5.2 <sup>c</sup>	6.4 <sup>a</sup>
6	Rápida	6.2 <sup>a</sup>	5.5 <sup>b</sup>
6	Lenta	5.5 <sup>b</sup>	5.7 <sup>b</sup>

Las medias con diferente supraíndice difieren ( $P < 0.05$ ).

NS = no significativo

ES = 0.18 cm

### *Fundibilidad*

Como se observa en la TABLA 4-12 el almacenamiento congelado disminuyó la fundibilidad de las muestras maduras durante 14 días antes de la congelación.

En las muestras maduras durante 6 y 21 días ni la velocidad de congelación ni el almacenamiento congelado afectaron la fundibilidad. Los valores observados de esta propiedad fueron  $2.9 \pm 0.1$  y  $3.4 \pm 0.1$  cm para 6 y 21 días respectivamente.

Para quesos madurados solamente durante 6 días, que fueron congelados, más tarde descongelados y luego dejados 8 días a 4°C, las características del queso fundido inmediatamente después de la descongelación fueron similares a las de los quesos control, independientemente de las condiciones experimentales (velocidad de congelación y almacenamiento congelado).

TABLA 4-12 Efecto del tiempo de maduración previo a la congelación y del almacenamiento congelado sobre la fundibilidad (cm) de queso Mozzarella congelado cuyo tiempo total de maduración fue de 14 días.

Tiempo de maduración previo a la congelación (días)	Almacenamiento congelado (meses)	
	0	3
14	3.4 <sup>a</sup>	3.1 <sup>b</sup>
6	3.3 <sup>a</sup>	3.4 <sup>a</sup>

Las medias con diferentes supraíndices difieren ( $P < 0.05$ ).

ES = 0.1 cm

Los resultados en la literatura respecto de la fundibilidad son muy contradictorios.

Oberg (1992) informó que la fundibilidad disminuía en los quesos Mozzarella que habían sido congelados inmediatamente después de la manufactura y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 42 días. Según este autor la congelación tiende generalmente a dañar las estructuras características del queso. La congelación produciría cambios en el cultivo iniciador y en las enzimas presentes, lo que podría modificar las propiedades físicas del queso como son la extensibilidad, la fundibilidad y el color (Oberg y col., 1992, 1991, 1991).

Por el contrario Tunick y col. (1991) congelando queso Mozzarella inmediatamente después de la manufactura, almacenándolo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 8 semanas y atemperándolo luego a  $4^{\circ}\text{C}$  por 3 semanas más encontraron que los quesos congelados tenían mayor fundibilidad que los no congelados usados como control que tenían una semana de almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esto puede ser atribuible a que trabajaron sobre quesos cuya matriz aún no estaba consolidada.

Sin embargo, estas modificaciones informadas en la literatura no fueron significativas en las experiencias del presente trabajo.

### 4-5-3 Ácidos orgánicos

En las figuras 4-1 y 4-2 se muestran cromatogramas típicos obtenidos a 214 y 280 nm de los ácidos orgánicos estudiados en queso Mozzarella.

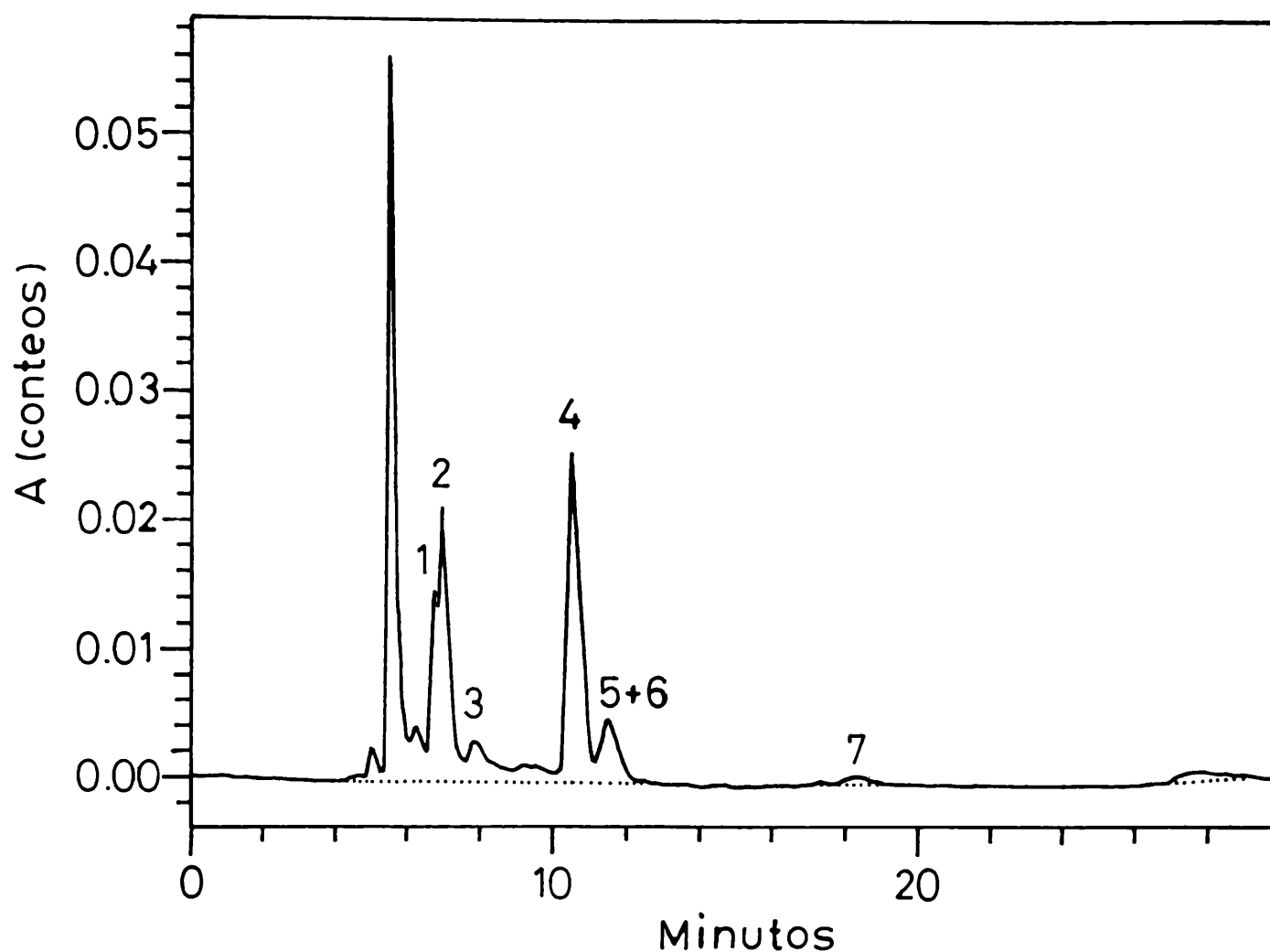


Fig. 4-1 Cromatograma típico de Queso Mozzarella obtenido a 214 nm de los ácidos: (1) cítrico, (2) orótico, (3) pirúvico, (4) láctico, (5+6) úrico y fórmico, (7) butírico.

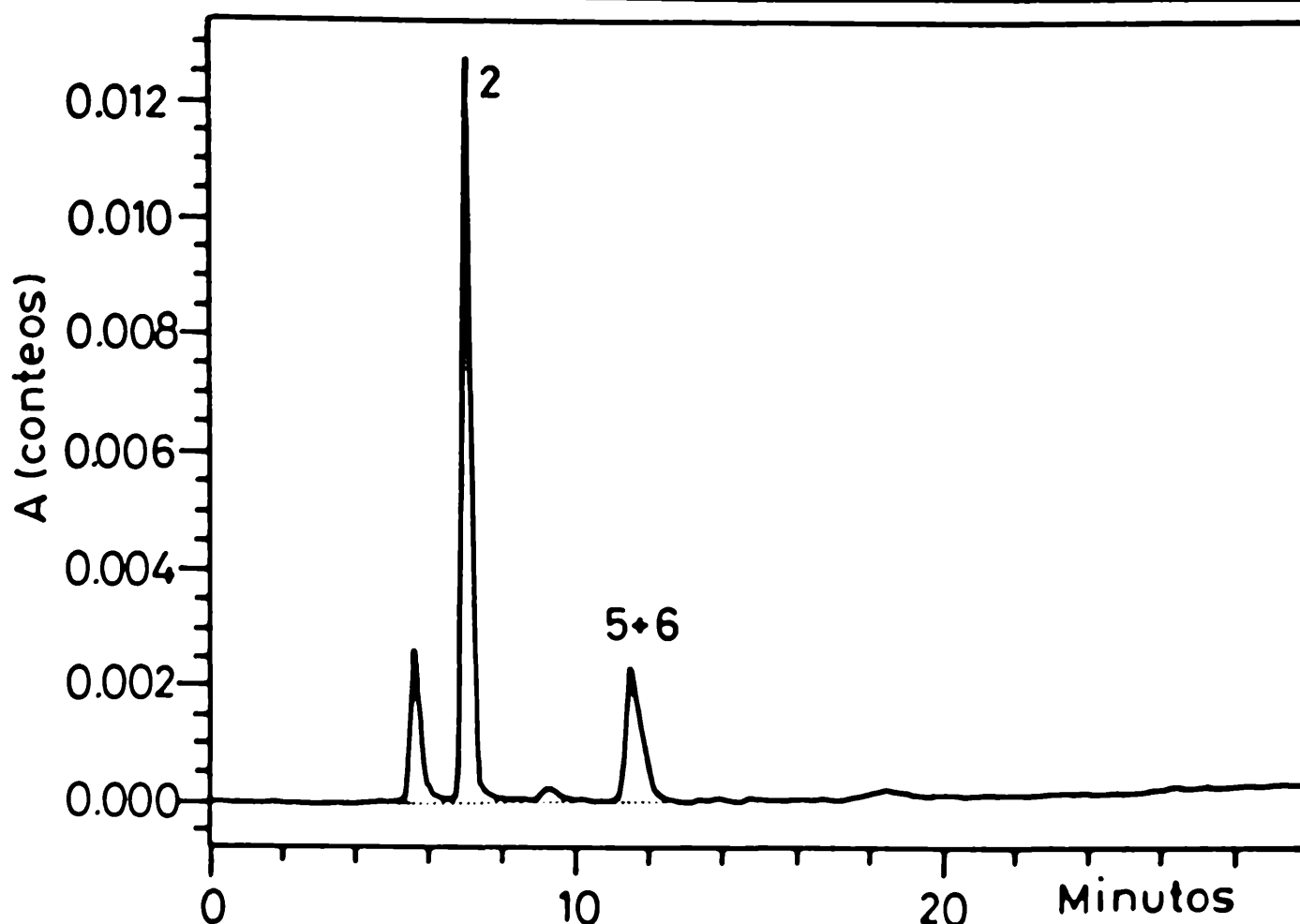


Fig. 4-2 Cromatograma típico de Queso Mozzarella a 280 nm de los ácidos: orótico (2) y úrico (5+6).

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre el contenido de ácidos de los grupos refrigerados y congelados, excepto a ciertos tiempos de almacenamiento donde la interacción fue significativa (esquema de maduración x tiempo de maduración).

La concentración de ácido láctico inicial (3 días) representó alrededor del 79.3% del contenido total de ácidos, pues el principal papel del starter es producir láctico a partir de lactosa a altas velocidades en las primeras etapas. Tanto el tiempo de almacenamiento como la interacción (tiempo de almacenamiento x esquema de maduración) tiene un efecto significativo sobre el contenido de ácido láctico. El ácido láctico aumentó a los 20 días de maduración, donde representó el 80.5% del total de los ácidos en las muestras refrigeradas y el 91.5% en las congeladas (Fig. 4-3). El ácido láctico disminuyó 20% entre los 20 y 27 días en las muestras sometidas a ciclos de congelación y descongelación, permaneciendo luego constante. La concentración de láctico es máxima a los 27 días con una fuerte disminución a los 34 días en los controles refrigerados. Los mismos valores se obtuvieron para muestras congeladas y refrigeradas a los 41 días de maduración, donde alcanzó el

72.3% del total de la concentración de los ácidos orgánicos.

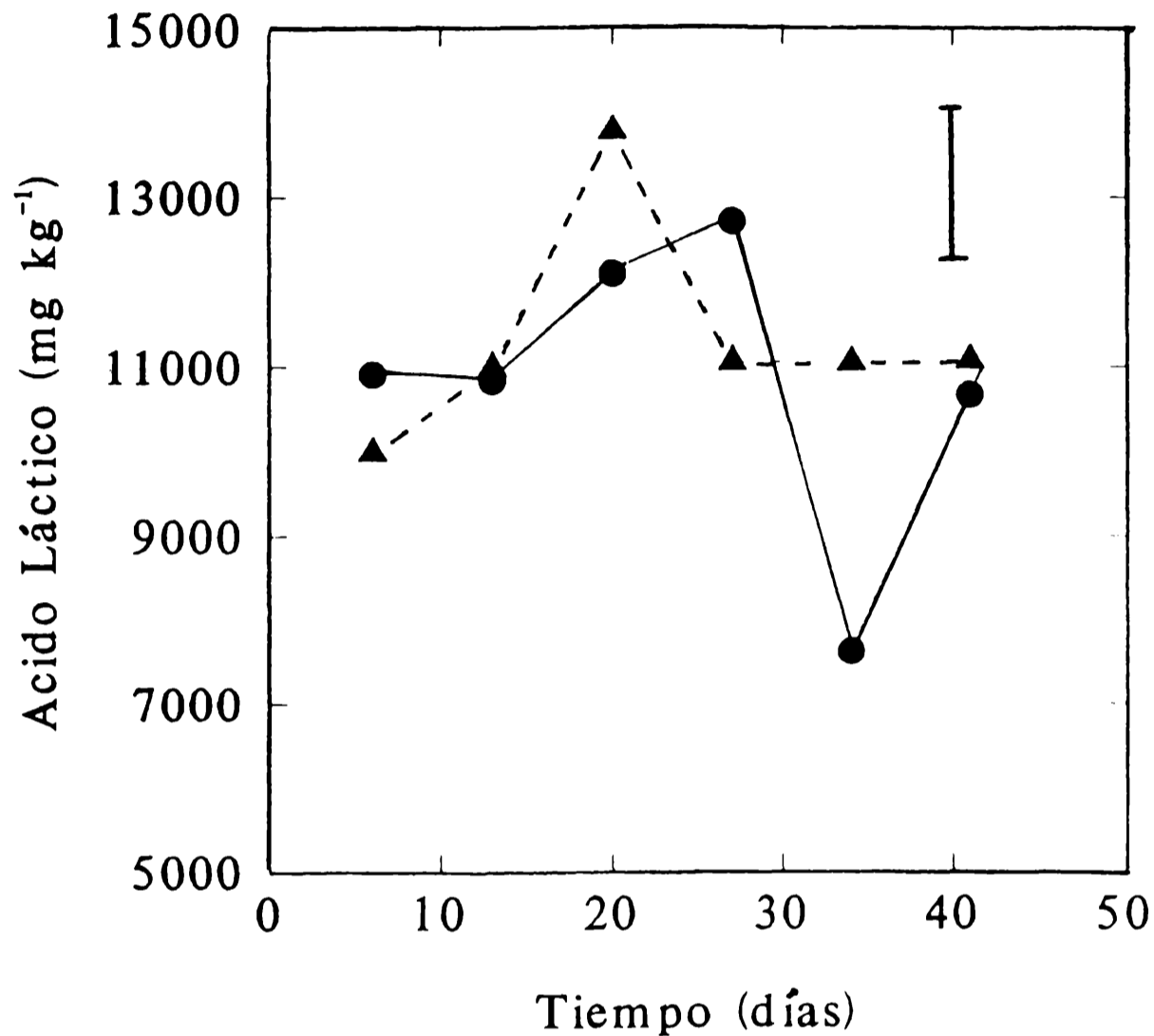


Fig. 4-3 Cambio en el contenido de ácido láctico durante la maduración de queso Mozzarella. (-----) Muestras sometidas al ciclo de congelación- descongelación, (—●—) Muestras refrigeradas. La barra indica la mínima diferencia significativa (LSD;  $P < 0.05$ ).

Los ácidos úrico y fórmico también presentaron una sucesión de cambios similares, con un máximo entre 20 y 27 días, pero los contenidos de los ácidos de los grupos refrigerados fueron similares a los de las muestras congeladas (Fig. 4-4).

El ácido cítrico inicial (3 días) representaba el 9.1% del total ( $1370 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Luego aumentó rápidamente en los siguientes tres días de maduración (6 días) para las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación ( $2600 \text{ mg kg}^{-1}$ ), doblando prácticamente su contenido. Las muestras congeladas presentaron un máximo en la concentración de cítrico a los 13 días de almacenamiento con una leve tendencia a



disminuir a mayores tiempos de maduración. Los controles refrigerados mostraron el valor más alto a los 20 días y el mínimo después madurar 34 días (Fig 4-5). La disminución puede deberse a que el citrato puede ser usado como sustrato por el starter para producir ácido pirúvico.

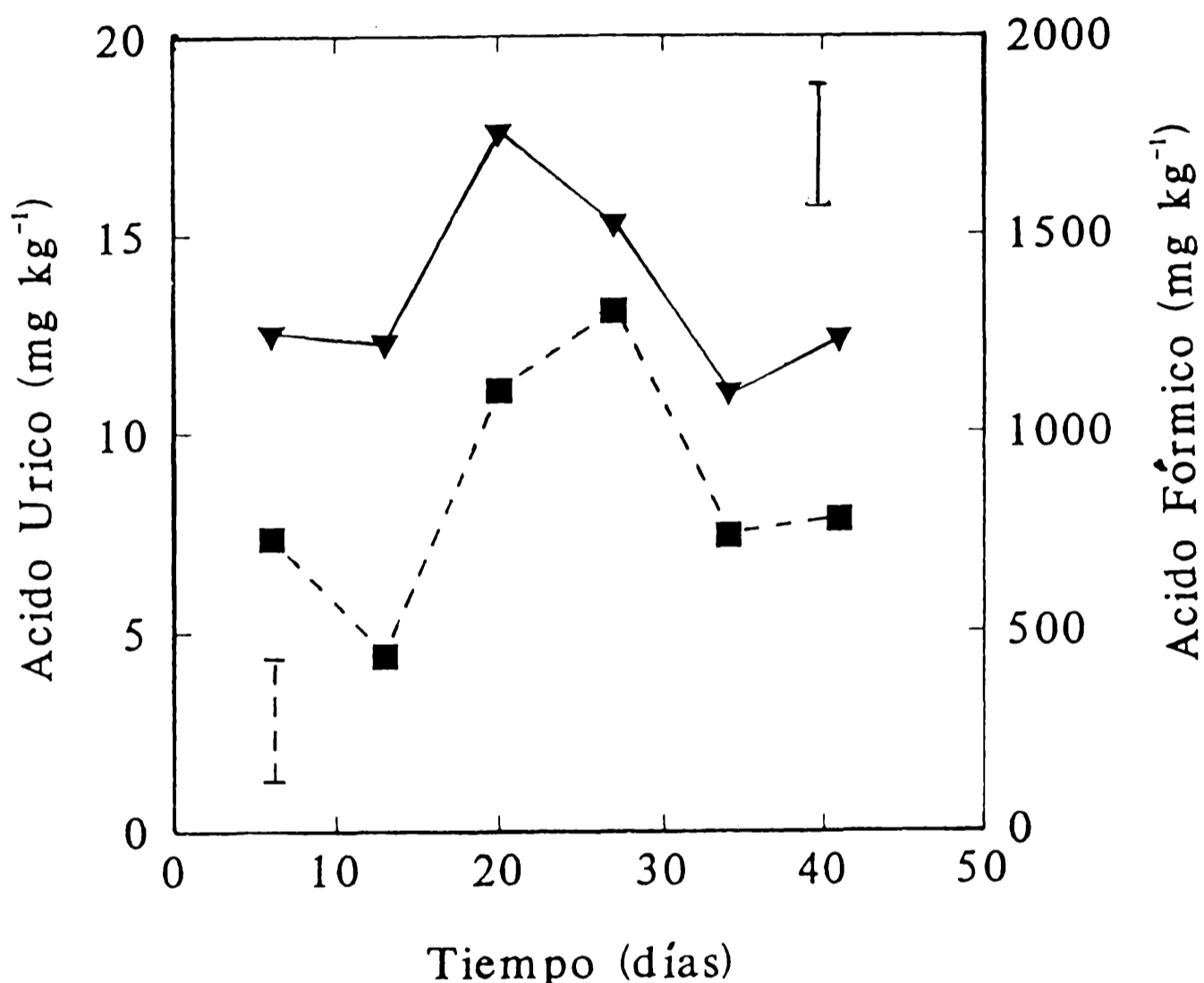


Fig. 4-4 Cambios en los contenidos de ácidos úrico (■) y fórmico (▼) durante la congelación de queso Mozzarella. No se observan diferencias entre las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación. Las barras indican las mínimas diferencias significativas (LSD;  $P < 0.05$ ).

El contenido de ácido pirúvico disminuyó un 80% entre los tres y los seis días de maduración, alcanzando una concentración promedio de  $36 \pm 9$  mg kg<sup>-1</sup> que no cambia significativamente durante el resto de la experiencia. Esto podría explicarse ya que si bien el piruvato es fácilmente formado a través de los pasos de la vía glicolítica, también actúa

como sustrato de muchas reacciones metabólicas.

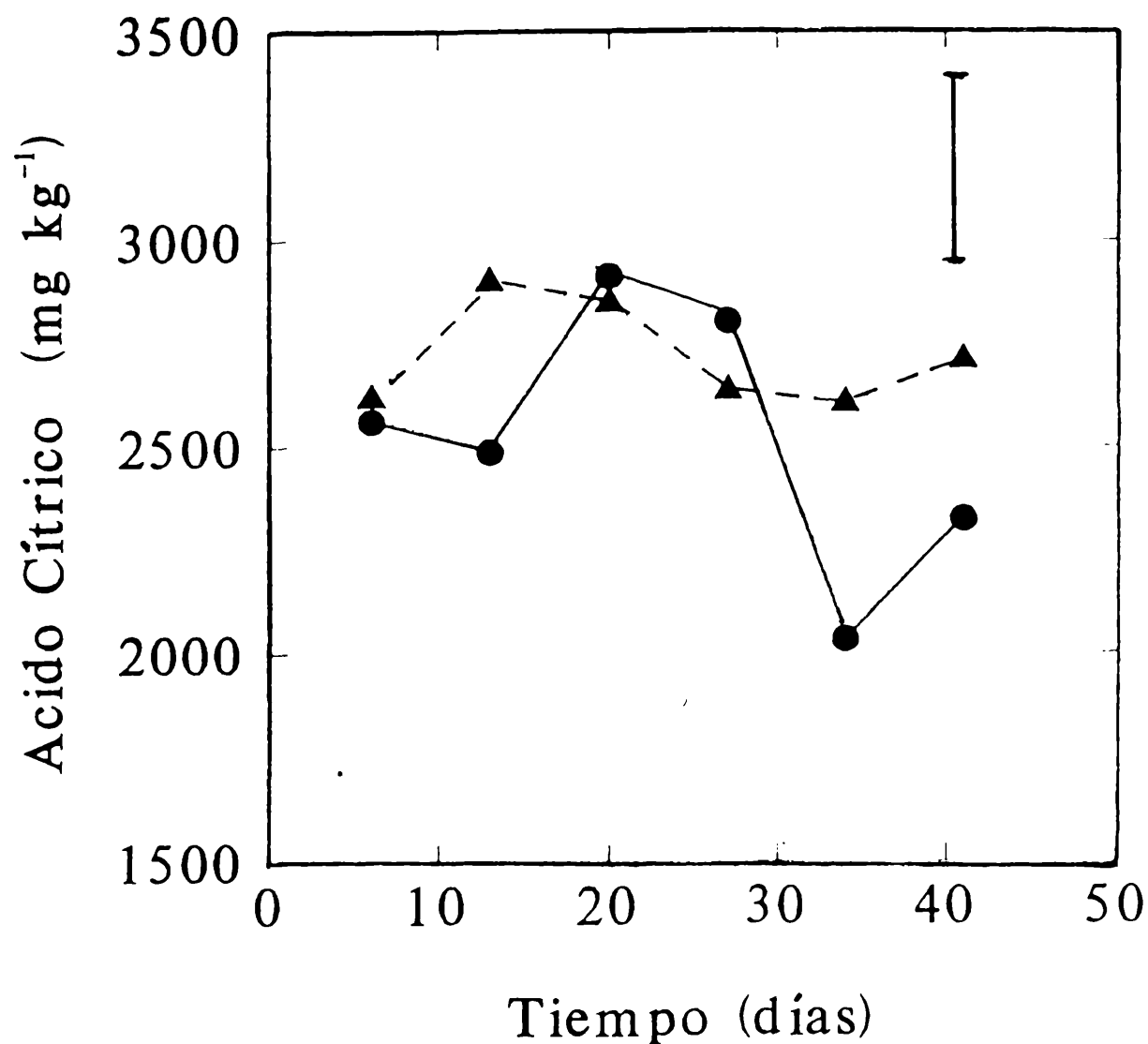


Fig. 4-5 Cambios en el contenido de ácido cítrico. Muestras de Queso Mozzarella sometidas al ciclo de congelación-descongelación (-----); Muestras control refrigeradas (———). La barra indica la mínima diferencia significativa (LSD;  $P < 0.05$ ).

El contenido de ácido orótico no presentó cambios significativos durante la maduración, con excepción del grupo refrigerado que fue madurado 34 días (Fig 4-6).

No se detectaron ni ácido acético ni ácido propiónico en la totalidad de las

muestras.

El ácido butírico solamente apareció en unas pocas muestras, al azar, y nunca excedió los  $700\text{mg kg}^{-1}$ , lo cual sugiere la presencia de bacterias que no pertenecen al starter.

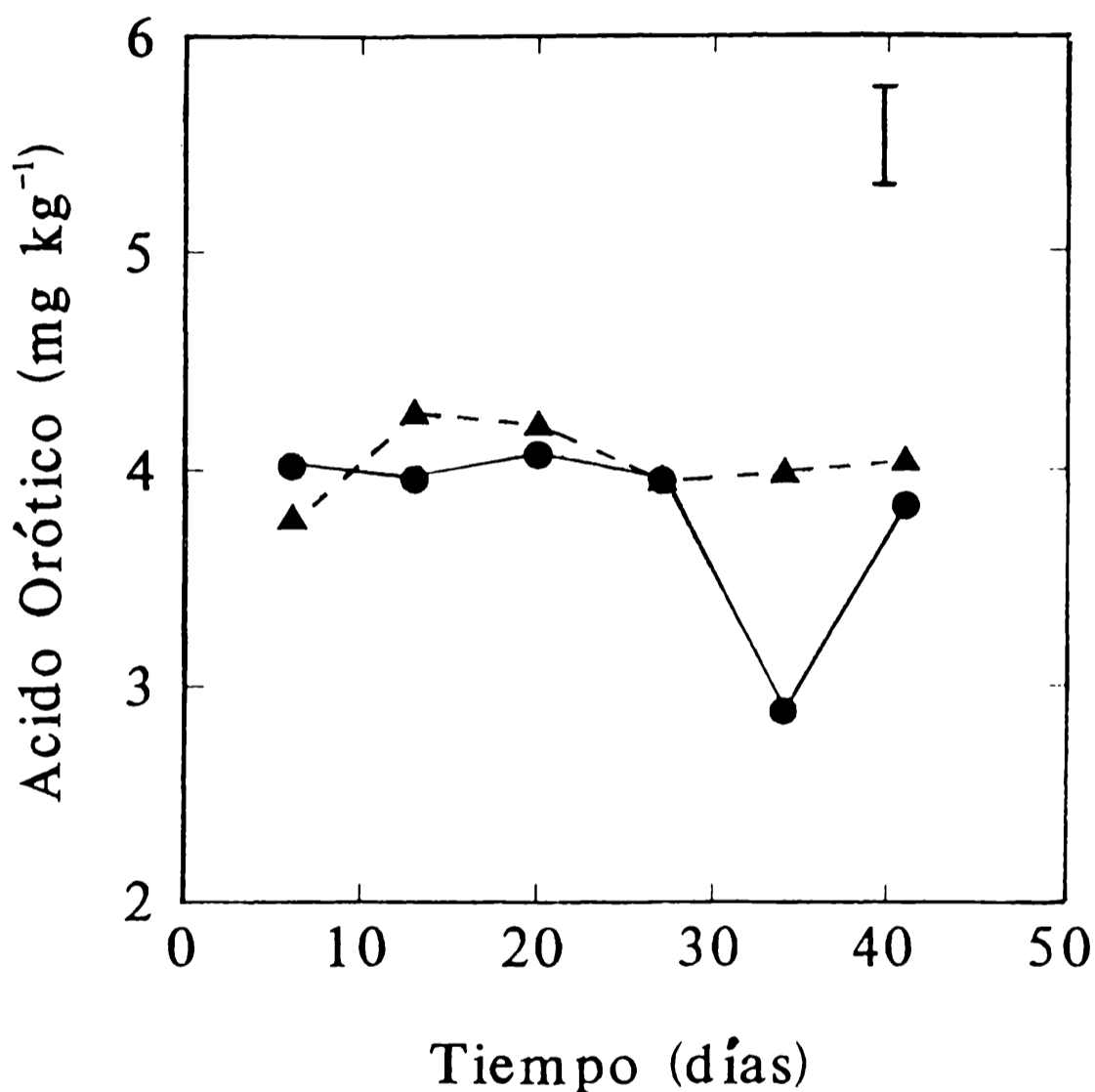


Fig. 4-6 Cambios en el contenido de ácidos orótico. Muestras de queso Mozzarella sometidas al ciclo de congelación-descongelación (-----); Muestras control refrigeradas (—●—). La barra indica la mínima diferencia significativa (LSD;  $P < 0.05$ ).

*Análisis de componentes principales*

Los resultados del análisis de los componentes principales de los siete ácidos orgánicos detectados mostraron tres factores de interpretación, los cuales describen alrededor del 82% de la variación total de las 60 muestras (alrededor de 47, 23 y 12% para cada uno de los factores respectivamente).

La carga para los factores 1 y 2 se muestra en la Fig 4-7. El factor 1 fue fuertemente cargado sobre láctico, orótico, cítrico y fórmico, mientras que el factor 2 era principalmente cargado sobre butírico y úrico.

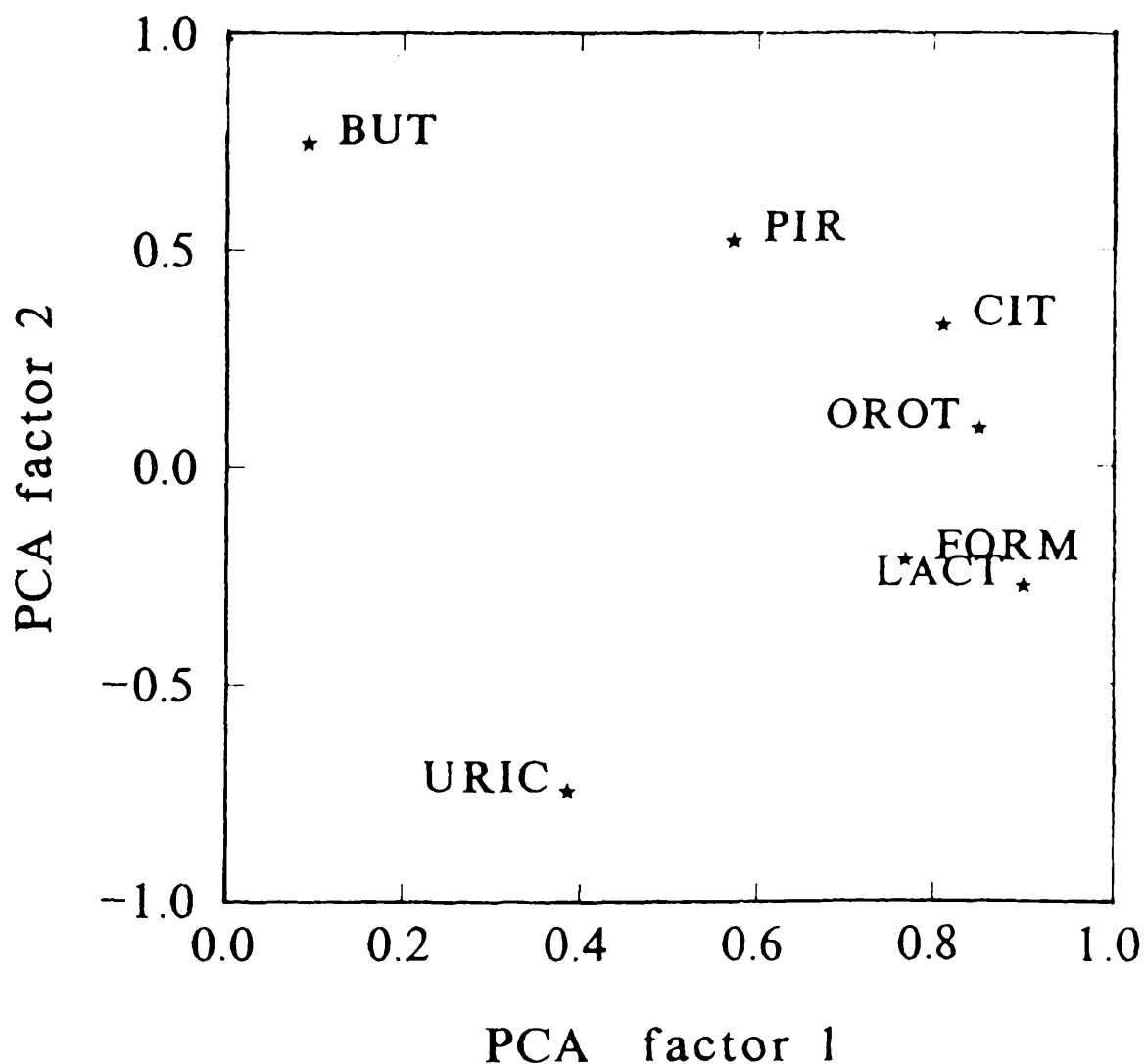


Fig. 4-7. Factores de carga de los 7 ácidos orgánicos detectados sobre el primero y segundo componentes principales. Los ácidos están indicados con las primeras letras de sus nombres.

El factor 3 no mostró una clara definición; con algunos ácidos tiene una carga moderada (Fig. 4-8).

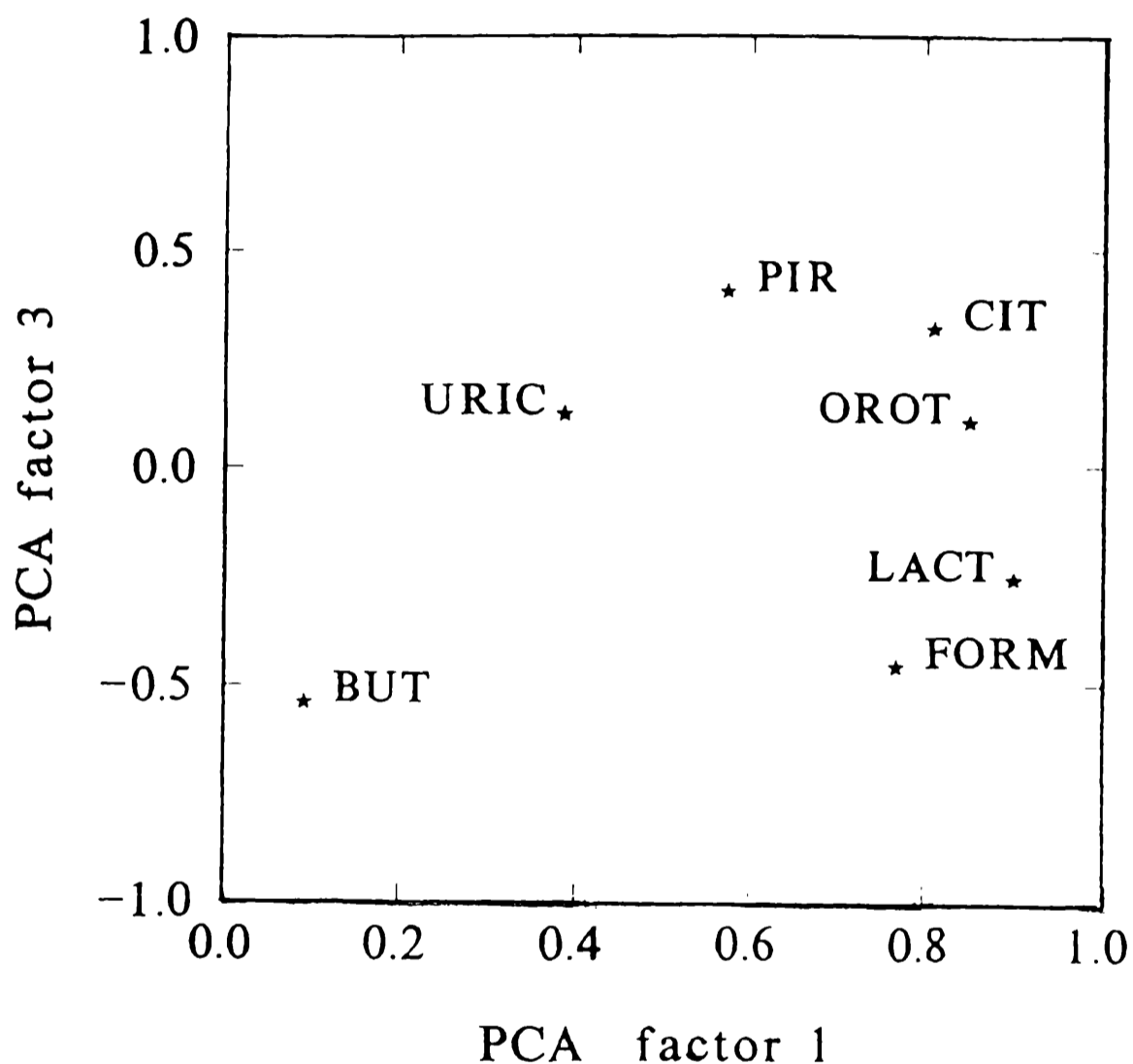


Fig. 4-8. Factores de carga de los 7 ácidos orgánicos detectados sobre el primero y tercer componentes principales. Los ácidos están indicados por las primeras letras de sus nombres.

Los objetos (muestras) fueron graficados en un espacio tridimensional que puede ser visualizado como una proyección tridimensional del espacio original multidimensional. La observación de los resultados de las muestras en la Fig.4- 9 revela que no hay una clara distinción entre los grupos de muestras congeladas y refrigeradas. Sin embargo aplicando un ANAVA a los resultados de las muestras de cada análisis de componentes principales, solamente el tiempo de almacenamiento produjo un efecto significativo, mientras que la congelación de las muestras no afectó los resultados.

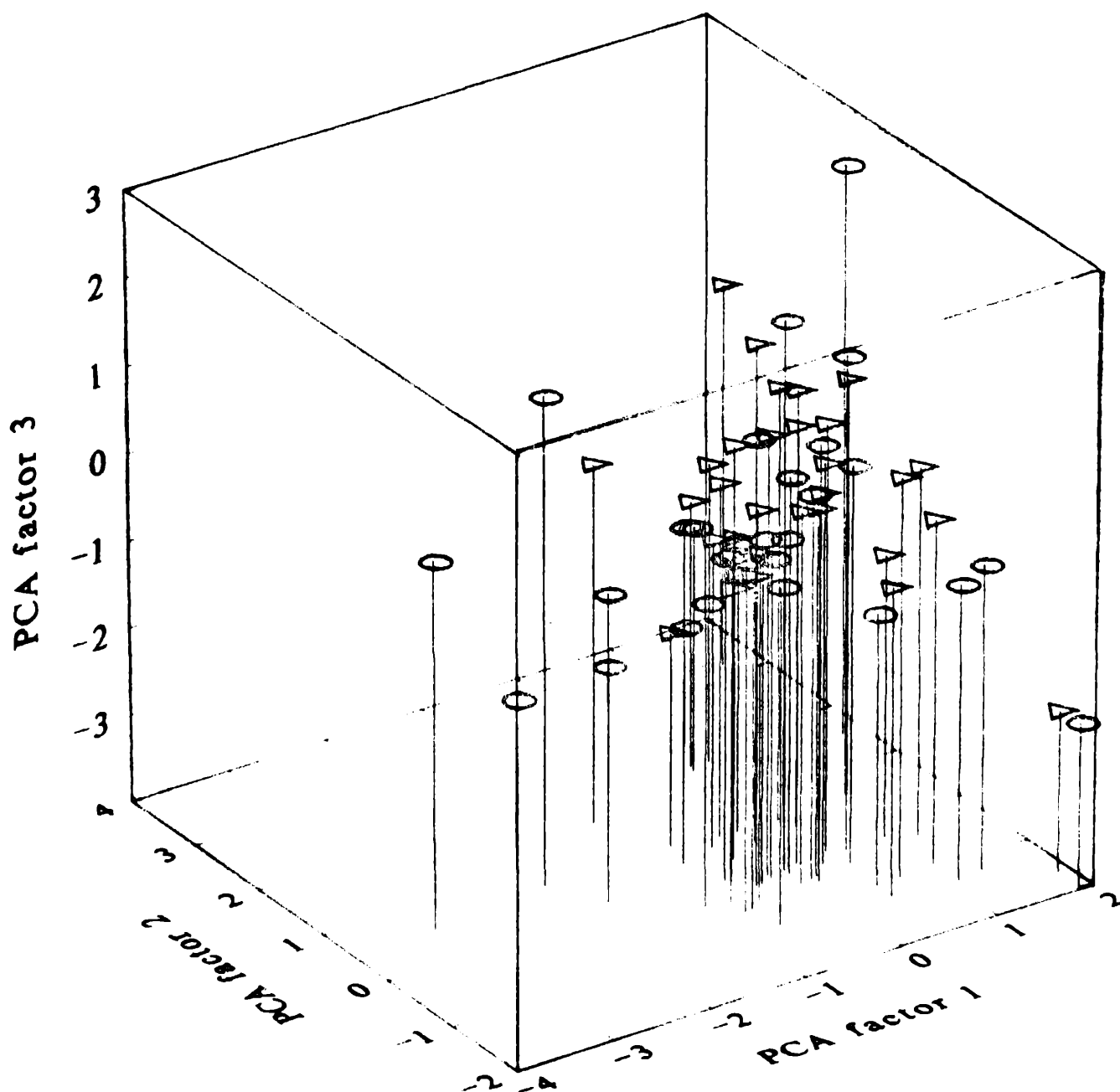


Fig. 4-9. Resultados de las muestras respecto de los 3 factores de componentes principales.  $\circ$  Muestras refrigeradas;  $\nabla$  Muestras sometidas al ciclo congelación-descongelación.

Para realizar el análisis de discriminantes se ingresó al módulo del programa SYSTAT la concentración de los 7 ácidos orgánicos cuantificados en cada muestra de queso.

La principal diferencia entre el análisis de discriminantes y el análisis de componentes principales es que el análisis de discriminantes calcula factores que permiten diferenciar mejor entre grupos de muestras, mientras que el análisis de componentes principales calcula factores que explican la mayor proporción de varianza (Piggott, 1982).

Las muestras fueron discriminadas en tres grupos según sus tiempos de maduración. Los diferentes procedimientos de almacenamiento congelado no fueron considerados para la formación de los grupos ya que sus efectos no fueron significativos en la mayoría de los casos.

El grupo A corresponde a muestras maduras entre 6 y 13 días. El grupo B comprende muestras maduras entre 20 y 27 días. Las muestras maduras entre 34 y 41 días pertenecen al grupo C. El grupo B corresponde a un período donde los contenidos de ácido láctico, fórmico, cítrico y úrico son altos. Los gráficos canónicos de todas las muestras se ven en la Fig.4-10.

Del gráfico puede observarse que las muestras A están situadas casi exclusivamente en el cuarto cuadrante. Las muestras B pertenecen, en su mayoría, al segundo y tercer cuadrante. Finalmente las muestras clasificadas como C están situadas principalmente en el primer cuadrante.

Las variables clasifican correctamente el 80% de las muestras.

En conclusión se puede decir que desde el punto de vista de la composición de ácidos orgánicos solamente, el queso Mozzarella que fue congelado antes de completar la maduración no difiere significativamente del grupo control refrigerado del mismo tiempo de maduración.

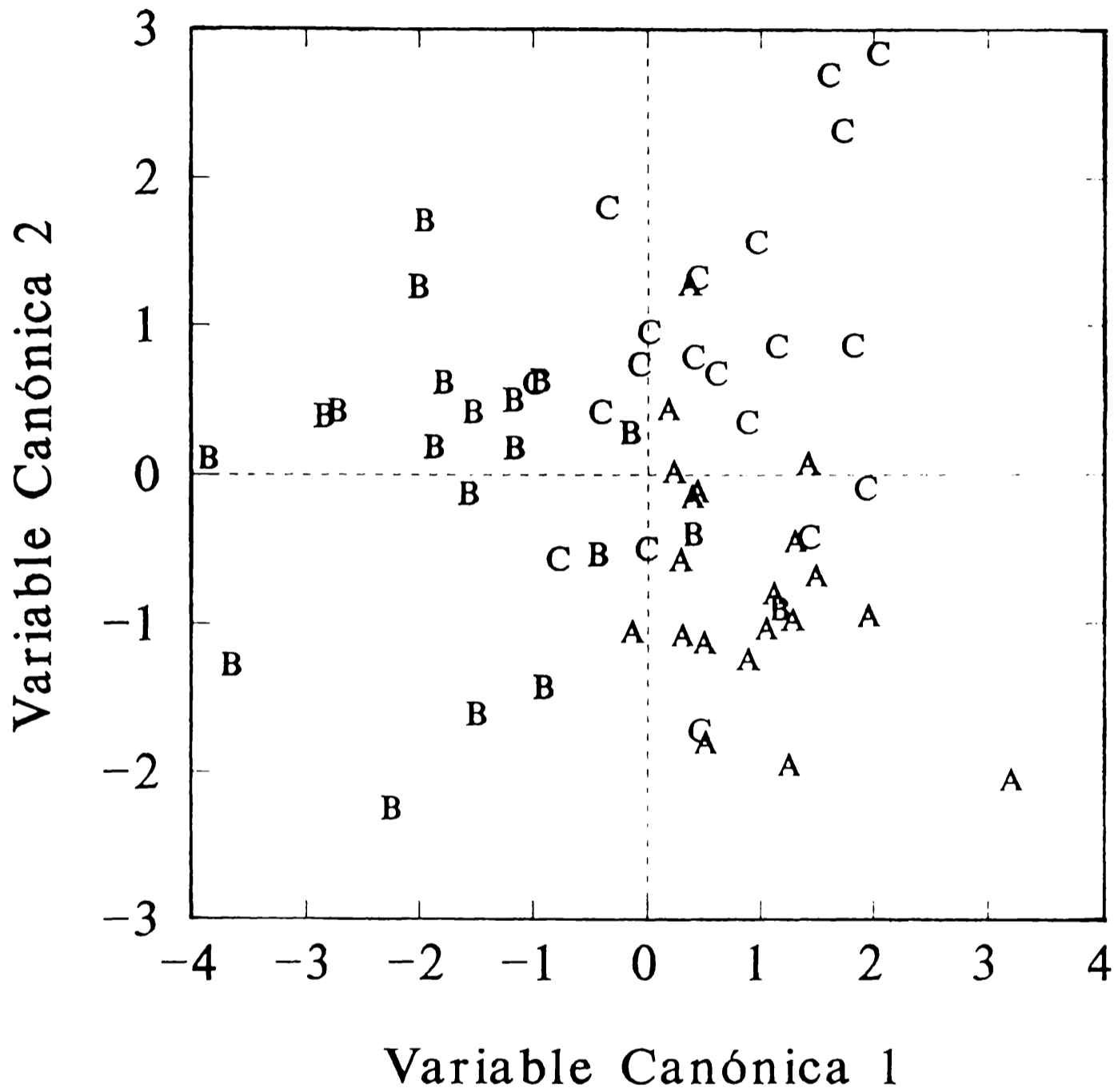


Fig. 4-10. Gráfico canónico de 60 muestras de queso Mozzarella. Las letras indican los tiempos de maduración: A, 6 a 13 días; B, 20 a 27 días; C, 34 a 41 días.



#### **4-6 CONSIDERACIONES FINALES**

Del estudio realizado en este capítulo se puede decir que cuando los quesos se congelaron después de cumplir un período de maduración de 14 días a 4°C no se vieron afectados los valores de nitrógeno no proteico respecto de las muestras que no fueron sometidas al ciclo de congelación-descongelación.

En cambio en las muestras que completaron la maduración de 14 días luego de haber sido congeladas y descongeladas, la proteólisis fue mayor. La congelación a los 6 días de maduración pudo haber debilitado la red proteica lo suficiente como para hacerla más susceptible a la proteólisis.

La velocidad de congelación y el almacenamiento congelado a -20°C afectaron los valores de dureza respecto de las muestras que fueron maduradas a 4°C con los mismos tiempos de maduración total. Las muestras que fueron maduradas a 4°C y no fueron congeladas tuvieron menores valores de dureza que aquellas sometidas al ciclo de congelación-descongelación después de 6 días de maduración.

Cuando los quesos eran congelados antes de completar el período de maduración de 14 días tenían mayores valores de dureza que cuando completaban la maduración luego de la descongelación. Los quesos de 14 días de maduración, que no fueron sometidos a almacenamiento congelado, no modificaron sus valores de dureza.

El almacenamiento congelado durante 3 meses tuvo un efecto endurecedor. Este hecho se podría atribuir a que durante la congelación el agua se separa de las proteínas para formar los cristales de hielo y que luego de la descongelación resulta difícil su reabsorción por la masa de queso. El aumento del diámetro cristalino durante el almacenamiento congelado hace más difícil la relocalización del agua en la interfase lípido-proteína después de la descongelación dando una estructura más dura.

Ni la velocidad de congelación, ni la maduración en una o dos etapas tuvo un efecto significativo sobre la adhesividad. Sin embargo, el almacenamiento congelado influyó en la adhesividad de muestras con 6 y 21 días de maduración total.

Ninguno de los factores estudiados tuvo un efecto significativo sobre la cohesividad de las muestras maduradas durante 6, 14 y 21 días y sometidas a congelación-

descongelación.

La elasticidad no se vio afectada por ninguno de los factores estudiados.

Respecto a las propiedades funcionales se observó que en los quesos madurados durante 6 días, que fueron congelados y más tarde descongelados, las características del queso fundido, inmediatamente después de congelado, fueron similares a las de las muestras que tenían 14 días de maduración previa, independientemente de las condiciones experimentales (velocidad de congelación y almacenamiento congelado).

Las muestras con 6 días de maduración previa, que se atemperaron a 4°C durante 8 días, luego de haber sido congeladas a -20°C y almacenadas a esta temperatura durante tres meses, mostraron menor viscosidad aparente y fundibilidad y mayor liberación de aceite que las que se maduraron durante el mismo tiempo y que no fueron sometidas al ciclo de congelación-descongelación. El almacenamiento congelado influyó sobre la cantidad de aceite liberado, sin embargo si los quesos completaron su maduración luego de la congelación-descongelación los valores de aceite liberado resultaron menores que cuando no la completaron. La destrucción de la red proteica durante el almacenamiento congelado produciría la coalescencia de los glóbulos de grasa y haría que se libere más aceite.

El almacenamiento congelado aumentó significativamente la viscosidad aparente sobre las muestras que fueron maduradas hasta completar un período de maduración de 21 días, sin afectar ni la fundibilidad ni el aceite liberado.

Respecto de la composición de ácidos orgánicos, los quesos que completaron su maduración después del período de almacenamiento congelado, no presentaron diferencias significativas respecto de los quesos que habían sido madurados bajo condiciones de refrigeración y que no habían sido congelados; comparándose las muestras que habían tenido los mismos tiempos de maduración totales.

Por consiguiente los resultados muestran que bajo las condiciones estudiadas, la congelación es una alternativa para prolongar la estabilidad y la vida útil de la Mozzarella de baja humedad sin modificar las propiedades funcionales del fundido.

## *Capítulo 5*

### ***CONCLUSIONES***

Del estudio realizado en el queso Reggianito envasado en películas plásticas resulta que:

- \* Los quesos Reggianito Argentino envasados en película plástica no mostraron desarrollo de hongos sobre su superficie, circunstancia que obliga, en una maduración tradicional (sin el uso de películas de envasado), a una operación de cepillado superficial, que implica costos adicionales de mano de obra.
- \* La baja permeabilidad al agua que poseen las películas utilizadas para el envasado disminuye significativamente la evaporación superficial y esto significa una pérdida de peso muy reducida durante el almacenamiento de los quesos para su maduración. Por consiguiente los quesos envasados tienen al final del período de maduración un contenido de agua mayor que el de los quesos sin envasar. Sin embargo, los rangos de humedad verificados en los quesos envasados, están dentro de los permitidos por el Código Alimentario Argentino (27 a 35%).
- \* El período elegido de 30 y 45 días, a partir de la fecha de fabricación, para envasar los quesos no afectaron los resultados del experimento; un período menor podría producir quesos cuyo contenido de humedad final excediera los límites permitidos.
- \* La disminución en el contenido de agua en la maduración tradicional conduce a un aumento en los parámetros de textura medidos (dureza y fuerza en la ruptura), lo cual se superpone a la disminución debida a la proteólisis.
- \* El aumento en el contenido de nitrógeno soluble, al avanzar la maduración, se corresponde con una disminución en la dureza y en la fuerza en la ruptura. Sin embargo esta disminución sólo fue detectada cuando el contenido de humedad no variaba

significativamente, ya que la disminución del contenido de agua genera un aumento en los parámetros de textura y este aumento compensa la disminución producida por la proteólisis.

\* La deformación relativa en el punto de ruptura fue independiente del contenido de nitrógeno soluble, a todos los contenidos de humedad.

\* Tanto los módulos elásticos como las viscosidades, determinados a través de los ensayos de relajación, no mostraron una tendencia definida con el tiempo hasta los 255 días, aumentando significativamente a partir de allí. Los valores de los parámetros estudiados fueron mayores para los quesos que no fueron envasados que para los quesos envasados. Esto dio como resultado que los quesos madurados tradicionalmente resultaran más duros y menos elásticos (mayor viscosidad y mayor módulo elástico de los elementos del modelo de Maxwell).

\* Desde el punto de vista de los ácidos orgánicos no hubo diferencias significativas en el contenido total de los mismos en los quesos envasados y en los tradicionales para todos los tiempos de maduración.

\* Solamente las concentraciones de los ácidos úrico y cítrico variaron significativamente entre las hormas envasadas y las no envasadas.

\* El análisis canónico permitió discriminar los quesos en grupos según su tiempo de maduración.

\* Los ácidos propiónico, pirúvico, láctico y cítrico resultaron predictores significativos del tiempo de maduración a partir del análisis regresional por etapas de los nueve ácidos estudiados, cuando se aplicó un modelo lineal multivariable.

Del estudio realizado sobre quesos Mozzarella congelados resulta que:

- \* De acuerdo con los parámetros estudiados el rango de tiempos de maduración más adecuado para quesos Mozzarella de baja humedad resultó ser entre catorce y veintiún días.
- \* El contenido de nitrógeno no proteico y la adhesividad de quesos Mozzarella refrigerados aumentaron con el período de maduración, mientras que la dureza y cohesividad mostraron cambios durante las primeras dos semanas permaneciendo luego constantes.
- \* Las muestras maduras 6 días a 4°C , congeladas y almacenadas a -20°C durante 3 meses tuvieron niveles de nitrógeno no proteico mayores que los correspondientes a las muestras no sometidas a congelación del mismo período de maduración.
- \* Las muestras que completaron 14 días de maduración antes de la congelación, tuvieron un valor de nitrógeno no proteico similar al de las muestras maduras a 4°C sin congelar.
- \* Las muestras sometidas al ciclo de congelación-descongelación antes de completar 14 días de maduración, (6 días a 4°C, congeladas y almacenadas a -20°C por 3 meses, descongeladas y mantenidas 8 días más a 4°C), mostraron mayor contenido de nitrógeno no proteico que las muestras que fueron almacenadas durante 14 días a 4°C antes de ser congeladas.
- \* Los quesos de 6 días de maduración que fueron congelados presentaron mayores valores de dureza que los quesos del mismo tiempo que fueron solamente refrigerados.

- \* Los quesos de 6 días de maduración que fueron congelados con distintas velocidades de congelación y descongelados no difirieron en sus valores de dureza.
- \* Los quesos de 6 días de maduración que fueron congelados y luego almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses mostraron endurecimiento respecto de los no almacenados.
- \* Las muestras que completaron un período de maduración de 14 días antes de ser congeladas no presentaron este efecto de endurecimiento después del almacenamiento congelado.
- \* En ninguna de las muestras con tiempo de maduración total de 14 días (hayan sido maduras en una o dos etapas) y almacenadas o no, se observaron variaciones de dureza debido a las velocidades de congelación.
- \* Ni la velocidad de congelación, ni la maduración en una o dos etapas tuvieron efecto significativo en la adhesividad de las muestras.
- \* El almacenamiento congelado produjo un aumento en los valores de adhesividad de las muestras con 6 y 21 días de maduración respecto de las muestras maduras y no congeladas de los mismos tiempos de maduración.
- \* Ninguno de los factores estudiados tuvieron influencia sobre la cohesividad y elasticidad del producto congelado. Sin embargo, la cohesividad de los quesos con 6 días de maduración fue significativamente más baja que la correspondiente los quesos de igual tiempo de maduración no sometidos a congelación.
- \* Los quesos con un tiempo total de almacenamiento de veintiún días no se vieron

afectados por ninguno de los factores estudiados, probablemente porque los parámetros analizados a esos tiempos hayan alcanzado sus niveles finales.

\* La viscosidad aparente de las muestras de queso con 6 días de maduración no fueron afectadas ni por la velocidad de congelación ni por el almacenamiento congelado.

\* Para muestras maduras 14 días a 4°C y luego congeladas y almacenadas a -20°C durante 3 meses, la viscosidad aparente disminuyó en comparación con las muestras descongeladas inmediatamente después de la congelación, independientemente de la velocidad de congelación. En cambio las muestras de queso que fueron maduras en dos etapas sí se vieron afectadas por la velocidad de congelación.

\* Los quesos congelados después de ser madurados durante 14 días, mostraron que después del almacenamiento congelado la viscosidad aparente disminuyó a valores similares a aquellos que tenían 21 días de maduración refrigerada a 4°C.

\* En las muestras que tuvieron 14 días de maduración antes del almacenamiento congelado y que se almacenaron a -20°C durante 3 meses se liberó mayor cantidad de aceite que en las no almacenadas. Sin embargo en las que se completó su maduración después del almacenamiento congelado se observó menor o igual liberación de aceite.

\* Ni el almacenamiento congelado ni las velocidades de congelación afectaron el aceite liberado para muestras con un período de maduración total de 6 o 21 días.

\* El aceite liberado fue mayor en las muestras de 14 días de maduración, sometidas al ciclo de congelación-descongelación, que en las muestras control refrigeradas.



- \* La fundibilidad disminuyó con el almacenamiento en las muestras que habían sido congeladas con 14 días de maduración previa.
  
- \* El contenido de ácidos orgánicos de las muestras de queso Mozzarella que fueron congeladas antes de completar el período de maduración no difirieron significativamente del correspondiente a las muestras control refrigeradas del mismo tiempo de maduración. Esto implica que los procedimientos de congelación-descongelación no modificaron el contenido de ácidos orgánicos, respecto de aquellos quesos que sufrieron un proceso de maduración tradicional.
  
- \* El análisis de componentes principales sobre los ácidos orgánicos no distinguió entre las muestras que habían sido congeladas y las que no fueron congeladas. Solamente el tiempo de almacenamiento produjo un efecto significativo
  
- \* Los quesos pudieron ser clasificados a través del contenido de ácidos orgánicos, utilizando un análisis discriminante canónico según sus tiempos de maduración.
  
- \* El queso Mozzarella de baja humedad, congelado y luego almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  no evidenció pérdida de calidad siempre que hubiese tenido un almacenamiento refrigerado entre catorce y veintiún días. Como se demostró que las velocidades de congelación (en el rango utilizado en estos experimentos) no afectaron los resultados obtenidos, se puede concluir que el queso Mozzarella de baja humedad puede ser congelado en una cámara de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  como bloques, porciones individuales o bien en forma granulada sin que se afecten sus atributos de calidad.

## **CONCLUSIONES FINALES**

### **Maduración en película**

No se observaron diferencias significativas entre los quesos madurados tradicionalmente y los envasados con respecto a los contenidos de nitrógeno soluble, nitrógeno no proteico y deformación relativa en la ruptura, mientras que dureza, fuerza en la ruptura y parámetros viscoelásticos fueron mayores para los quesos sin envasar. Los contenidos de los ácidos orgánicos no variaron para ambas condiciones de almacenamiento, excepto para los ácidos úrico y cítrico.

Es posible, entonces, madurar queso Reggianito en película plástica de baja permeabilidad gaseosa obteniéndose un producto similar al madurado tradicionalmente.

### **Congelación de quesos**

De acuerdo a los parámetros estudiados el rango de tiempos de maduración más adecuado, para queso Mozzaella de baja humedad, resultó ser entre 14 y 21 días.

Dentro de los factores estudiados, la maduración en dos etapas y el almacenamiento congelado son los que provocaron mayores cambios sobre los parámetros estudiados.

El queso Mozzarella congelado y almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  no evidenció pérdida de calidad siempre que hubiese tenido una maduración previa entre 14 y 21 días.

La congelación es por consiguiente una alternativa para prolongar la estabilidad y la vida útil de queso Mozzarella de baja humedad, conservando los atributos de calidad del mismo.

## ***REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS***

Adda, J., Gripon, J. C. y Vassal, L. (1982). The chemistry of flavour and texture generation in cheese, *Food Chem.*, **9**, 115.

Alonso, L., Ramos, M., Martín-Alvarez, P. J. y Suárez, M. (1987). Application of stepwise discriminant analysis to parameters for Characterizing frozen cabrales cheese. *J. Dairy Sci.*, **70**, 905.

Alonso, L., Juárez, M., Ramos, M., Martín-Alvarez, P. J. (1987). Effects of changes during ripening and frozen storage on the physicochemical and sensory characteristics of Cabrales cheeses. *Int. J. Food Sci. and Technol.* **22**, 525.

Alvarez, R. J. (1986). Expectations of Italian cheese in the pizza industry. En: *Proc. 23rd Annu. Marschall Italian Cheese Sem. Miles Lab. Inc.*, Madison, WI., 130.

Arnold, R. G., Shaham, K. M. y Dwivedi, B. K. (1975). Application of enzyme technology to dairy manufacturing, *J. Dairy Sci.* **58**, 1117.

Association of Official Analytical Chemists. (1984). *Official Methods of Analysis. method 15.160. 14th ed.* AOAC, Arlington, VA. Washington DC, USA.

Aston, J. W. y Dulley, J. R. (1982). Cheddar cheese flavour. *Aust. J. Dairy Technol.*, **21**, 229.

Aston, J. W., Gilles, J. E., Durward, I. G. y Dulley, J. R. (1985). Effect of elevated ripening temperatures on proteolysis and flavor development in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, **52**, 565.

Barlow, I., Lloyd, G. T., Ramshaw, E. H., Miller, A. J., Mc Cabe, G. P. y Mc Cabe, L. (1989). Correlations and changes in flavour and chemical parameters of Cheddar cheeses during maturation. *Aust. J. Dairy Technol.*, **44**, 7.

- Bertola, N. C., Bevilacqua, A. E. y Zaritzky, N. E. (1991). Changes in rheological and viscoelastic properties and protein breakdown during the ripening of "Port Salut Argentino" cheese. *Int. J. Food Sci. and Tech.*, **26**, 467.
- Bertola, N. C., Bevilacqua, A. E. y Zaritzky, N. E. (1992). Proteolytic and rheological evaluation of maturation of Tybo Argentino cheese. *J. Dairy Sci.*, **75**, 3273.
- Bevilacqua, A. E. y Califano, A. N. (1989). Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography, *J. Food Sci.*, **54**, 1076.
- Bevilacqua, A. E. y Califano, A. N. (1992). Changes in organic acids during ripening of Port Salut Argentino cheese, *Food Chem.*, **5**, 345.
- Bhowmik, T. y Marth, E. H. (1990). Role of Micrococcus and Pediococcus species in cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, **73**, 859.
- Bottazzi, V. y Dellaglio, F. (1967). Acetaldehyde and diacetyl production by *Streptococcus thermophilus* and other lactic streptococci, *J. Dairy Res.*, **34**, 109.
- Bourne, M. C. (1968). Textural profile of ripening pears. *J. Food Sci.*, **33**, 223.
- Bourne, M. C. (1982). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Academic Press. New York, USA.:
- Bouzas, J., Kantt C. A., Bodyfelt F. y Torres J. A. (1991). Simultaneous determination of sugars and organic acids in Cheddar cheese by high-performance liquid chromatography, *J. Food Sci.*, **56**, 276.

Box, G. E. P., Hunter, W. G. y Hunter, J. S. (1978). Designs with more than blocking variable. En: *Statistical for experiments*, 258 (editores J. Wiley & Sons, Inc.). New York, USA.

Breene, W. M. (1975). Application of texture profile analysis to instrumental food texture evaluation. *J. Texture Stud.*, **6**, 53.

Breene, W. M., Price, W. V. y Ernstrom, C. A. (1964). Manufacture of pizza cheese without starter. *J. Dairy Sci.*, **47**, 1173.

Brennan, J. G., Jowitt, R. y Hughsi, O. A. (1970). Some experiences whit the General Foods Texturometers. *J. Texture Stud.*, **1**, 167.

Brookfield Eng. Lab. Inc. En: *Brookfield Viscometer Manual, Helipath stand spindle factors*, **83**, 101- B. Stoughton, Ma., USA.

Caboni, M. F., Zannoni, M. y Lercker, G. (1990). Fat lipolysis in Parmigiano - Reggiano cheese. *Sci. e Tec. Lattiero- Casearia*, **41** (suppl.), 289.

Cervantes, M. A., Lund D. B. y Olson, N. F. (1983). Effects of salt concentration and freezing on Mozzarella cheese texture. *J. Dairy Sci.*, **66**, 204.

Chandan, R. C. (1982). Shelf life of film-packaged cheese influenced by handling, storage. *Dairy Record*, (febrero), 141.

Chen, A. H., Larkin, J. W., Clark, C. J. y Irwing, W. E. (1979). Textural analysis of cheese. *J. Dairy Sic.*, **62**, 901.

Chen, A. H. y Larson, B. L. (1971). Pyrimidine synthesis pathway enzymes and orotic acid in bovine mammary tissue. *J. Dairy Sci.*, **54**, 842.

Christensen, V. W. (1966). Comparison of manufacturing methods for high and low moisture Mozzarella. En: *Proc. 3rd Annu. Marschall Italian Cheese Sem., Madison, WI., USA.*

Christensen, T. M. I. E., Kristiansen, K. R. y Madsen. (1989). Proteolysis in cheese investigated by high performance liquid chromatography. *J. Dairy Res.*, **56**, 823

Cliffe, A. J. y Law, B. A. (1991). A time course study of peptide production in accelerated-ripened Cheddar cheese using reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Biotechnol.*, **5**, 1

Código Alimentario Argentino Actualizado. de La Canal y asociados S. R. L. Actualizado (1993). Buenos Aires, Argentina.

Creamer, L. K. (1976). Casein proteolysis in Mozzarella type cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. and Technol.*, **11**, 130.

Creamer, L. K. y Olson, N. F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *J. Food Sci.*, **47**, 631.

Dahlstrom, D. G. (1978). Frozen storage of low-moisture part-skim Mozzarella cheese. *M.S. Thesis, Food Sci. Dept., Univ. of Wisconsin, Madison, USA..*

de Jong, L. (1976). Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 1-Proteolysis an consistency of Noordhollandse Meshanger cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, **30**, 242.

de Jong, L. (1978). Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 3-The micellar structure of Meshanger cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, **32**, 15.

Desmazeaud, J. M. y Gripon, J. C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, **32**, 731.

Diefes, H. A., Rizvi, S. S. H. y Bartsch, J. A. (1993). Rheological behavior of frozen and thawed low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Food Sci.*, **58**, 764.

Dulley, J. R. y Grieve, P. A. (1974). Volatile fatty acid production in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, **29**, 120.

Eberhard, P. y Fluckiger, E. (1978). Comparison between subjective and objective texture evaluation of Emmental cheese. *Schweizerische Milchzeitung.*, **104**, 432.

Eigel, W. N., Hofmann, C. J., Chibber, B. A. K., Tomich, J. M., Keenan, T. W. y Mertz, E. T. (1979). Plasmin-mediated proteolysis of casein in bovine milk. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**, 2244.

Emmons, D. E., Kalab, M., Larmond, E. y Lowrie, R. J. (1980). Milk gel structure. 10. Texture and microstructure in cheese made from whole milk and from homogenized low-fat milk. *J. Texture Stud.*, **11**, 15.

Empie, M. W. y Melachouris, N. (1978). Determination of orotic acid in whey and modified whey products. *J. Dairy Sci.*, **61**, 683.

Exterkate, F. A., de Jong, M., de Veer, G. J. C. M. y Baankreis, R. (1992). Location and characterization of aminopeptidase N En: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HP. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 46.

Farkye, N. Y., Kiely, L. J., Allshouse R. D. y Kindstedt, P. S. (1991). Proteolysis in Mozzarella cheese during refrigerated storage. *J. Dairy Sci.*, **74**, 1433.



Fedrick, I. A. y Dulley, J. R. (1984). The effect of elevated storage temperatures on the rheology of Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **19**, 141.

Fennema, O. (1972). Freezing of cheese—pros. and cons. *En: Western Milk Ice Cream News*.20. Leete Publ., Greenbrae, CA., USA.

Filchacova, N., Pankova, R. I., Mishenina Z. A. y Ovcharova G. P. (1983). Changes of protein properties in cheese during freezing. *XVI International Congress of Refrigeration. Paris, 502. International Institute of Refrigeration.*

Fiszman, S. M., Costell, E. y Durán, L. (1983). Medida del comportamiento reológico de los alimentos sólidos. II. Métodos fundamentales. *Revista Agroquím. Tecnol. Alim.*, **23**(3), 303.

Fox, P. F. (1987). Cheese: an overview. *En: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol.1 General Aspects.* (editor P.F. Fox). Elsevier Applied Science. New York, USA..

Fox P.F. y Law J. (1991) Enzymology of Cheese Ripening. *Food Biotechnol.*, **5**(3), 239.

Fradin, M. L'affinage sous film. (1984). *En: Le Fromage. Technique et Documentation.* Lavoisier. Francia. Pp. 303.

Fryer, T. F. (1982). The controlled ripening of Cheddar cheese. *En: Proceedings of the XXI International Dairy Congress, Moscow, 485.* Mir Publishers, Moscow.

Giannuzzi, L., Lombardi, A., Zaritzky, N. E. (1997). Microbial flora in hard and soft cheese packaged in flexible plastic films. *Italian J. Food Sci.*, (en prensa).

Gilles, J. y Lawrence, R. C. (1973). The assessment of Cheddar cheese quality by

compositional analysis. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **8**, 148

Grazier, C. L., Simpson, R. J., Roncagliolo, S. y Torres, J. A. (1991). Temperature effects on non-starter bacteria populations during cooling and aging of Cheddar cheese blocks. *Annual Meeting of the American Dairy Sci. Assoc.*

Grazier, C. L., Simpson, R. J., Roncagliolo, S., Bodyfelt, F. W. y Torres, J. A. (1993). Modelling of time-temperature effects on bacteria population during cooling of Cheddar cheese blocks. *J. Food Proc. Eng.*, **16**(3), 173.

Green, M. L. y Manning D. J. (1982). Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *J. Dairy Res.*, **49**, 737.

Green, M. L., Marshall, R. J. y Brooker, B. E. (1985). Instrumental and sensory texture assessment and fracture mechanism of Cheddar and Cheshire cheese. *J. Texture Stud.*, **16**, 351.

Groux, M. (1973). Flavour components of yoghurt. *Lait*, **53**, 146.

Grufferty, M. B. y Fox, P. F. (1988). Factors affecting the releasing of plasmin Activity from casein micelles. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **23**, 153.

Gudkow, A. W., Perfiljew, G. D., Dokunin, W. N., Chandak, R. N., Belowa, G. A., Rosdow, I. A. y Sweschinski, O. M. (1980). Nuevos revestimientos polimerizados para quesos. En: *Fabricación de Productos Lácteos*. Ed Acribia. Zaragoza, España. Pp 209.

Guinee, T. P. y Fox, P. F. (1987). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1. General Aspects*. (editor P. F. Fox). Elsevier Applied Science, New York. USA.

Haasnoot, W., Stouten, P. y Venema, P. (1989). High performance liquid chromatography determination of the extent of proteolysis in Gouda cheese. *J. Chromatogr.*, **483**, 319.

Hakkaraien, H. (1978). Conference 38 ST. *XX International Dairy Congress*, Paris.

Holmes, D. G., Duersch, J. W. y Ernstrom, C. A. (1977). Distribution of milk clotting enzymes between curd and whey and their survival during Cheddar cheesemaking. *J. Dairy Sci.*, **60**, 862.

Hough, G., Martinez, E., Barbieri, T., Cantarini, A. y Vega, M. J. (1994). Sensory profiling during ripening of Reggianito grating cheese, using both traditional ripening and in plastic wrapping. *Food Qual. and Pref.*, **5**, 271.

Hough, G., Califano, A.N., Bertola, N. C., Bevilacqua, A. E., Martinez, E. Vega, M.J. y Zaritzki, N. E. (1996). Partial least squares correlations between sensory and instrumental measurements of flavor and texture for reggianito grating cheese. *Food Qual. and Pref.*, **7**, 47.

Humbert, G. M., Guingamp, M. F., Kouomegne, R. y Linden, G. (1990). Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene-sulphonic acid and a new dissolving reagent. *J. Dairy Res.*, **57**, 143.

Imoto, E.M., Lee, C. H. y Rha, C. (1979). Effect of compression ratio in the mechanical properties of cheese. *J. Food Sci.*, **44(2)**, 343.

Kaminogawa, S., Ninomiya, T. y Yamuchi, K. (1984). Aminopeptidase profiles of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, **67**, 2483.

Kfoury, M. , Mpagna, M. y Hardy, J. (1989). Effect of cheese ripening on rheological properties of Camembert and Saint-Paulin cheese. *Lait*, **69(2)**, 137.

Kiely, L. J., Kindstedt, P. S., Hendricks G. M., Levis, J. E., Yun J. J. y Barbano, D. M. (1993). Age-related changes in the microstructure of Mozzarella cheese. *Food Struct.*, **11**, 13.

Kindstedt, P. S., Rippe J. K. y Duthie C. M. (1989). Application of helical viscometry to study commercial Mozzarella cheese melting properties. *J. Dairy Sci.*, **72**, 3123.

Kindstedt, P. S., Kiely L. J. y Gilmore, J. A. (1992). Variation in composition and functional properties within brine-salted Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, **75**, 2913.

Kindstedt, P. S. (1993). Effect of manufacturing factors, composition, and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **33**, 167.

Kosikowski, F. V. (1982). *Cheese and Fermented Milk Foods*, 2nd edn. Edwards Brothers Inc., Arbor, Michigan, USA.

Laleye, L. C., Simard, R. E., Lee, B. H. y Holley, R. A. (1990). Quality attributes of Cheddar cheese containing added lactobacilli. *J. Food Sci.*, **55**, 114.

Larson, B. L. y Hegarty, H. M. (1979). Orotic acid in milks of various species of commercial dairy products. *J. Dairy Sci.*, **62**, 1641.

Law, B. A. y Sharpe, M. E. (1977). The influence of the microflora of Cheddar cheese on flavour development. *Dairy Industries Int.*, **42**, 10.

Law, B. A. (1982). Cheeses. En: *Economic Microbiology. Vol 7. Fermented Foods*. (editor A. H. Rose). Academic press, London, Gran Bretaña. Pp. 147.

Law, B. A. y Wigmore, A. (1982). Accelerated ripening of Cheddar cheese with a commercial proteinase and intracellular enzymes from starter strptococci. *J. Dairy Res.*, **50**, 519.

Law, B. (1984). Flavour development in cheeses. En: *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, (editores F. L. Davies y B. A. Law). Elsevier Applied Science, London, Gran Bretaña. Pp.187.

Law, B. (1987). Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1. General Aspects*. (editores P. F. Fox.), Elsevier Applied Science, New York., USA.

Lawrence, R.C., Gilles, J. y Creamer L.K. (1983). The relationship between cheese texture and flavour. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **18**, 175.

Lawrence, R.C., Heap, H. A. y Gilles, J. (1984). A contolled approach to cheese technology. *J. Dairy Sci.*, **67**, 1632.

Lawrence, R. C., Creamer, L. K. y Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *J. Dairy Sci.*, **70**, 1748.

Lee, C. H., Imoto, E. M. y Rha, C. (1978). Evaluation of cheese texture. *J. Food Sci.*, **43**, 1600.

Lee, B. H., Laleye, L. C., Simard, R. E., Munsch, M. H. y Holley, R. A. (1990). Influence of homofermentative lactobacilli on the microflora and soluble nitrogen components in Cheddar cheese. *J. Food Sci.*, **55**, 391.

Leveau, J. Y., Bouix, M. (1993). *Microbiologie Industrielle*. Technique & Documentation-Lavoisier. Paris, Francia.

Luck, H. (1977). Preservation of cheese and perishable dairy products by freezing. *South African J. Dairy Technol.*, **9**, 127.

Malder, H. (1952). Taste and flavour forming substances in. *Neth. Milk Dairy J.*, **6**, 157.

Manual oficial para el análisis bromatológico. (1972). Instituto Biológico y Laboratorio de Salud Pública. Ministerio de Bienestar Social de la Prov. de Buenos.Aires.

Marth, E. H. (1963). Microbiological and chemical aspects of Cheddar cheese ripening. A review. *J. Dairy Sci.*, **48**, 869.

Martín-Hernández, M. C., Juárez, M. y Ramos, M. (1988). Influencia del proceso de congelación sobre las características de un queso semiduro elaborado con mezcla de leche de cabra y vaca. *Rev. Agroquím. Aliment.*, **28**, 45.

Masi, P. y Addeo, F. (1986). An examination of some mechanical properties of a group of Italian cheeses and their relation to structure and conditions of manufacture. *J. Food Eng.*, **5**, 217.

Massoni, F., Maccagni, A., Emaldi, G. C. y Passaler, L. (1985). Maturazione de formaggi confezionati sotto vuoto in film semipermeabili. Nota 1: Grana Padano. *Latte*, **10**, 121.

Matalon, M. E. y Sandine, W. E. (1986). *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and yogurt: a review. *Cult. Dairy Prod. J.*, **21**(4), 6.

Matheson, A. R. (1981). Determination of chymosin by radioimmunoassay. *N. Z. J. Dairy Sci. and Technol.*, **16**, 33.

Micketts, R. y Olson, N. F. (1974). Manufacture of Mozzarella cheese by direct acidifications with reduced amounts of rennet and pepsin. *J. Dairy Sci.*, **57**, 273.

Mitchel, J. R. (1976). Rheology of gels. *J. Texture Stud.*, **7**, 313.

Mora, R., Nanni, M. y Panani, G. (1984). Physical, microbiological and chemical changes in Parmigiano Reggiano cheese during the first 48 hours, *Sci. e Tec. Lattiero - Casearia*, **35**, 20.

Nakae, T. y Elliot, J. A. (1965). Volatile fatty acids produced by some lactic acid bacteria. I. Factors influencing production of volatile fatty acids from caseinate hidrolysate. *J. Dairy Sci.*, **48**, 287.

Nuñez, M., Gaya, P., Medina, M., Rodriguez-Marín, M. A. y García-Aser, C. (1986). Changes in microbiological, Chemical, rheological and sensory characteristics during ripening of vacuum-packaged Manchego cheese. *J. Food Sci.*, **51**(6), 1451.

Nussinovitch, A., Peleg, M. y Normand, M. D. (1989). A modified Maxwell and a nonexponential model for characterization of the stress relaxation of agar and alginate gels. *J. Food Sci.*, **54** (4), 1013.

Oberg, C. J., Merrill, R. K., Moyes, L. V., Brown, R. J. y Richardson, G. H. (1991). Effects of *Lactobacillus helveticus* on physical properties of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, **74**, 4101.

Oberg, C. J., Wang A., Moyes L. V., Brown R. J. y Richardson G. H. (1991). Effects of proteolytic activity of thermolactic cultures on physical properties of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, **74**, 389.

Oberg, C. J., Merrill R. K., Brown R. J., y Richardson G. H. (1992). Effects of milk-clotting enzymes on physical properties of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, **75**, 669.

- Oberg, C. J., Merrill R. K., Brown R. J., y Richardson G. H. (1992). Effects of freezing, thawing and shredding on low moisture, part-skim Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, **75**, 1161.
- O'Keefe, R. B., Fox, P. F. y Daly, C. (1976). Contribution of rennet and starter proteases to proteolysis in Cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, **43**, 97.
- Olson, N. F. (1990). The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**, 131.
- Ollikainen, P. (1990). Titration- a rapid method for the determination of proteolysis in cheese. *J. Dairy Res.*, **57**, 149.
- Paquet, A., y Kalab, M. (1988). Amino acid composition and structure of cheese baked as a pizza ingredient in conventional and microwaves ovens. *Food Microstruct.*, **7**, 93.
- Park, J., Rosenau J. R., y Peleg, M. (1984). Comparison of four procedures of cheese meltability evaluation. *J. Food Sci.*, **49**, 1158.
- Peleg, M. y Calzada, J. F. (1976). Stress relaxation of deformed fruits and vegetables. *J. Food Sci.*, **41**, 1325.
- Peleg, M. (1977). The role of the specimen dimensions in uniaxial compression of food materials. *J. Food Sci.*, **42**, 649.
- Peleg, M. (1979). Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. *J. Food Sci.*, **44**, 277.



- Peleg, M. (1980). Rheological models for solids foods. En: *Food Process Engineering*. 1, *General Aspects*. (editores P. Linko , Y. Malkian y J. Olkku) Applied. Sci. Pub. Ltd. New York, USA..
- Pham, A. y Nakai, S. (1983). Application of stepwise discriminant analysis to high pressure liquid chromatography profiles of water extract for judging ripening of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, **67**, 1390.
- Piggot, J. R. (1982). Simplification of sensory assessment profiles and their relationship to preference and acceptability data. En: *Food research and data analysis*. (editores H. Martens y H. Russwurm). Appl. Sci. Publ. Londres, Gran Bretaña. Pp. 309.
- Piggot, J. R. y Sharman, K. (1986). Methods to aid interpretation of multidimensional data. En: *Statistical procedures in food research*. (editor J. R. Piggot). Elsevier Appl. Sci., Londres, Gran Bretaña. Pp 181.
- Rank, T. C., Grappin, R. y Olson, N. F. (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review. *J. Dairy Sci. Technol.*, **68**, 801.
- Reinbold, G. W. (1989). Spare the rod (or coccus) and spoil the cheese?. *Dairy Dialogue*, **4**(1), 1.
- Reiter, B., Sorokin, Y., Pickering, A. y Hall, A. J. (1969). Hidrolysis of fat and protein in small cheeses made under aseptic conditions. *J. Dairy Res.*, **36**, 65.
- Richardson, B. C. y Creamer, L. K. (1973). Casein proteolysis and bitter peptides in Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **8**, 46.

Roundy, Z. D. (1965). Good starters-the important factor in good body and texture and good flavor development. En: *Proc. 2nd Annu. Marschall Italian Cheese Sem.*, Madison, WI.

Schmidt, D. G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. En: *Developments in Dairy Chemistry*. (editor P. F. Fox) 1, 61. Appl. Sci. Publ., Ltd., Barking, Gran Bretaña.

Scott, R. (1985). *Cheesemaking Practice*. Elsevier Applied Sci. Publishers. New York, USA.

Seitz, E. W. (1990). Microbial and enzyme-induced flavors in dairy foods. *J. Dairy Sci.*, **73**, 3664.

Shannon, C. W. (1975). The effect of freezing Cheddar cheese on certain physical characteristics and the survival of some microorganisms. *PhD. Diss., Mississippi State Univ.*, Mississippi State. Sherman, N, P.(1970). *Industrial Rheology*. Academic Press, New York, USA.

Sherman, P. (1970). A textural profile of foodstuffs based upon well-defined rheological properties. *J. Food Sci.*, **34**, 458.

Sherman, P. (1976). The textural Characteristics of dairy products. En *Rheology and texture in food quality*, Cap.10, 382. Editado por J.M. de Man, P.M.Voisey, V. F. Rasper, D. W. Stanley. A.V.I Westport. CT, USA.

Singh, S. y Kristoffersen, T. (1970). Factors affecting flavour development in buffalo milk Cheddar cheese slurries. *J. Dairy Sci.*, **53**, 533.

Speck, M. L. (1971). Rod and coccus starters. En: *Proc. 8th Annu. Marschall Italian Cheese Sem.*, Madison, WI.

Stadhouders, J. y Hup, G. (1975). Factors affecting bitter flavour in Gouda cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 335.

Szczesniak, A. S. (1975). General foods texture profile revisited. Ten years perspective. *J. Texture Stud.*, **6**, 5.

Thomas, T. D. (1985). Role of lactic acid bacteria and their improvement for production of better fermented animal products. *N. Z. J. Dairy Sci. and Technol.*, **20**, 1.

Thomas, T. D. y Pearce, K. N. (1981) Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in cheddar cheese, *N. Z. J. Dairy Sci. and Technol.*, **16**, 253.

Thomas, T. D. y Pritchard, G. G. (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *Fed. Eur. Microbiol. Soc. Microbiol. Rev.*, **46**, 245.

Topal, R. S. (1991). Effects of different packaging materials and techniques on the curing of Kashar cheese and on its surface moulds. *Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie*, **24**, 341.

Tunick, M. H., Mackey K.L., Smith P.W. y Holsinger, V. H. (1991). Effect of composition and storage on the texture of Mozzarella cheese. *Neth. Milk Dairy J.* **45**, 117.

Tunick, M. H., Mackey K.L., Shieh J. J., Smith P. W., Cooke P. y Malin E. L. (1993). Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. *Int. Dairy J.*, **3**, 649.

Urbach, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. *Int. Dairy J.*, **3**, 389.

Vernon-Carter, E. J. y Sherman, P. (1978). Evaluation of the firmness of Leicester cheese by compression test with the Instron Universal Testing Machine. *J. Texture Stud.*, **9**, 311.

Visser, S. K., Slangen, K. J. y Hup, G. (1975). Some bitter peptides from rennet-treated casein. A method for their purification utilizing chromatographic separation on silica gel. *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 319.

Visser, S. K. (1981). Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. *Neth. Milk Dairy J.*, **35**, 65.

Visser, S. (1993). Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J. Dairy Sci.*, **76**, 329.

Walpole, R. E. y Myers, R. H. (1992). *Probabilidad y Estadística*. 4th ed. Mc Graw-Hill, Buenos Aires, Argentina.

Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, **73**, 1965.

Walstra, P. y van Vliet. (1982). Rheology of cheese. *Int. Dairy Fed. Bull. Doc.*, 153

Webb, B. H. y Arbuckle, W. S. (1977). Freezing of dairy products. En: *Fundamentals of Food Freezing*. (editores N. W. Desrosier y D. K. Tressler ), AVI Publishing Co. Inc., Wesport, CT, USA.

Whitehead, W. E., Ayres, J. W. y Sandine, W. E. (1993). A review of starter media for cheese making . *J. Dairy Sci.*, **76**, 8.

Wilkinson, L. (1990). SYSTAT. *The System for Statistics*. Evanston, IL, USA: SYSTAT, Inc. Pp 190-313.

Yun, J. J. , Barbano, D. M., Ransmussen, R. R. y Kindstedt, P. S. (1992). Impact of rod to coccus ratio on titratable acidity, pH, make time, and viable count of rod and coccus during and after Mozzarella cheese making. *J. Dairy Sci.*, 75 (suppl.1), 100

Yun, J. J. , Barbano, D. M., Ransmussen, R. R. y Kindstedt, P. S. (1992). Impact of rod to coccus ratio on chemical composition, proteolysis, and texture of Mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.*, 75 (suppl.1), 100

Yun, J. J., Barbano, D. M., y P. S. Kindstedt. (1993). Mozzarella cheese: impact of coagulant type on chemical composition and proteolysis. *J Dairy Sci.*, 76, 3648.

Yun, J. J., Kiely, L. J., Kindstedt, P. S. y Barbano, D. M. (1993). Mozzarella cheese: impact of milling pH on functional properties. *J. Dairy Sci.*, 76, 3639.

Zalazar, C.A. Coagulación de la leche y enzimas coagulantes. (1994). En: Ciencia y Tecnología de los productos lácteos. Diagrama S.A. Santa Fe. Argentina.

Zalazar, C.A. Bioquímica de la maduración de quesos. (1994). En: *Ciencia y Tecnología de los productos lácteos*. Diagrama S.A. Santa Fe. Argentina.

- A : adhesividad (J)
- $A_i$  : coeficientes que dependen de las propiedades viscoelásticas del material
- APT : análisis de perfil de textura
- C : cohesividad
- D : Dureza (N)
- E : constante del resorte
- $E_\infty$  : módulo de elasticidad de equilibrio
- $E_i$  : módulos elásticos de los elementos
- $\epsilon_r$  : deformación relativa en el punto de ruptura (%)
- $\epsilon_v$  : deformación relativa verdadera
- $\eta$  : viscosidad (Pa s)
- F : fuerza aplicada a un elemento elástico (N)
- $F_t$  : fuerza instantánea durante el tiempo de relajación (N)
- $F_0$  : fuerza inicial antes del decaimiento de la tensión (N)
- $F_r$  : fuerza en la ruptura (N)
- $L_0$  : altura inicial de la muestra (cm)
- $L_r$  : altura de la muestra en el punto de ruptura (cm)
- NT : nitrógeno total ( $\text{mg g}^{-1}$ )
- NS : nitrógeno soluble ( $\text{mg g}^{-1}$ )
- NNP : nitrógeno no proteico ( $\text{mg g}^{-1}$ )
- $\sigma$  : tensión aplicada (Pa)
- $\sigma$  : tensión verdadera (Pa)
- $\tau$  : tiempo de relajación (s)
- u : desplazamiento (cm)
- VA : viscosidad aparente (Pa s)
- W : contenido de humedad ( $\text{g g}^{-1}$ )

