

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
FACULTAD DE VETERINARIA



**DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**TESIS DOCTORAL**

**“ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, FÍSICO-  
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DE QUESOS TIPO  
MANCHEGO ELABORADOS CON DIVERSOS TIPOS DE COAGULANTE”.**

Francisco Prados Siles  
Córdoba, 2005

TÍTULO: *Estudio de las características bioquímicas, físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de quesos tipo manchego elaborados con diversos tipos de coagulante*

AUTOR: *Francisco Prados Siles*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

**“ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, FÍSICO-  
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DE QUESOS TIPO  
MANCHEGO ELABORADOS CON DIVERSOS TIPOS DE COAGULANTE”.**

Francisco Prados Siles  
Córdoba, 2005



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

**“ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS, FÍSICO-  
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y SENSORIALES DE QUESOS TIPO  
MANCHEGO ELABORADOS CON DIVERSOS TIPOS DE COAGULANTE”.**

Memoria presentada por el Licenciado D. Francisco Prados Siles para optar al grado  
de Doctor en Veterinaria.

El Doctorando

Fdo.: Francisco Prados Siles

VºBº  
EL DIRECTOR

Fdo.: Prof. Dr. José Fernández-Salguero Carretero



**JOSÉ FERNÁNDEZ-SALGUERO CARRETERO**, Catedrático de Tecnología de Alimentos del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba

**INFORMA:**

Que el trabajo presentado por el licenciado D. Francisco Prados Siles titulado **“Estudio de las características bioquímicas, físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de quesos tipo Manchego elaborados con diversos tipos de coagulantes”**, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, estimando que cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente informe en Córdoba a 22 de febrero de 2005.

José Fernández-Salguero Carretero





## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al **Prof. Dr. D. José Fernández-Salguero Carretero**, director de esta tesis, y al **Prof. D. Rafael Gómez Díaz** por su estímulo, orientación y apoyo constante, que han permitido llevar a buen fin este trabajo.

A la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT), por la concesión de los Proyectos ALI99-0745, denominado “Actividades coagulantes y proteolíticas de enzimas vegetales obtenidas por liofilización y de enzimas recombinantes en la fabricación de quesos de oveja” y AGL 2002-02752 denominado “Utilización de enzimas vegetales en la maduración acelerada de quesos de oveja”, por su aportación a la financiación del presente trabajo, y al Grupo de Investigación AGR120 “Lactología y Tecnología de la Carne” del Plan Andaluz de Investigación (PAI).

A la cooperativa agroganadera **COVAP** y al personal de la industria quesera en la cual se realizaron los quesos por las facilidades ofrecidas para la elaboración de los mismos.

A **Luis, Montse, Pepe, Antonio, María, Cristina y Elena** compañeros y amigos de trabajo, y a todas las demás personas del **Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos** por su constante ayuda y amistad.

Al **Prof. D. Juan José Moreno Vigara** por su inestimable ayuda con el cromatógrafo de gases.

A toda mi **familia** y a Isa por su paciencia y apoyo incondicional en los momentos más difíciles.



A mi Familia

A Isa



*“En el caso de la observación, la suerte sólo favorece a los espíritus preparados”*

Pasteur, L.

*“La naturaleza no hace nada superfluo, nada inútil, y sabe sacar múltiples efectos de una sola causa”*

Copérnico

*“Una nueva teoría no se impone porque los científicos se convencen de ella, sino porque los que siguen abrazando las ideas antiguas van muriendo poco a poco y son sustituidos por una nueva generación que asimila las nuevas teorías desde el principio”*

Planck, M.



ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
I.1.- ASPECTOS HISTÓRICOS.....	1
I.2.- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS QUESOS.....	3
I.3.- COMPOSICIÓN QUÍMICA Y FÍSICO-QUÍMICA DEL QUESO.....	5
I.3.1.- HIDRATOS DE CARBONO.....	8
I.3.1.1.- Acidificación.....	9
I.3.2.- LÍPIDOS.....	11
I.3.2.1.- Lipólisis.....	12
I.3.3.- COMPUESTOS NITROGENADOS.....	19
I.3.3.1.- Proteolisis.....	25
I.3.4.- MINERALES.....	34
I.3.5.- AGUA.....	37
I.3.6.- PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: $a_w$ y pH.....	39
I.3.6.1.- $a_w$ .....	39
I.3.6.2.- pH.....	39
I.4.- MICROBIOLOGÍA.....	40
I.4.1.- CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE.....	40
I.4.2.- CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL QUESO.....	44
I.4.2.1.- Aerobios mesófilos.....	45
I.4.2.2.- Enterobacterias y coliformes.....	46
I.4.2.3.- Estafilococos y Micrococos.....	47
I.4.2.4.- Bacterias ácido lácticas.....	48
I.4.2.5.- Levaduras y mohos.....	51
I.5.- ANÁLISIS SENSORIAL.....	52
I.5.1.- GENERALIDADES.....	52
I.5.2.- ANÁLISIS SENSORIAL APLICADO AL QUESO.....	55
I.6.- COAGULANTES.....	58
I.6.1.- ASPECTOS GENERALES.....	58
I.6.2.- COAGULANTES VEGETALES: <i>CYNARA SP</i> .....	61
I.6.3.- UTILIZACIÓN DE <i>CYNARA CARDUNCULUS</i> EN LA	



## Índice

ELABORACIÓN DEL QUESO.....	66
I.7.- QUESOS DE OVEJA.....	68
<b>II.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>73</b>
<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
<b>III.1.- MATERIAL.....</b>	<b>75</b>
III.1.1.- MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO.....	75
III.1.1.1.- Análisis físico-químico.....	75
III.1.1.2.- Análisis microbiológico.....	76
III.1.2.- MATERIAL EXPERIMENTAL.....	77
III.1.2.1.- Elaboración del queso.....	77
III.1.2.2.- Obtención de los extractos de flores liofilizados.....	79
III.1.2.3.- Obtención de la cipsosina recombinante.....	79
III.1.2.4.- Preparación de las muestras analíticas.....	80
<b>III.2.- MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
III.2.1.- DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	81
III.2.1.1.- $a_w$ .....	81
III.2.1.2.- pH.....	81
III.2.2.- PARÁMETROS DE COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	82
III.2.2.1.- Humedad.....	82
III.2.2.2.- Grasa.....	82
III.2.2.3.- Proteína.....	82
III.2.2.4.- Cenizas.....	82
III.2.2.5.- Cloruros.....	82
III.2.2.6.- Acidez titulable.....	83
III.2.3.- DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES NITROGENADOS.....	83
III.2.3.1.- Nitrógeno soluble (NS).....	83
III.2.3.2.- Nitrógeno no proteico (NNP).....	85
III.2.3.3.- Nitrógeno aminoacídico (NAA).....	85
III.2.3.4.- Nitrógeno amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ).....	87
III.2.3.5.- Grupos amino libres (N-NH <sub>2</sub> ).....	88

## Índice

III.2.3.6.- Cálculo del nitrógeno de las proteínas (NP), nitrógeno de las caseínas (NC), nitrógeno de las proteasas peptonas (Npp) y nitrógeno de los péptidos.....	89
III.2.4.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	89
III.2.4.1.- Preparación de muestras y diluciones.....	89
III.2.4.2.- Determinaciones microbiológicas.....	90
III.2.4.3.- Enumeración de aerobios mesófilos.....	90
III.2.4.4.- Enumeración de enterobacteriáceas.....	90
III.2.4.5.- Recuento de coliformes.....	91
III.2.4.6.- Enumeración de estafilococos.....	91
III.2.4.7.- Recuento de micrococos.....	92
III.2.4.8.- Recuento de Bacterias ácido lácticas.....	92
III.2.4.9.- Enumeración de levaduras y mohos.....	93
III.2.4.10.- Cálculo de la velocidad de muerte microbiana.....	93
III.2.5.- ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN MINERAL.....	93
III.2.5.1.- Pretratamiento de la muestra.....	93
III.2.5.2.- Determinaciones analíticas.....	94
III.2.5.3.- Determinación del fósforo.....	98
III.2.6.- ANÁLISIS DE LOS AGE POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA.....	99
III.2.7.- EVALUACIÓN DE LOS ATRIBUTOS SENSORIALES.....	100
III.2.8.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	102
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
IV.A.- QUESOS ELABORADOS CON CUAJO ANIMAL Y COAGULANTE VEGETAL LIOFILIZADO.....	105
IV.A.1.- COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	105
IV.A.1.1.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LECHE Y CUAJADAS.....	105
IV.A.1.2.- EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS QUESOS A LO LARGO DE LA MADURACIÓN.....	107
IV.A.1.2.1.- Actividad de agua ( $a_w$ ).....	107
IV.A.1.2.2.- pH.....	111
IV.A.1.2.3.- Humedad.....	113
IV.A.1.2.4.- Grasa.....	116
IV.A.1.2.5.- Proteína.....	118
IV.A.1.2.6.- Cenizas.....	120

## Índice

IV.A.1.2.7.- Cloruros.....	122
IV.A.1.2.8.- Ácido Láctico.....	124
IV.A.1.3.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.....	126
IV.A.1.3.1.- Aplicación en relación al tiempo de maduración.....	127
IV.A.1.3.2.- Aplicación en relación al factor tipo de coagulante.....	129
IV.A.2.- COMPONENTES NITROGENADOS.....	131
IV.A.2.1.- EVOLUCIÓN DE LAS FRACCIONES NITROGENADAS ANALIZADAS.....	131
IV.A.2.1.1.- Nitrógeno soluble.....	131
IV.A.2.1.2.- Nitrógeno no proteico.....	136
IV.A.2.1.3.- Nitrógeno aminoacídico.....	139
IV.A.2.1.4.- Nitrógeno amoniacal.....	143
IV.A.2.1.5.- Grupos amino libre.....	145
IV.A.2.2.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.....	147
IV.A.2.2.1.- Aplicación en relación al tiempo de maduración.....	147
IV.A.2.2.2.- Aplicación en relación al factor tipo de coagulante.....	149
IV.A.2.3.- DISTRIBUCIÓN DE LAS FRACCIONES NITROGENADAS CALCULADAS.....	151
IV.A.3.- MICROBIOLOGÍA.....	157
IV.A.3.1.- RECUENTOS DE GRUPOS MICROBIANOS EN LECHE Y CUAJADAS.....	157
IV.A.3.1.1.- Aerobios mesófilos.....	157
IV.A.3.1.2.- Enterobacterias y coliformes.....	159
IV.A.3.1.3.- Estafilococos y micrococos.....	164
IV.A.3.1.4.- Bacterias ácido lácticas.....	167
IV.A.3.1.5.- Levaduras y mohos.....	169
IV.A.3.1.6.- Velocidad de muerte microbiana.....	173
IV.A.3.2.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.....	174
IV.A.3.2.1.- Aplicación en relación al tiempo de maduración.....	174
IV.A.3.2.2.- Aplicación en relación al factor tipo de coagulante.....	176
IV.A.4.- ELEMENTOS MINERALES.....	178
IV.A.4.1.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN MACROMINERALES.....	179
IV.A.4.1.1.- Calcio.....	179
IV.A.4.1.2.- Fósforo.....	181
IV.A.4.1.3.- Sodio.....	183

## Índice

IV.A.4.1.4.- Potasio .....	185
IV.A.4.1.5.- Magnesio .....	185
IV.A.4.2.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN MICROMINERALES .....	190
IV.A.4.2.1.- Manganeso .....	191
IV.A.4.2.2.- Hierro .....	191
I.V.A.4.2.3.- Cinc .....	193
IV.A.4.2.3.- Cobre .....	196
IV.A.4.3.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE .....	200
IV.A.4.3.1.- Aplicación en relación al tiempo de maduración .....	200
IV.A.4.3.2.- Aplicación en relación al factor tipo de coagulante .....	202
IV.A.5.- ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS .....	203
IV.A.5.1.- EVOLUCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS .....	204
IV.A.5.2.- RELACIONES ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS .....	214
IV.A.6.- ANÁLISIS SENSORIAL .....	218
IV.A.6.1.- EVOLUCIÓN DE LOS ATRIBUTOS SENSORIALES .....	218
IV.A.6.1.1.- Percepciones olfativas .....	218
IV.A.6.1.2.- Percepciones visuales .....	220
IV.A.6.1.3.- Percepciones hápticas .....	222
IV.A.6.1.4.- percepciones gustativas .....	225
IV.A.6.2.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE .....	233
IV.A.6.2.1.- Aplicación en relación al tiempo de maduración .....	233
IV.A.6.2.2.- Aplicación en relación al factor tipo de coagulante .....	235
IV.A.6.3.- RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS Y LOS ATRIBUTOS SENSORIALES .....	237
IV.A.7.- RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS .....	243
IV.A.7.1.- CORRELACIONES .....	243
IV.A.7.2.- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES .....	243
IV.A.7.3.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE .....	250
IV.A.7.3.1.-Aplicación en relación al tiempo de maduración .....	250
IV.A.7.3.2.- Aplicación en relación al tipo de coagulante .....	251

## Índice

IV.B.- QUESOS TIPO MANCHEGO ELABORADOS CON CUAJO ANIMAL Y CIPROSINA RECOMBINANTE.....	252
IV.B.1.- COMPOSICIÓN QUÍMICA, FRACCIONES NITROGENADAS Y RECuentOS MICROBIOLÓGICOS .....	253
IV.B.2.- ELEMENTOS MINERALES.....	259
IV.B.2.1.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN MACROMINERALES.....	259
IV.B.2.2.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN MICROMINERALES.....	267
IV.B.2.3.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.....	274
IV.B.2.3.1.- Aplicación en relación al tiempo de maduración.....	274
IV.B.2.3.2.- Aplicación en relación al factor tipo de coagulante.....	276
IV.B.3.- ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.....	278
IV.B.3.1.- EVOLUCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.....	278
IV.B.3.2.- RELACIONES ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.....	285
IV.B.4.- RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS .....	287
IV.B.4.1.- CORRELACIONES.....	287
IV.B.4.2.- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	287
IV.B.4.3.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.....	294
IV.B.4.3.1.-Aplicación en relación al tiempo de maduración.....	294
IV.B.4.3.2.- Aplicación en relación al tipo de coagulante.....	295
V.- CONCLUSIONES.....	297
VI.- RESUMEN.....	301
VII.- BIBLIOGRAFÍA.....	303

## I . - I NTRODUCCI ÓN



# **I.- INTRODUCCIÓN.**

## **I.1.- ASPECTOS HISTÓRICOS.**

Al parecer los orígenes de la fabricación de este derivado lácteo se remontan a la Prehistoria, hace más de 8.000 años, en la zona de Ur situada entre los ríos Tigris y Éufrates (actual Irak) según un estudio arqueológico realizado por Sir Leonar Wooley (Wooley y Hall, 1931). Sucede en esta época la llamada Revolución Agrícola, cuando determinados animales fueron domesticados para ser utilizados como fuente de alimento. Los pequeños rumiantes fueron los primeros animales domesticados, mientras que la dificultad de domesticación y de adaptación al clima reinante en esa zona del ganado vacuno hizo que su primera aptitud fuese de animal de trabajo.

La aparición del queso se asocia a una serie combinada de hechos fortuitos. Un grupo de bacterias lácticas cuyo hábitat natural son los vegetales, a partir de estos presumiblemente, colonizarían los pezones de las mamas de los animales contaminados con la lactosa de la leche producida. A consecuencia del crecimiento en la leche de este tipo de microorganismos se produciría una cantidad suficiente de ácido láctico para reducir el valor pH de la leche hasta llegar al punto isoeléctrico de las caseínas (pH = 4,6) causando la coagulación de las proteínas. Ese gel producido por la acidificación de la leche pudo romperse posteriormente en dos fases, suero y cuajada. El suero ácido pudo usarse como una bebida de consumo inmediato, mientras que la conservación de las cuajadas por salado, secado al aire o combinación de ambas pudo prolongar su duración. En este sentido, se considera al ácido láctico el primer agente coagulante de la leche.

Por otra parte, con la práctica de transportar y almacenar la leche en odres fabricados a partir de los estómagos de rumiantes, se descubre que algún agente presente en ellos causaba la coagulación de la leche de una manera más rápida. De este modo el coagulante exógeno (cuajo) fue introducido en la elaboración del queso por primera vez (Holsinger *et al.*, 1995).

La elaboración del queso acompañó a las civilizaciones en su extensión a través de Oriente Medio, Grecia y Roma, destacando la expansión del Imperio Romano, hecho relatado por Plinio (23-79 a.C.). En épocas anteriores hay pocos datos,



## Introducción

apareciendo en el antiguo testamento algunas referencias de la producción de queso en Job X. 10 (1.520 a.C.) y Samuel 1. XVII. 18 y 2. XVII. 29 (1.017 a.C.). Homero (1.184 a.C.) hace referencia al queso elaborado en las cuevas por el cíclope Polifemo a partir de leche de oveja. Posteriormente Herodoto (484-408 a.C.) se refiere al queso "Scynthian" fabricado con leche de yegua. Varro (116-127 a.C.) piensa que los distintos alimentos de los animales, la gran variedad de climas y las diversas prácticas de elaboración son las causas de variabilidad de este producto lácteo. La emigración de las colonizaciones fue fundamental para la introducción del queso en nuevas zonas geográficas. Columela (siglo 50 d.C.) en su tratado *De re Rustica* hace referencia a múltiples aspectos de la fabricación del queso (incluido la necesidad de la higiene en la producción de la leche y la elaboración del queso) y resalta la alta calidad de los quesos de la península, principalmente los del "Campo Espartario" (región de la Mancha).

La Edad Media supuso una época de "oscuridad" para la elaboración del queso, que fue mantenida principalmente por los monjes de los monasterios italianos, franceses y españoles. Muchas de las variedades que aún son populares hoy en día como Saint Paulin, Port du Salut y Trappist tuvieron su origen en los monasterios. En España, la "Nodicia de kesos" es el primer documento en castellano que se conoce, del Convento de San Justo y Pastor, en Rozuela (León), en el año 959.

La fabricación del queso sufre los cambios más importante durante los siglos XVII y XVIII, apareciendo las primeras queserías con grandes capacidades de producción y se incorporan los más modernos adelantos en maquinaria y técnicas de elaboración, fabricándose quesos muy uniformes en líneas automatizadas con escasa mano de obra. En el año 1899 se publicó el "Board of Agriculture", donde se recogían todos los aspectos relacionados con la fabricación de quesos. En 1851 se establece cerca de Nueva York la primera fabrica de queso en los Estados Unidos y en 1870 la primera en Gran Bretaña, extendiéndose paulatinamente al resto de Europa. Prácticamente la fabricación del queso hasta mediados del siglo XIX fue más un arte que una ciencia y es a partir de esta época cuando la elaboración de este derivado lácteo entra en la era científica y tecnológica.

Hoy en día el queso se produce fundamentalmente en fábricas automatizadas, en toda Europa y en países que antiguamente fueron poblados por emigrantes europeos como Canadá, Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda (Fox, 1993; Holsinger *et al.*, 1995).

Paralelamente al desarrollo industrial subsisten en la actualidad, con grandes dificultades, pequeñas queserías tradicionales que ofertan al consumidor unos productos menos uniformes en cuanto a aromas y sabores pero más naturales. Estos productos suelen tener un carácter localista, formando parte de su patrimonio cultural y conservando aún sus características primitivas.

## **I.2.- DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS QUESOS.**

La palabra “Queso” engloba a un grupo de productos basados en la fermentación de la leche, fabricados en todo el mundo y con una gran variedad de formas, texturas y aromas. La diversidad y volumen de los quesos producidos ha ido aumentando a lo largo de la historia llegando en la actualidad a unos 15 millones de toneladas anuales (aproximadamente el 35 % de la totalidad de la producción mundial de leche).

La vida útil del queso puede oscilar desde los 4–5 días hasta los 5-10 años dependiendo de la variedad y del tipo de almacenamiento. Fundamentalmente la gran diversidad de quesos existente se explica por dos circunstancias, la naturaleza de la leche y el propio proceso de elaboración. Respecto al primero, factores como la especie productora, alimentación, momento de lactación, estado fisiológico del animal y el medioambiente pueden influir sobre la leche, siendo una de las principales causas de variación en las características finales de los quesos la especie animal de la cual procede la leche.

El sistema de elaboración del queso, industrial o artesanal, condiciona del igual modo el tipo de maduración y la clase de microorganismos que intervienen sobre la cuajada. Aunque todos los quesos siguen tecnologías de fabricación similares, pequeñas modificaciones en estas dan lugar a un alto número de variedades (Varnam y Sutherland, 1995). Dentro de estas variedades existen descritos más de 900 nombres, que probablemente se puedan agrupar en 18 tipos naturales (Robinson, 1979). De ahí la gran dificultad de ofrecer una definición de queso que recoja las características de todas las variedades existentes.

Básicamente la elaboración del queso consiste en un proceso de deshidratación donde la caseína y la grasa de la leche se concentran entre 6 y 12 veces,

## Introducción

dependiendo de la variedad. En la producción de la inmensa mayoría de las variedades de queso se pueden distinguir, en el proceso de fabricación, dos fases a partir de la recepción y tratamiento de la leche de origen: elaboración (que a su vez se divide en acidificación, coagulación, sinéresis y desuerado, prensado, moldeado y salado) y la maduración. Aunque existen variedades de queso que se consumen frescas sin ningún período de maduración la mayoría de los quesos sufren una serie de complejas reacciones bioquímicas durante esta fase de maduración que, si suceden correctamente, van a dar lugar a un producto de olor, sabor y textura agradables. La humedad, contenido en sal, microbiota del queso y valor pH van a regular estos fenómenos bioquímicos que tienen lugar durante la maduración, influyendo por tanto en las características microbiológicas, químicas y sensoriales de los quesos madurados. El crecimiento de bacterias indeseables se va a prevenir debido a la acción conjunta de la acidificación, la deshidratación y el salado de la cuajada, junto a la producción de sustancias de actividad inhibitoria por parte de las bacterias que forman parte del cultivo iniciador y las condiciones anaeróbicas que se dan en la cuajada durante la etapa de maduración, permitiendo que el queso se mantenga en condiciones higiénicas adecuadas.

Los quesos frescos pueden definirse como aquellos que no han sufrido ningún tipo de transformación ni fermentación salvo la láctica, presentando, por tanto, un alto contenido en agua y un sabor muy suave. Por otra parte, los quesos madurados además de la fermentación láctica sufren algún otro tipo de fermentación enzimática en su masa debido, sobre todo, a un período de maduración mayor y son quesos cuya pasta ha sido sometida a un prensado para conseguir un mayor desuerado.

El contenido graso y la humedad son los componentes que más varían de un tipo de queso a otro y por este motivo son empleados, entre otros, como criterios de clasificación. Además existen otros datos analíticos como el porcentaje de sal y extracto seco y parámetros tales como el peso, tamaño, forma, color y aspecto externo que definen las características de cada queso. Como consecuencia, existen diversos tipos de clasificación de los quesos entre los que puede destacarse:

- Según la especie animal de procedencia de la leche: vaca, oveja, cabra y mezcla. En algunos países se emplea la leche de búfala, camella y llama.
- Según su textura: quesos con ojos o agujeros redondeados, quesos de textura granular, quesos de textura cerrada.
- Dependiendo del tipo de coagulación: ácida, enzimática o mixta.

## Introducción

- En función del contenido de humedad (Varnam y Sutherland, 1995): blando (48-80 %), semiblando (45-55 %), semiduro (42-52 %) y duro (26-50 %).
- De acuerdo con su contenido en grasa láctea en porcentaje sobre el extracto seco lácteo: extra-graso (mínimo 60 %), graso (mínimo 45 % y menos de 60 %), semi-graso (mínimo 25 % y menos del 45 %), semi-desnatado (mínimo del 10 % y menos del 25 %) y desnatado (menos del 10 %) (Anónimo, 1991).
- Según el sistema de elaboración: quesos industriales (con una adecuada infraestructura tecnológica y estricto control de calidad) y quesos artesanos. En ambos casos pueden estar elaborados con leche pasteurizada (más común en los industriales) y con leche cruda, que conserva la flora microbiana natural de la leche de partida.

La clasificación de los quesos elaborados con leche de más de una especie animal, denominados quesos de mezcla (de pasta no cocida, prensada y de consistencia semidura), esta regulada por la Orden de 9 de Julio de 1987 del Ministerio de relaciones con las Cortes y de la Secretaria del Gobierno por la que se aprueban las normas de composición y características específicas para los quesos Hispánico (oveja y vaca), Ibérico (vaca, cabra y oveja) y de la Mesta (oveja, vaca y cabra) destinados al mercado interior (Anónimo, 1987).

### **I.3.- COMPOSICIÓN QUÍMICA Y FÍSICO-QUÍMICA DEL QUESO.**

Aparte de una mayor durabilidad que la leche de origen, el queso contiene algunos ácidos grasos esenciales como el araquidónico, linoléico y linolénico, cantidades apreciables de sales y minerales además de todos los aminoácidos y vitaminas esenciales, excepto el ácido ascórbico. Durante el desuerado se pierde prácticamente toda la lactosa y el resto es metabolizada, lo cual permite que este derivado lácteo pueda ser consumido por personas que no toleren este azúcar. Todo esto confiere al queso altas propiedades nutritivas.

En la industria quesera la leche que se va a emplear como materia prima debe reunir una serie de requisitos para su fabricación en cuanto a sus propiedades organolépticas (olor, color y sabor normales) y físico-químicas, siendo conveniente un alto contenido proteico, que asegure un óptimo rendimiento quesero, y una relación

## Introducción

equilibrada de minerales, aspecto importante para la fase de coagulación (es frecuente la adición de sales cálcicas,  $Cl_2Ca$ , a la leche durante la elaboración del queso para garantizar la fabricación), mientras que el contenido graso puede ser variable. Además la leche de quesería debe presentar una alta calidad higiénica y microbiológica, estando exenta de antibióticos, antisépticos u otras sustancias inhibidoras que puedan condicionar el desarrollo de etapas posteriores como la fase de coagulación.

Posterior al ordeño y antes de su utilización la leche de quesería se suele almacenar a temperaturas de refrigeración, 4 °C, y en los casos en los que el tiempo de almacenamiento vaya a ser prolongado, se realiza la termización de la misma (pretratamiento térmico que supone la aplicación de temperaturas de 63-65 °C durante varios segundos) para minimizar el crecimiento de bacterias psicrótrofas indeseables. Además la leche es sometida a un proceso de eliminación de gases y clarificación para retirar impurezas y, en algunos casos, a un tratamiento térmico de pasteurización (p.e. 72 °C/15 segundos). En algunas variedades de quesos incluso se estandariza hasta un cierto valor de la relación caseína/grasa de la leche justo antes de su utilización. Tras el enfriado de la leche de partida se le inoculan los cultivos iniciadores lácticos y se le adicionan otros posibles aditivos, como colorantes, lisozimas (para evitar el crecimiento de *Clostridium* sp.) y lipasas.

La composición química de la leche va a influir notablemente sobre la calidad del queso fabricado a partir de ella. En el Cuadro 1 se presenta la composición comparativa global, expresada en porcentaje, de la leche de vaca, cabra y oveja. (Mataix, *et al.*, 1995; Walstra *et al.*, 2001).

**Cuadro 1.-** Composición global en porcentaje de la leche de vaca, cabra y oveja.

TIPO DE LECHE			
COMPONENTE	VACA	CABRA	OVEJA
Grasa	3,90	4,40	6,50
Proteína	3,20	3,70	5,30
Lactosa	4,60	4,50	4,30
Cenizas	0,70	0,80	1,00
Sólidos Totales	12,70	13,30	18,80

## Introducción

Como se puede observar la leche de cabra posee una composición química muy similar a la leche de vaca mientras que la leche de oveja presenta mayor riqueza en componentes constituyentes del queso (grasa, proteína y sólidos totales), que son en definitiva los que contribuyen al rendimiento quesero. La leche de oveja es de un color blanco nacarado y más opaca que la leche de vaca y de cabra. Además posee un olor característico y una mayor viscosidad. Las características de su materia grasa son las responsables de los sabores típicos y más intensos que presentan la mayoría de quesos elaborados con leche de oveja. Además, las cuajadas producidas a partir de ella son de consistencia más dura.

El 85 % de la leche que se comercializa en todo el mundo procede de ganado bovino, encontrando numerosas aplicaciones en la elaboración de derivados lácteos como el yogur o la mantequilla. Sin embargo las cabras y las ovejas son especialmente importantes en la fabricación de quesos. Países como Alemania, Holanda y Suiza utilizan generalmente la leche de vaca como materia prima en la elaboración de quesos, mientras que Grecia, Italia y España destacan por la producción de quesos a partir de leche de oveja. Muchos quesos populares son producidos a partir de la leche de oveja (Roquefort, Feta, Manchego). De hecho la mayor parte de la leche de oveja producida a escala mundial es transformada en queso, generalmente de manera artesanal en forma de variedades tradicionales, lo que constituye una importante actividad económica en muchos países mediterráneos (Kalantzopoulos, 1993; Freitas *et al.*, 2000). En el Cuadro 2 se muestra una clasificación de los quesos elaborados a partir de leche de oveja.

**Cuadro 2.-** Clasificación de los quesos elaborados a partir de leche de oveja (adaptado de Kalantzopoulos, 1993 y Alichanidis y Polichroniadou, 1995).

---

*Quesos frescos:* Especie de yogur desuerado elaborado mediante adición de una pequeña cantidad de cuajo

*Quesos blandos* (salados): Diferentes tipos de queso Feta, Teleme, Bulgaro blanco salado

*Quesos azules:* Roquefort

*Quesos semiduros:* Se elaboran tres categorías:

1) Pecorino, Kelalotyri, Ossau-Iraty Pyreneés

2) Pasta filata, como: Kaskaval y Kasserli

3) Manchego, Caciotta, Roncal, Idiazábal

*Quesos duros:* Graviera, Halloumi, Idiazábal, Roncal, Manchego

*Quesos Séricos:* Ricotta, Myzithra, Brocciu, Requesón

*Quesos tipo Torta:* Torta del Casar y La Serena

---

### I.3.1.- HIDRATOS DE CARBONO.

El principal carbohidrato de la leche, tanto cualitativa como cuantitativamente, es la lactosa, un disacárido constituido por la unión glucosídica de una molécula de  $\beta$ -galactosa y un resto de glucosa  $\alpha$  ó  $\beta$ . El nombre sistemático es O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-4)- $\alpha$ -D-glucopiranososa ( $\alpha$ -lactosa) ó O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-glucopiranososa ( $\beta$ -lactosa).

Su concentración en la leche oscila entre el 4,2 y 5 %, siendo su contenido más bajo en la leche de animales con mamitis y al final del período de lactación. Además, la presencia de lactosa en la leche de vaca es similar en la leche de cabra y mayor que en la leche de oveja. El hecho de que la leche de oveja sea algo más pobre en lactosa no plantea ningún problema tecnológico puesto que se presenta en cantidad suficiente como para permitir las fermentaciones lácticas (Assenat, 1991). De hecho, la presencia de mayor cantidad de lactosa en la cuajada o queso fresco de la que pueden degradar las bacterias lácticas hacen que esta pueda ser utilizada por otras bacterias indeseables con el consiguiente riesgo de producción de gas y quesos defectuosos. No obstante en el suero se encuentran, aunque en menor proporción, otros azúcares: monosacáridos (fundamentalmente glucosa y galactosa), oligosacáridos neutros que contienen glucosa y lactosa (pueden encontrarse libres o combinados), ácidos siálicos (son oligosacáridos ácidos que contienen ácido neuramínico bajo formas acetiladas) y fosfatos de azúcares (pentosa fosfato, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato y n-glucósidos).

El 98 % de la lactosa se pierde con el suero durante el proceso de fabricación del queso. La industria alimentaria aprovecha este azúcar como ingrediente para la elaboración de diversos productos: alimentos infantiles, productos cárnicos y de panadería, y en la alimentación animal (Yang y Silva, 1995; Adam *et al.*, 1999). El tiempo de permanencia de la lactosa restante es variable. Así, en quesos como el Emmental, muy desuerados, la lactosa residual desaparece completamente a las 4 ó 5 horas; en el queso Cheddar, es fermentada en su totalidad a las 24 horas y en otros quesos como el Camembert, Serra de Estrella y diversos tipos de quesos de cabra españoles puede encontrarse lactosa hasta el día 15 ó 20 de maduración (Choisy *et al.*, 1990; Carballo *et al.*, 1994; Macedo y Malcata, 1997a).

### **I.3.1.1.- Acidificación**

Sin duda el fenómeno más importante del metabolismo de los hidratos de carbono durante la maduración del queso, desde el punto de vista tecnológico, es la acidificación o glucólisis, es decir, la transformación de la lactosa en ácido láctico mediante la acción de las bacterias lácticas presentes en la leche cruda o añadidas como cultivo iniciador. La inoculación de un cultivo iniciador o estárter se ha convertido en una práctica universal como consecuencia de que la producción de ácido láctico por los microorganismos presentes en la leche de partida es impredecible y como esta flora microbiana es muy heterogénea, con frecuencia se produce el desarrollo de una microbiota indeseable que da lugar a la producción incontrolada de gas y a la aparición de sabores anormales e indeseables en el queso elaborado. Otra práctica muy habitual en la elaboración de quesos es la adición de cultivos iniciadores para controlar el proceso de maduración y asegurar la calidad higiénico-sanitaria del queso producido. Los cultivos iniciadores suelen estar formados por microorganismos mesófilos (temperatura óptima de crecimiento, en la práctica, por debajo de 35 °C), comúnmente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y subsp. *cremoris* y termófilos (temperatura de crecimiento por encima de los 35 °C) como *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y otras especies de lactobacilos. Los cultivos mesófilos de cepas definidas normalmente contienen una mezcla de 2 a 6 cepas seleccionadas y se preparan empleando técnicas de cultivo que minimizan la aparición de fagos.

El metabolismo de la lactosa se puede llevar a cabo por dos vías: homofermentación y heterofermentación, dependiendo del tipo de bacterias lácticas presentes, obteniéndose, en consecuencia, diferente concentración de los productos finales resultantes de la fermentación. Así, bacterias homofermentativas como especies del género *Streptococcus* (*Str. mutans*, *Str. thermophilus*), *Enterococcus* (*E. faecalis*), *Lactococcus* (*Lc. lactis* subsp. *lactis*), *Pediococcus*. (*P. pentosaceus*, *P. halophilus*) y especies homofermentativas del género *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*) degradan la lactosa por vía glucolítica, donde el producto resultante es lactato en una proporción aproximada de 90-95 % (4 moles de ácido láctido/mol de lactosa). Por otra parte las principales bacterias lácticas heterofermentativas pertenecen a los géneros *Leuconostoc* (p.e. *L. mesenteriodes*) y algunos lactobacilos (p.e. *Lb. brevis*), producen ácido láctico (menos de 1,8 moles de ácido láctico /mol de lactosa) y otros compuestos como etanol, acetato y CO<sub>2</sub>.



## Introducción

Desde el principio estas bacterias lácticas desempeñan una importante función en la elaboración del queso. El aumento de la acidez, consecuencia de la actividad de estos microorganismos, provoca que las micelas de caseína se desmineralicen, pierdan su estructura y a valor pH de 4,6 (punto isoeléctrico de las caseínas) se agrupen (precipitan, se hacen insolubles) formando una red de disposición laminar. El retículo formado encierra en sus mallas la totalidad de la fase acuosa. Los enlaces intermoleculares que forma el retículo tienen naturaleza hidrofóbica y electrostática, por lo que este coágulo formado es frágil, friable, poroso, poco contráctil y no tiene rigidez. Es la denominada coagulación ácida.

El pH de la cuajada formada va a descender al final del proceso de elaboración hasta valores comprendidos entre 4,6-5,1, siendo el intervalo de tiempo requerido para alcanzar el pH final dependiente de la variedad de queso. Las diferencias en la cantidad de cultivo iniciador añadido a la leche (0,2-5% v/v), el tiempo de cocción durante la fabricación, el estado de la cuajada durante la fabricación, el nivel al cual ésta se sala y el grado de enfriamiento de la cuajada son el origen de esta variación (Lawrence *et al.*, 1987; Fox, 1993).

El índice y la extensión del ácido producido tienen un papel importante en varios aspectos de la elaboración y maduración del queso: el grado de retención del cuajo en la cuajada, la actividad del cuajo durante la fabricación, la consistencia y grado de sinéresis o retracción de la cuajada, el grado de solubilización del fosfato cálcico en la cuajada (lo cual afecta a la susceptibilidad de las caseínas a la proteólisis y a las propiedades reológicas del queso) y la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, bacterias productoras de gas y bacterias acidolácticas no pertenecientes al cultivo iniciador. La naturaleza del ácido va a influir en el efecto bactericida de la acidez ya que los ácidos inorgánicos, los cuales se disocian completamente en soluciones acuosas, muestran una menor letalidad sobre las bacterias que los ácidos orgánicos (ácido láctico, acético o propiónico) (Barefoot y Nettles, 1993), además de inhibir acciones enzimáticas alterantes (Lindgren y Dobrogosz, 1990).

Aparte de lo citado anteriormente la importancia de la glucólisis radica en su contribución a las características sensoriales de muchas variedades de quesos ya que durante la fermentación láctica se producen otros compuestos como ácido acético, diacetilo, acetaldehído y etanol que contribuyen al aroma y sabor del producto final (Ordóñez, 1987; Fox *et al.*, 1990; Requena y Peláez, 1993; Walstra *et al.*, 2001). Por otra parte, además de la acción microbiana sobre la lactosa, el ácido acético también

puede originarse a partir de ácido cítrico por la acción de *Leuconostoc* sp. o a partir de aminoácidos por la acción de lactobacilos (Fox *et al.*, 1990). Por este motivo la lactosa se correlaciona con el ácido láctico y no con el contenido de ácido acético (Macedo y Malcata, 1997a).

### I.3.2.- LÍPIDOS.

Uno de los principales constituyentes del queso es la grasa, componente de alto valor nutritivo al aportar grandes cantidades de energía, ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos y vitaminas liposolubles.

La materia grasa de la leche se encuentra en forma de glóbulos grasos esféricos de diámetro variable (4,55  $\mu\text{m}$  en vaca, 3,5  $\mu\text{m}$  en cabra y 3,30  $\mu\text{m}$  en oveja) constituidos fundamentalmente por triglicéridos (97-98 %) de bajo punto de fusión (líquidos a temperatura ambiente) y el resto son di- y monoacilgliceroles, ésteres de colesterol y colesterol libre, ácidos grasos libres y fosfolípidos. Rodeándolos aparece una membrana lipoproteica, cargada negativamente, que estabiliza la emulsión al impedir que los glóbulos grasos se agrupen y además los protege de oxidaciones y de enzimas lipolíticas. En la composición de la membrana de estos glóbulos grasos se encuentran proteínas, fosfolípidos, colesterol, riboflavina, ácido ribonucleico y enzimas como la fosfatasa alcalina y la xantino-oxidasa. Los triglicéridos presentan una composición individual altamente compleja, considerándose que puede haber unos 1.300 triglicéridos diferentes, lo que dificulta enormemente su determinación. A pesar de ello se han conseguido identificar basándose en el número de átomos de carbono y número total de dobles enlaces que lo componen (Peña *et al.*, 1997; Nájera *et al.*, 1998b, 1999b).

Las leches de oveja y cabra son pobres o carecen de  $\beta$ -caroteno (Laxminarayana y Dastur, 1968), pigmento amarillo presente en la leche de vaca. Por este motivo la pasta de los quesos de cabra y oveja presentan un color más blanco que los quesos elaborados a partir de leche de vaca (Kosikowski y Mistry, 1997a).

Durante la etapa de maduración, la fracción lipídica sufre profundas transformaciones, influyendo en las características físicas, reológicas y organolépticas que van a determinar el tipo de queso elaborado.

## Introducción

En las características reológicas y estructurales del queso, además de la grasa, van a influir, aunque en menor medida, el agua, las proteínas y el cloruro sódico. El contenido proteico y el intervalo de fusión de la grasa determinan la firmeza del queso (Prentice, 1987). Debido a que en los primeros estadios de maduración la elasticidad del queso depende de la interacción existente entre la membrana superficial del glóbulo graso y la matriz proteica, la grasa va a reducir la tensión y firmeza de la cuajada. Hassan y Frank (1997), Catalano *et al.* (1985) y Stampanoni y Noble (1991) han verificado que la fracción lipídica favorece la adhesividad, mejorando la homogeneidad de la pasta y confiriendo al queso un aspecto cremoso.

### **I.3.2.1.- Lipólisis.**

Generalmente la fracción lipídica del queso es degradada vía enzimática (lipólisis) ya que la oxidación (degradación vía química) está muy limitada debido al bajo potencial redox que presenta el queso y a la presencia de antioxidantes naturales.

Las lipasas hidrolizan la grasa con liberación de ácidos grasos, glicéridos parciales o, en último término, glicerol. La actividad de estas lipasas se ve influida notablemente por múltiples factores como la calidad de la leche de partida, la agitación y la homogeneización de la misma, el tiempo y la temperatura de maduración, el valor pH del queso, la microflora presente, la adición o no de cultivo iniciador, la pasteurización, el tiempo de salado y el tipo y cantidad de coagulante utilizado (Walstra *et al.*, 2001).

Las lipasas y esterases presentes en los quesos tienen múltiples orígenes: la leche, los microorganismos del cultivo iniciador, la microflora natural de la leche y otras añadidas.

Respecto a la leche de partida, tanto las lipasas naturales (Olivecrona y Bengtsson-Olivecrona, 1991) como las esterases (Deeth y Fitzgerald, 1976) están bien caracterizadas. La lipasa natural de la leche (lipoproteína lipasa o LPL) se encuentra asociada a las micelas de caseína (por tanto pasa a la cuajada) y contribuye de manera importante a la lipólisis en quesos elaborados con leche cruda. La LPL de la leche de bovinos presenta una acción poco específica liberando ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-3 de los mono, di- y triglicéridos y de la posición sn-1 de los glicerofosfolípidos (Olivecrona *et al.*, 1992). Los ácidos grasos de la leche

## Introducción

bovina se encuentran esterificados principalmente en la posición sn-3 (Parodi, 1979) y por tanto incluso con una baja actividad de la LPL, ésta puede ejercer un efecto importante sobre el sabor y aroma del queso. La esterasa pregástrica (EPG) desempeña una acción lipolítica importante, responsable del sabor picante característico de algunas variedades de quesos duros italianos como el Provolone y Romano (Fox y Stepaniak, 1993). Estas esterases ejercen su acción sobre ácidos grasos de cadena corta, como el butírico, que se encuentran esterificados en la posición sn-3. Las esterases pregástricas de cabrito, cordero y ternera permiten la elaboración de quesos con diferentes perfiles de sabor y aroma, ya que aunque poseen características similares presentan diferencias en su especificidad.

Otra fuente importante de lipasas pueden ser las bacterias psicotrofas, si superan recuentos de  $10^7$  ufc/ml (Coussins *et al.*, 1977). Las lipasas se adsorben en la superficie del glóbulo graso y se concentran en la cuajada durante la elaboración del queso (Fox, 1989a), pudiendo causar enranciamiento tras un prolongado período de maduración (Sorhaug y Stepaniak, 1977).

Los mohos son los microorganismos de mayor actividad lipolítica gracias a sus enzimas endo y exocelulares, mientras que, en general, las bacterias lácticas no son muy lipolíticas (Fernández-Salguero *et al.*, 1986b). Las lipasas producidas por el género *Penicillium* son las principales responsables de la lipólisis en quesos madurados por mohos, siendo la lipasa ácida la de mayor importancia en la maduración del queso. Las lipasas de la flora láctica, de carácter endocelular, actúan fundamentalmente sobre mono y diglicéridos y menos sobre triglicéridos liberando ácidos grasos de cadena corta. Sousa y Malcata (1997a) y Partidario (1999) en queso Serra de Estrella han observado que la adición de cultivos iniciadores, bien por el mayor desarrollo de microorganismos no lipolíticos o bien por la inactivación de las lipasas por el elevado descenso del pH debido al crecimiento microbiano, provoca una disminución de la actividad lipolítica durante la maduración del queso.

Prácticamente casi todos los microorganismos relacionados con la elaboración del queso muestran alguna actividad lipolítica-esteárica. Se han estudiado las lipasas-esterasas de cepas de *Lactococcus* sp. (Fox *et al.*, 1995; Holland y Coolbear, 1996; Chick *et al.*, 1997; Fox y Wallace, 1997), esterases de algunos lactobacilos homofermentativos utilizados como iniciadores (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) (El Soda *et al.*, 1986a,b; Khalid y Marth, 1990), y las lipasas y esterases de *Micrococcus* sp. y *Pediococcus* sp., géneros

## Introducción

presentes en la flora contaminante de muchas variedades de quesos (Bhowmilk y Marth, 1990). Además se han purificado y caracterizado varias lipasas microbianas y animales. Así se ha aislado una lipasa intracelular de *Lactobacillus plantarum* 2739 consiguiendo un perfil de ácidos grasos semejante al de la lipasa pancreática de cerdo, con algunas diferencias en la especificidad de acción (Gobbetti *et al.*, 1996). Las lipasas de cabra y cabrito se han empleado como catalizador para la hidrólisis de triglicéridos monoácidos, mostrando una mayor actividad en el C<sub>4:0</sub>. Al hidrolizarse la grasa láctea anhidra, se obtuvo un perfil de ácidos grasos libres semejante al obtenido en queso Parmesano, sin que se detectaran diferencias entre las lipasas utilizadas (Lai *et al.*, 1997).

Se han identificado las principales especies microbianas responsables de la hidrólisis de la grasa en diversas variedades de quesos como Serra de Estrella (Macedo y Malcata, 1997c), Picante (Freitas *et al.*, 1999), Torta del Casar (Suárez *et al.*, 1984), Cheddar (Olson *et al.*, 1997) y de Los Pedroches (Sánchez, 1999).

En el queso madurado los ácidos grasos libres (AGL) principalmente se forman por lipólisis de la grasa de partida y también por la acción de las bacterias ácido lácticas sobre los carbohidratos y las proteínas, aunque esta segunda opción no está completamente verificada y depende en gran medida del tipo de cultivo iniciador añadido (Dulley y Grieve, 1974; Mentasti *et al.*, 1997). En este sentido, se ha demostrado que los ácidos acético, propiónico o butírico pueden provenir de fermentaciones y los ácidos isobutírico y 2,2- metilbutírico de la degradación de los aminoácidos valina, leucina o isoleucina (De la Fuente y Juárez 1993).

A pesar de que generalmente se ha considerado que las características reológicas de los quesos madurados no se afectan significativamente por la hidrólisis de los triglicéridos, Schwartz *et al.* (1963) y Bills *et al.* (1969) han señalado la capacidad emulsionante de los mono y diglicéridos producidos durante la lipólisis y una posible interacción entre los AGL y proteínas y/o péptidos que puede afectar a la textura de la pasta del queso.

Independientemente de la leche de origen (vaca, cabra o oveja) se reconocen hasta 15 ácidos grasos principales en el queso, que se presentan en porcentajes superiores al 1 % (Renner, 1983). Entre ellos aparecen ácidos saturados con un número par de átomos de carbono y longitud de cadena corta, media y larga (desde el butírico al esteárico), con un número impar de átomos de carbono y longitud de cadena larga (pentadecanoico y heptadecanoico) y ácidos grasos insaturados con un

## Introducción

número par de átomos de carbono, longitud de cadena media y larga y con una, dos o tres insaturaciones (miristoleico, palmitoleico, oleico, linoleico y linoléico). Palmítico y oleico son los ácidos grasos mayoritarios en el queso, con unos contenidos individuales que oscilan entre el 21 y 28 %, siendo el contenido de palmítico ligeramente superior al de oleico, aunque en algunos tipos de quesos la diferencia llega a ser del 15 % (Vema y Anand, 1987; Gómez *et al.*, 1987). El contenido de ácido mirístico y esteárico se encuentra comprendido entre el 8 y 11 %, siendo en general superiores los contenidos de mirístico. (Vema y Anand, 1987). El resto de ácidos grasos se presenta en porcentajes inferiores al 5 % en los quesos elaborados a partir de leche de vaca, de cabra y de oveja.

A pesar de la composición cualitativa de ácidos grasos similar en las tres especies rumiantes (vaca, cabra y oveja), se observan diferencias cuantitativas. En la leche de vaca hay una mayor proporción de  $C_{18}$  y  $C_{18:1}$  frente a la grasa láctea de leche de oveja, que contiene una menor cantidad de ácidos grasos insaturados que en la leche de vaca (10-12 %) y una elevada proporción de ácidos grasos de cadena corta y media (20-25 %) ( $C_4 - C_{12}$ ) como butírico, caproico, caprílico, cáprico y laúrico que contribuyen en la formación del aroma de manera directa, o de forma indirecta como precursores de otras sustancias responsables del flavor tales como alcoholes, lactonas, ésteres y metilcetonas. En la leche ovina, los ácidos grasos cáprico ( $C_{10}$ ) y caprílico ( $C_{12}$ ) suponen del 6-15 % de los ácidos grasos totales frente al 3-5 % en leche de vaca. Consecuentemente estas variaciones se reflejan en la composición química de la grasa del queso, que presenta un contenido superior de ácido cáprico en los quesos de cabra y oveja que en los quesos elaborados a partir de leche de vaca.

Las relaciones existentes entre el contenido total de determinados ácidos grasos de la fracción grasa de la leche se ha considerado de gran utilidad para la identificación de la especie animal de procedencia y la detección de posibles adulteraciones. En este sentido, la principal adulteración es la adición de leche de vaca y/o cabra a la leche de oveja para la elaboración de quesos de calidad cuya reglamentación sólo permite la utilización de leche de oveja pura. Varios autores (Ramos *et al.*, 1977; Martínez-Castro *et al.*, 1979; García-Olmedo y Coll Hellín, 1976; García-Olmedo *et al.*, 1979; Fernández-Salguero *et al.*, 1986b,c; Iverson y Sheppard, 1989) han propuesto diversas relaciones entre ácidos grasos para poder detectar este tipo de adulteraciones. Esta utilización de la relación entre ácidos grasos para

## Introducción

detectar fraudes, ha sido mejorada por las técnicas electroforéticas y sobre todo por los métodos inmunogenéticos que son capaces de detectar concentraciones muy bajas de leche de vaca y de cabra en leche de oveja y leche de vaca en leche y queso de oveja (Aranda *et al.*, 1988, 1993). Según el Real Decreto 1.533/1991 el método oficial de detección de la leche de vaca en oveja se basa en la mayor movilidad electroforética de las  $\beta$ -lactoglobulinas de la leche de vaca. Además en el mercado existen kits comerciales de detección basados en métodos inmunológicos (ELISA e inmunodifusión radial).

Como se ha comentado con anterioridad la grasa láctea es una fuente clave de los componentes responsables del flavor del queso o de sus precursores. De hecho, diversos autores (Ohren y Tuckey, 1967; Foda *et al.*, 1974; Wijesundera *et al.*, 1998) han comprobado que los quesos elaborados con leche desnatada o leche donde la grasa se ha sustituido por otros componentes, no desarrollan su sabor apropiado. Este efecto de la fracción lipídica sobre el aroma característico de los quesos es específico de cada variedad de queso. En algunos está determinado por la producción de ácidos grasos libres mientras que en otros la intensidad aromática depende de la función que ejerce la grasa como disolvente de compuestos aromáticos (Patton, 1963; Steffen *et al.*, 1987; Jameson, 1990; Olson y Johnson, 1990). Foda *et al.* (1974) han visto que particularmente los componentes lipídicos de la membrana de los glóbulos grasos, fundamentalmente fosfolípidos, pueden influir sobre el desarrollo del aroma en este derivado lácteo. Así, un bajo contenido en fosfolípidos de la membrana de los glóbulos grasos pueden favorecer una lipólisis excesiva de los triglicéridos contenidos en ellos, con la consiguiente aparición, en períodos prolongados de maduración, de rancidez (Law *et al.*, 1972).

En el queso Parmesano, el balance correcto de los productos de la proteólisis y la presencia en pequeñas cantidades de AGL junto a otras reacciones enzimáticas contribuye al flavor de esta variedad (Fox *et al.*, 1995). La importancia de los ácidos grasos libres radica, como se ha mencionado con anterioridad, en su contribución al aroma de los quesos, bien porque son precursores de compuestos volátiles aromáticos de los quesos maduros como metilcetonas, alcanos, lactonas y ésteres alifáticos y aromáticos o bien porque “per se” intervengan en el aroma como los AGL de cadena corta lineal (acético, propiónico, butírico y caproico) y ramificada (isobutírico, isocaproico) (Cuer, 1982; Rafecas *et al.*, 1985; Lacasa, 1986; Ordóñez, 1987; Farkye y Fox, 1990; Urbach, 1991; Hoo y Lindsay, 1991).

## Introducción

En queso Mahón, Escriche *et al.* (1999) han identificado varios ácidos grasos, etil esterres, metilcetonas y un alcohol como responsables del aroma de esta variedad de queso de vaca, y Mulet *et al.* (1999) han estudiado su evolución a lo largo de la maduración.

Numerosos autores han estudiado la composición en ácidos grasos de diversas variedades de quesos, entre otras, de Los Pedroches (Tejada *et al.*, 2003a), Tetilla, Mahón, Idiazábal, Torta del Casar, Manchego (Poveda *et al.*, 1999b; Poveda *et al.*, 2000) y quesos madurados por hongos como Cabrales, azul de oveja, Camembert y Brie (Fernández-Salguero *et al.*, 1986b).

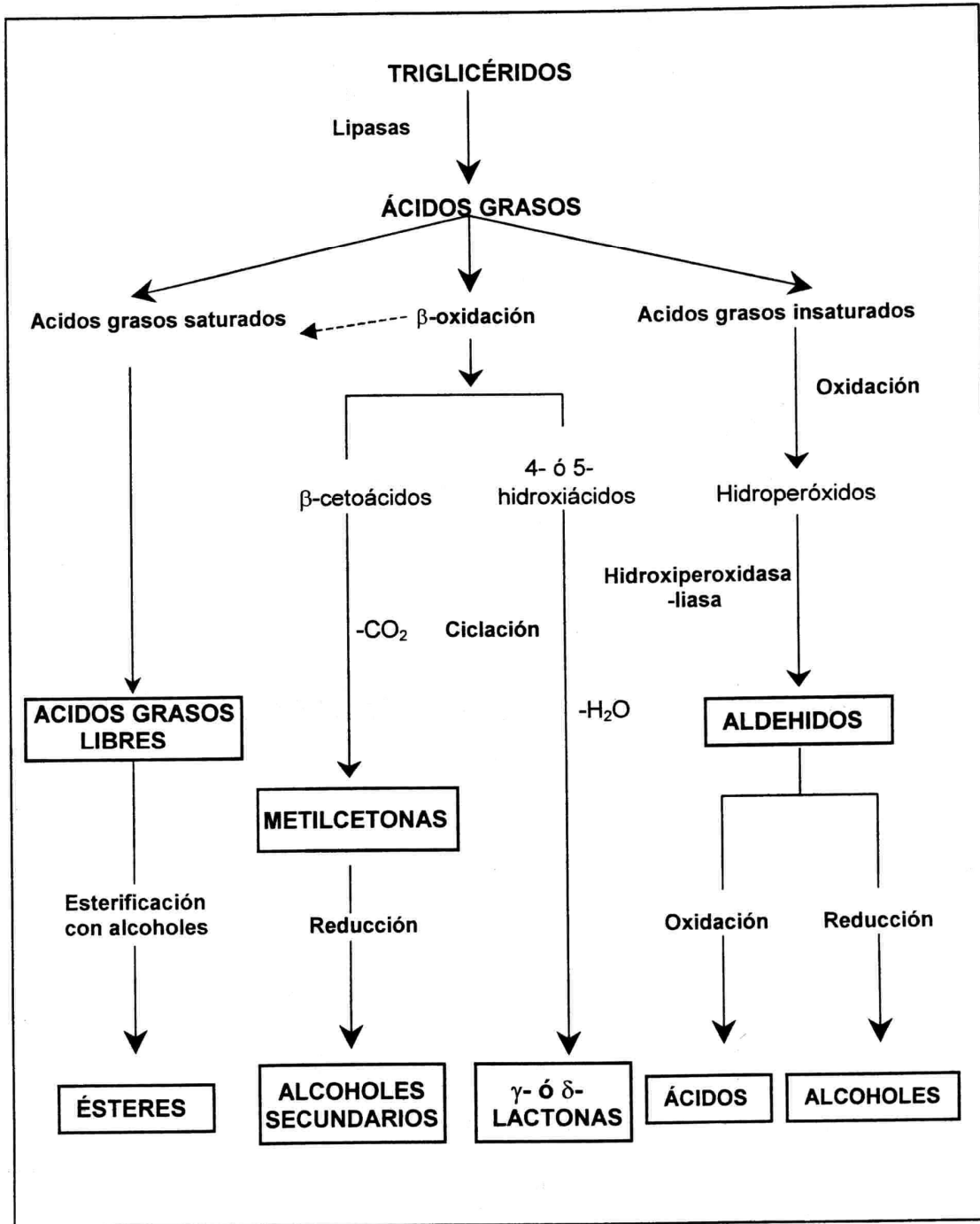
Los AGL pueden ser degradados por diferentes vías metabólicas dando lugar a diversos compuestos (Cuadro 3), dependiendo en gran medida de la variedad de queso. Así los AGL pueden degradarse vía oxidativa rindiendo  $C_{(n-1)}$ , metilcetonas y los correspondientes alcoholes secundarios de  $C_n$  ácidos grasos, incluyendo desde el  $C_{6:0}$  hasta el  $C_{12:0}$ , compuestos responsables de aroma característico de quesos Camembert y los quesos azules (Gripon *et al.*, 1991). En el caso de los quesos madurados por mohos, los AGL pueden oxidarse a  $\beta$ -cetoácidos que por acción fúngica pasan a metilcetonas a partir de los cetoácidos presentes de forma natural en la leche a bajas concentraciones o por oxidación de ácidos grasos monoinsaturados (Kinsella y Hwang, 1977). Según Adda *et al.* (1982), si no se desarrollan mohos durante la maduración, las metilcetonas provienen de los cetoácidos presentes en la leche. Las metilcetonas pueden reducirse a alcoholes secundarios de tipo de 2-pentanol y 2-heptanol, que contribuyen al sabor de este tipo de quesos.

Los esterres pueden formarse a partir de ácidos grasos de cadena corta o media, de alcoholes alifáticos (etanol), aromáticos (alcohol feniletílico), de tioles (metenotiol) o de reacciones puramente químicas, y contribuyen también al sabor y aroma del queso

Las lactonas son otros compuestos aromáticos que pueden contribuir al sabor global del queso (Fox, 1993). Se forman con la esterificación intramolecular de hidroxíácidos, con pérdida de agua. Fox *et al.* (2000) han observado la correlación entre el tiempo de maduración y la intensidad de sabor en el queso Cheddar y algunas lactonas  $\gamma$ - $C_{12}$ ,  $\gamma$ - $C_{14}$ ,  $\gamma$ - $C_{16}$ ,  $\delta$ - $C_{10}$ ,  $\delta$ - $C_{12}$ ,  $\delta$ - $C_{14}$ ,  $\delta$ - $C_{15}$  y  $\delta$ - $C_{16}$ .



Cuadro 3.- Rutas generales del catabolismo de los ácidos grasos en queso.



### 1.3.3.- COMPUESTOS NITROGENADOS.

El contenido proteico de la leche se ve afectado por varios factores, como la especie productora, raza, manejo, alimentación y fase de lactación. Así, la concentración de proteínas en la leche de vaca es similar a la de cabra y ambas inferiores que en la leche de oveja. A medida que avanza la lactación aumenta el contenido proteico de la leche de oveja, pasando de un 4,5 % inicial hasta un 7 % final.

En la fracción proteica de la leche encontramos dos grupos principales de compuestos nitrogenados: las caseínas y las proteínas séricas, siendo más abundantes las primeras, llegando a constituir el 80 % de las proteínas totales. Las caseínas se caracterizan porque precipitan a pH 4,6 y gracias a su carácter anfifílico y a su fosforilación presentan forma micelar, formando agregados e interacciones entre ellas y con otros componentes como el fosfato calcico coloidal. Las caseínas se pueden dividir en 4 tipos:  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  sintetizadas en la glándula mamaria (Walstra *et al.*, 2001). La caseína  $\gamma$  se origina tras una proteólisis de la caseína  $\beta$ . El 92 % de la micela de caseína está constituido por  $\alpha_{S1}:\alpha_{S2}:(\beta+\gamma):\kappa$  en una relación 4:1:4:1,6; el resto son compuestos inorgánicos, fundamentalmente fosfato calcico coloidal (Varnam y Sutherland, 1995).

Existen numerosos modelos propuestos para explicar la estructura de la micela de caseína. El más aceptado es el que afirma que la micela está constituida por un conjunto de submicelas, a su vez constituidas por agregados de moléculas de caseína. En la superficie de la micela se localiza la caseína  $\kappa$ , uniéndose al centro de la caseína su zona hidrófoba y proyectando al exterior el macropéptido hidrofílico hacia la fase acuosa formando una capa de filamentos, responsables de la estabilización estérica de la proteína (Walstra *et al.*, 2001, Holt, 1992). Se han realizado estudios sobre la estructura de las submicelas (Kumosinski, 1996) y su posible modificación durante la maduración, ya que se piensa que puede influir de forma considerable en la textura del queso (Tunick *et al.*, 1997).

En el Cuadro 4 se muestra la distribución de las caseínas en la leche de las tres especies animales más importantes (Assenat, 1985, 1991). La leche de vaca presenta mayor porcentaje de  $\alpha_{S1} + \alpha_{S2}$ , 45,5 % frente al 30,2 % en la leche de oveja y 12,6 % en la leche de cabra.

**Cuadro 4.-** Caseínas de la leche de oveja, cabra y vaca (% de la caseína total).

FRACCION	OVEJA	CABRA	VACA
$\alpha_{S1}$ -caseína	15,5	---	36,0
$\alpha_{S2}$ -caseína	14,7	12,6	9,5
$\beta_1$ -caseína	18,9	35,9	33,0
$\beta_2$ -caseína	28,2	39,4	---
$\kappa$ -caseína	7,3	8,1	9,4
$\gamma$ -caseína	15,4	3,9	6,8

Prácticamente la mitad de la caseína total en la leche de oveja (47,1 %) es caseína  $\beta$ , mientras que en la leche de cabra constituye las dos terceras partes (75,3 %) y un tercio para la leche de vaca (33,0 %). Las tres especies rumiantes presentan un contenido similar de caseína  $\kappa$  y el porcentaje de caseína  $\gamma$  es mayor en la leche de oveja, menor en la de vaca y aún más inferior en la leche de cabra.

Las consecuencias de estas diferencias cuantitativas de los diferentes tipos de caseínas son un aspecto diferente de las micelas según la especie (Richardson, 1974) y el hecho de que se ha relacionado el bajo contenido en caseínas del grupo  $\alpha_s$  de la leche de oveja y cabra con la casi ausencia de sabores amargos en los quesos elaborados con leche de pequeños rumiantes.

Las caseínas de la leche presentan un gran polimorfismo genético, pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos. Además las caseínas lácteas se diferencian según la especie animal de procedencia. Mediante el análisis cromatográfico del queso podemos determinar el porcentaje de leche de vaca, cabra y oveja empleado en su fabricación (Mayer, 1997) y así detectar posibles fraudes.

La leche de oveja presenta seis fracciones de caseína  $\alpha$ , tres de ellas se denominan  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  y  $\alpha_{S3}$ . La  $\alpha_{S1}$  contiene 199 residuos de aminoácidos, se han aislado 5 variantes genéticas (A, B, C, D y E) (Chianese *et al.*, 1996) y su secuencia fue establecida por Mercier *et al.* (1971) y Grosclaude *et al.* (1973). La  $\alpha_{S2}$ -caseína esta constituida por una cadena polipeptídica de 207 residuos de aminoácidos presentando 2 Cys y 10, 11, 12 y 13 grupos fosfatos dando nombre a las  $\alpha_{S2}$ -CN-10P,  $\alpha_{S2}$ -CN-11P,  $\alpha_{S2}$ -CN-12P y  $\alpha_{S2}$ -CN-13P (Fox, 1989a). La caseína  $\alpha_{S2}$  presenta una estructura dipolar muy marcada con las cargas negativas concentradas cerca del N-terminal y las positivas en las inmediaciones del C-terminal. Chianese *et al.* (1996) han detectado cuatro variantes genéticas de la caseína  $\alpha_{S2}$  (A, B, C y D). En la leche de oveja Merina se han identificado siete fenotipos de  $\alpha_{S1}$ -caseína (CC, BB, CB, AB,

## Introducción

AC, BD y CD), mientras que en la  $\alpha_{S2}$ -caseína se han observado tres fenotipos (F, S e I) y otros tres en la  $\beta$ -caseína (K, L y M) (Serrano *et al.*, 1999). En la leche de cabra se han descrito 13 alelos en el locus  $\alpha_{S1}$ -caseína distribuidos en siete variables genéticas (Martín *et al.*, 1999), verificándose que el porcentaje de grasa de la leche y el diámetro y contenido en calcio de las micelas se ve afectado por el genotipo en este locus. Delacroix-Buchet *et al.* (1996) y Lamberet *et al.* (1996) detectaron diferencias en el rendimiento quesero y en las características sensoriales de quesos elaborados a partir de leche de cabra con las variantes AA y FF de la  $\alpha_{S1}$ -caseína. Lodes *et al.* (1996a) han observado una alta relación entre el diámetro de las micelas de caseína y los genotipos de los locus  $\alpha_{S1}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína.

En la leche de oveja y cabra se encuentran dos variantes genéticas de la caseína  $\beta$  y siete en la leche de vaca. Las  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -caseínas ovinas son muy similares a las de leche de cabra y se diferencian de las de leche de vaca en la estructura primaria. La caseína  $\beta_2$  presenta un grupo fosfato menos (cinco) y es más sensible a la acción de los iones calcio. Se ha secuenciado completamente la caseína  $\kappa$  de la leche de vaca, oveja y cabra, apareciendo diferencias en el número de aminoácidos que la componen. De este modo entre la leche de vaca y cabra existen 8 aminoácidos diferentes, entre la leche de oveja y cabra 10 y entre la leche de vaca y oveja 4 (Mercier *et al.*, 1973). La caseína  $\kappa$  ovina no presenta variabilidad genética alguna (López-Gálvez *et al.*, 1994) mientras que Eigel *et al.* (1984) han identificado dos tipos de variantes genéticas (A y B) en la  $\kappa$ -caseína bovina.

Las caseínas  $\gamma$  se corresponden con la escisión de porciones C-terminales de la secuencia de las caseínas  $\beta$  realizada por la enzima plasmina en las posiciones 28/29 ( $\gamma_1$ ), 105/106 ( $\gamma_2$ ) y 107/108 ( $\gamma_3$ ). Al precipitar la caseína por la acción de un ácido los fragmentos de menor tamaño resultantes de la escisión aparecen en el suero y forman parte de lo que comúnmente se denomina fracción proteosa-peptona del suero, que es soluble a pH 4,6 y está compuesta por los polipéptidos  $\gamma_1$ -caseína (29-209),  $\gamma_2$ -caseína (106-209) y  $\gamma_3$ -caseína (108-209) (Andrews y Alichanidis, 1983). Fox (1989a) recomienda que estos productos sean clasificados como caseínas ya que son productos de degradación de las mismas. Goursaud (1991) incluye estas proteosas-peptonas en la fracción de proteínas solubles porque junto con otras como la  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina e inmunoglobulinas permanecen solubles, tanto en la coagulación enzimática como en la coagulación ácida de la leche.

## Introducción

Las diferencias en el sistema de caseínas de las distintas especies animales van a influir en el tiempo de coagulación y la firmeza del coágulo. La leche de oveja coagula 1,56 veces más rápido que la leche de vaca y la firmeza del coágulo formado es dos veces mayor (Amigo, 1989). Los diferentes genotipos de las caseínas  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  también afectan al tiempo de coagulación de la leche (Lodes *et al.*, 1996b; Walsh *et al.*, 1995, 1998a,b, 1999).

Un aspecto importante de las caseínas es su papel como fuente de péptidos con actividad biológica. Se ha podido demostrar que los fragmentos obtenidos a partir de las caseínas tienen efectos biológicos: opiáceos e inhiben la motilidad estomacal e intestinal porque interaccionan con receptores del intestino y estimulan procesos de secreción (insulina, somatoestatina). El primer péptido con actividad opiácea que se obtuvo y caracterizó estructuralmente fue el heptapéptido Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile, que comprende la secuencia f60-66 de la caseína  $\beta$ . Este heptapéptido pertenece a un grupo de péptidos que están contenidos en la estructura primaria de la caseína  $\beta$  y que tienen actividad opiácea denominados  $\beta$ -caseomorfinas. Además de las caseomorfinas se ha conseguido recientemente descubrir fragmentos de caseína que tienen propiedades antihipertensivas, antitrombóticas, antimicrobianas, inmunomoduladoras y que son capaces de unir minerales (Schlimme y Buchheim, 2004).

Una de las fases más importantes en la elaboración de quesos es la etapa de coagulación, donde se produce la precipitación de la caseína de la leche cuyas micelas en estado coloidal se agrupan para transformarse en un gel denominado cuajada, con el consiguiente cambio de estado de la misma y la agrupación de la grasa en el gel formado. Existen dos tipos de coagulación: ácida (apartado I.3.1.1) y enzimática. En la fabricación de la mayoría de las variedades de quesos lo que sucede en realidad es una coagulación mixta, con predominio más o menos acusado de uno de estos dos modos de coagulación, lo que determinará las características de la cuajada obtenida.

El proceso de la coagulación enzimática de la leche supone la adición de enzimas proteolíticas (cuajo) que precipitan las caseínas y engloba dos pasos. En el primero (denominado enzimático) el cuajo hidroliza la caseína  $\kappa$  en el enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>. dando lugar a un fragmento C-terminal de 64 restos denominado caseinomacropéptido o glicomacropéptido (contiene todos los grupos carbohidrato y fosfato), residuos 1-109 que contiene dos restos de cisteína y un fragmento N-

## Introducción

terminal, la para- $\kappa$ -caseína. El C-terminal hidrofóbico del caseinomacropéptido ( $\kappa$ -caseína f106-109) se separa de la  $\kappa$ -caseína, difunde al medio acuoso y se pierde en el suero. En el segundo paso (no enzimático) se produce la desestabilización de la hidrófoba p- $\kappa$ -caseína restante ( $\kappa$ -caseína f1-105), causando la agregación de las micelas y la coagulación de la leche en presencia de una concentración crítica de  $\text{Ca}^{2+}$ , a temperaturas superiores a 20 °C (Dalglish, 1993; Fox, 1993). Las  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y para- $\kappa$ -caseína permanecen en la cuajada mientras que el caseinomacropéptido aparece en el suero en su totalidad.

La refrigeración prolongada y la pasteurización provocan un aumento del contenido de calcio soluble de la leche a expensas del calcio coloidal, lo cual conlleva una desmineralización de la cuajada. Por este motivo durante la elaboración del queso se suele añadir junto al cuajo cloruro cálcico a la leche para mantener el equilibrio entre el calcio soluble en la fase acuosa de la leche con el calcio coloidal ligado a las micelas de caseínas. El nivel de glicosilación parece no influir en la estabilidad de la caseína  $\kappa$  en la estructura micelar (Doi *et al.*, 1979). No obstante, el aumento del contenido de carbohidratos disminuye la sensibilidad de la caseína  $\kappa$  a la acción hidrolítica de la enzima quimosina.

Las proteínas séricas representan alrededor del 20 % del total de las proteínas de origen lácteo aunque la leche de la especie ovina contiene mayor cantidad de proteínas del suero que la leche de vaca, con una distribución similar en ambos tipos de leche.

Dentro de las proteínas del suero lácteo, encontramos dos tipos de proteínas nativas,  $\alpha$ -lactoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina, además de la fracción proteasa-peptona no asociada a la paracaseína, pequeñas cantidades de proteínas sanguíneas, albúmina sérica e inmunoglobulinas, aglutininas, lisozima y lactoferrina (Walstra *et al.*, 2001). Al valor pH de la leche parte de las proteasas peptonas se asocian a la paracaseína, pero durante la coagulación, cuando el valor pH desciende hasta el punto isoeléctrico de las caseínas, se pierden con el suero. Por otro lado las 3/4 partes de las proteasas peptonas coagulan junto a la paracaseína aumentando el rendimiento quesero (Vanboekel y Crijns, 1994). La  $\beta$ -lactoglobulina ovina contiene 5 residuos de aminoácidos menos que la bovina estando constituido el monómero de la cadena polipéptica por 157 residuos de aminoácidos. Esta proteína sérica puede agregarse con la caseína  $\kappa$  aumentando el tiempo de cuajado y dando lugar a una cuajada más blanda y que tarda más tiempo en desuerar.

## Introducción

López-Gálvez *et al.* (1994, 1995) y Grosclaude (1995) han detectado diferentes variantes genéticas de las proteínas del lactosuero. En la leche de ovejas de la raza Merina se han observado cinco fenotipos diferentes de la  $\beta$ -lactoglobulina y tres en la raza Lacha sin que se hubiese demostrado ninguna relación entre el polimorfismo genético y las características de coagulación de la leche (Recio *et al.*, 1997).

En la fabricación quesera durante la etapa de desuerado se van a perder la mayoría de las proteínas del suero junto a minerales, lactosa, fracciones nitrogenadas no proteica y grasa. El objetivo de esta fase del proceso de elaboración del queso es retirar parte del agua (lactosuero) del gel formado. Para ello se corta el coágulo en porciones denominadas “granos de cuajada” cuyo tamaño depende del tipo de queso a elaborar. El desuerado puede ser natural, también denominado espontáneo (caracterizado por ser muy lento), o de tipo mecánico que comienza con el corte del gel mediante liras, palos, etc. y va a continuar con las operaciones de agitación y elevación de la temperatura, pre-prensado en la cuba, moldeado, prensado de la cuajada, salado y oreo del queso. En el coágulo enzimático todas estas operaciones favorecen que se sigan produciendo las uniones entre las moléculas de paracaseína por lo que los granos de cuajada se contraen y los espacios que ocupa el lactosuero se hacen más pequeños y el suero tiende a salir de ellos (sinéresis). Por el contrario en el gel ácido existe una gran dispersión de los agregados de moléculas de caseína desmineralizada, lo cual supone una contractibilidad pequeña que no admite el trabajo mecánico, pero por otra parte confiere características porosas al gel por lo que el desuerado se producirá espontáneamente, por acción de la gravedad originando siempre una cuajada muy húmeda. El grado y velocidad de sinéresis depende de diversos factores, entre ellos, la composición de la leche (concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y caseína), la temperatura de calentamiento (el calentamiento facilita la disminución del grado de hidratación de la cuajada), el valor pH del suero (la acidificación favorece la permeabilidad de la cuajada por disolución de su armazón), el grado de agitación de la mezcla cuajada-suero y el tiempo de duración de esta etapa.

El alto valor nutricional, terapéutico, funcional y fisiológico de las proteínas del suero explican el desarrollo de numerosos métodos para su recuperación (Hollar *et al.*, 1995; Parris *et al.*, 1997; Bramaud *et al.*, 1997a,b; Caessens *et al.*, 1997) y para aumentar la retención de esta fracción en la cuajada (Lo y Bastian, 1979; Dybing y Smith, 1998, Benfeldt *et al.*, 1998).

## Introducción

Alrededor de un 10-12 % de las proteínas del suero lo constituyen las inmunoglobulinas, proteínas no específicas de la secreción láctea debido a que se son sintetizadas, en su mayor parte, por los linfocitos B y posteriormente transportadas vía sanguínea a todos los tejidos. Existen cuatro, denominadas IgG1, IgG2, IgA e IgM, siendo la gammaglobulina G1 la más abundante (Walstra *et al.*, 2001).

### **I.3.3.1.- Proteolisis.**

La proteolisis es el fenómeno más complejo y más importante desde el punto de vista bioquímico, siendo objeto de numerosas revisiones ((Rank *et al.*, 1985; Grappin *et al.*, 1985; Fox, 1989b; Fox y Law, 1991; Fox *et al.*, 1995; Fox y McSweeney, 1996).

Este fenómeno bioquímico, que comienza durante la coagulación y se completa durante la fase de maduración, afecta tanto a la textura (por acción del cuajo residual y de la plasmina se produce una solubilización de la caseína haciendo la masa del queso más blanda y untuosa) como al flavor del queso (las enzimas del coagulante, del cultivo iniciador y de la microflora degradan las proteínas a péptidos y aminoácidos libres que participan directamente en el aroma y sabor o sirven de precursores para el desarrollo del flavor).

En la mayoría de las variedades de quesos la para  $\kappa$ -caseína se degrada al principio de la elaboración, aunque en los quesos de pasta dura y semidura la degradación más rápida es la de la caseína  $\alpha$  (Alais, 1986) y en los quesos madurados con mohos la de la caseína  $\beta$ . Cuesta *et al.* (1996) y González de Llano y Santa María (1997a) han observado que el contenido en proteínas séricas del queso no se modifica sensiblemente durante la etapa de maduración.

Una de las técnicas tradicionales para el seguimiento de la maduración es el grado de proteolisis. La mayoría de los compuestos nitrogenados aparecidos al comienzo de la maduración proceden de la caseína modificada. Esta sufre una hidrólisis enzimática por la acción del coagulante rindiendo compuestos solubles de peso molecular decreciente: proteosas y peptonas, que son hidrolizadas por el coagulante y las enzimas del cultivo iniciador y de la microbiota no estándar a péptidos, aminoácidos y sus productos de degradación, ácidos, aminas, amoniaco, compuestos que van a contribuir al desarrollo del sabor y flavor. La determinación de diversos componentes nitrogenados que se forman durante el curso de la maduración como el



## Introducción

nitrógeno soluble (NS), nitrógeno no proteico (NNP), nitrógeno Aminoacídico (NAA), nitrógeno Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) y grupos amino libre (N-NH<sub>2</sub>) se utilizan como índices químicos del avance y extensión de la proteólisis y por tanto de la maduración en casi todas las variedades de quesos existentes.

El fenómeno bioquímico de la proteólisis presenta una intensidad variable dependiendo de la variedad de queso considerada, pudiendo ser desde muy limitada como el queso Mozzarella hasta muy extensa como en los quesos azules (Fernández-Salguero *et al.*, 1989, Choisy *et al.*, 1990; Fernández-Salguero, 2004) y rinden unos productos que van desde polipéptidos de alto peso molecular, de tamaño parecido a las caseínas intactas, hasta aminoácidos libres, pasando por un rango variable de péptidos de tamaño medio y pequeño (Fox *et al.*, 1995).

Resulta complicado abordar el estudio de la proteólisis debido a la complejidad de los múltiples factores que influyen, las diferente procedencia de las enzimas que intervienen así como el efecto de los procesos de elaboración empleados en la fabricación del queso. Se reconocen las siguientes fuentes de enzimas:

- Las enzimas coagulantes, en la medida en la que quedan incluidas en el queso durante la elaboración y permanecen activas.
- Las enzimas endógenas de la leche, especialmente la proteasa alcalina, la catepsina D, la lipoproteín lipasa (se inactiva durante la pasteurización) y otras proteinasas de células somáticas, de mayor importancia en quesos elaborados a partir de leche cruda.
- Enzimas de microorganismos del cultivo iniciador.
- La flora superficial (mohos blancos, bacterias halotolerantes) y la flora del interior de la pasta (como los mohos azules de algunas variedades de quesos, *Penicillium roqueforti*, *P. camemberti*).
- Las bacterias que no forman parte del cultivo iniciador, que proceden de la leche cruda o que han sobrevivido a la pasteurización o que recontaminan la leche o que colonizan la corteza del queso.
- Proteinasas y lipasas extracelulares sintetizadas por las bacterias psicrotrofas que han crecido en la leche cruda (las bacterias se destruyen en la pasteurización, pero la mayoría de sus enzimas son muy termorresistentes).
- Proteinasas exógenas añadidas con la finalidad de acelerar la maduración o acentuar el sabor del queso.

## Introducción

La mayoría de los quesos elaborados requieren de un largo período de maduración para alcanzar las características típicas de flavor y textura que demanda el consumidor. Esto supone una inversión importante en locales y equipamiento de maduración a cargo del industrial, además de gastos elevados en energía y personal. Por lo tanto, la reducción del tiempo de maduración presenta un gran interés económico (Wilkinson, 1993).

El objetivo básico de las técnicas de maduración acelerada es conseguir rápidamente la formación del flavor, es decir, una proteólisis y lipólisis más intensa, manteniendo una buena textura. Para ello se emplean diversos métodos:

- Aumento de la temperatura de maduración, cuyo principal efecto es el incremento de la actividad proteolítica y lipolítica de los microorganismos presentes en el queso. Este hecho ha sido comprobado en queso Picante (Freitas y Malcata, 1998b) y en queso Manchego (Núñez *et al.*, 1986a; Gaya *et al.*, 1990).
- Incrementar la cantidad de enzimas, bien por aumento de la cantidad de coagulante empleado o por adición de preparaciones enzimáticas, proteinasas y lipasas obtenidas a partir de mohos y bacterias. Esta última opción tiene el inconveniente de que es muy difícil mantener el equilibrio entre las numerosas enzimas que participan, y evitar sobremaduraciones y la aparición de sabores amargos o texturas muy blandas. Respecto a las formas de incorporar las enzimas a la leche, pueden encerrarse o adsorberse en liposomas o glóbulos grasos, lo que permite controlar la producción de compuestos aromáticos (Picón *et al.*, 1994, 1995, 1996, 1997). Fernández-Salguero *et al.* (2004a) han comprobado que al duplicar la cantidad de coagulante vegetal en la elaboración de quesos de oveja se produce un aumento de la proteólisis, consiguiéndose en un período de tiempo menor las características típicas del queso madurado y sin la aparición de sabores amargos.
- Aumento del número de bacterias lácticas con poder proteolítico, incrementando así la capacidad enzimática de la flora del cultivo iniciador. Se pueden utilizar cepas seleccionadas sin capacidad de acidificación o adicionar mayor cantidad de bacterias lácticas a las que se les ha aplicado un tratamiento térmico para mermar su capacidad de producción de ácido manteniendo su poder proteolítico.

## Introducción

- Aumento de la velocidad de lisis de las bacterias del cultivo, dejando accesibles sus peptidasas intracelulares. Para ello algunas cepas portan un profago que por calentamiento se convierte en fago activo, produciendo gran destrucción celular.
- Adición de otras bacterias, empleo de cultivos iniciadores termófilos para reducir el tiempo de maduración en determinadas variedades de quesos.

Respecto a la primera fuente de enzimas proteolíticas, básicamente los coagulantes empleados en la fabricación de queso consisten en preparaciones de proteinasas, seleccionadas por su elevada capacidad proteolítica. Aunque la mayor parte del coagulante añadido a la leche se pierde junto al suero, un porcentaje en torno al 6 %, dependiendo del tipo de coagulante, temperatura de obtención de la cuajada y valor pH durante el desuerado, queda retenido en la cuajada (Larsson *et al.*, 1997; Fox, 1989b). En quesos de pasta cocida como el Emmental la quimosina (proteínasa mayoritaria del cuajo animal tradicional) se desnaturaliza prácticamente en su totalidad y apenas contribuye a la maduración. Este coagulante residual desarrolla su actividad proteolítica al principio de la maduración, cuando el valor pH está entre 4,5-6,5 (Creamer *et al.*, 1985; Visser, 1993). La acción del coagulante sobre las caseínas varía en función de diferentes factores. En este sentido, las  $\alpha_{S1}$ -caseína y la caseína  $\beta$  de leche de cabra son más sensible a la acción del cuajo animal que la de vaca (Ramos y Martínez-Castro, 1976; Ramos *et al.*, 1981; Trujillo *et al.*, 1997a). La para- $\kappa$ -caseína y la  $\alpha_{S2}$ -caseína son bastantes resistentes a la acción del cuajo animal. La hidrólisis de la  $\beta$ -caseína por la quimosina disminuye a temperaturas elevadas y altas concentraciones de sal, debido a que las asociaciones hidrofóbicas con el sustrato limitan la accesibilidad de la enzima sobre la caseína. Sin embargo la  $\alpha_{S1}$ -caseína al ser menos sensible a la acción de la sal se hidroliza de forma más rápida (Exterkate *et al.*, 1997). Algunos autores han descrito la acción específica sobre las caseínas de la quimosina (McSweeney *et al.*, 1993, 1994; Fox *et al.*, 1994; Exterkate *et al.*, 1995) y del principal componente enzimático del coagulante vegetal, la cipsosina (Sousa y Malcata, 1998a, 2002; Sousa *et al.*, 2001). Algunos de los péptidos procedentes de la degradación de la caseína  $\beta$  son los responsables del sabor amargo desarrollado en algunos quesos durante la maduración.

En referencia a las enzimas endógenas de la leche, la proteasa alcalina, idéntica a la plasmina de la sangre, forma un complejo constituido por la enzima activa o plasmina, su forma inactiva (plasminógeno) y agentes activadores e

## Introducción

inhibidores de la plasmina y del plasminógeno, todos ellos presentes en la leche pero en localizaciones distintas. Así, la plasmina, el plasminógeno y los activadores de la plasmina se encuentran asociados a las micelas de caseína y los inhibidores de la plasmina en la fase sérica de la leche (Bastian y Brown, 1996). La enzima plasmina es un proteasa alcalina o proteinasa tripsín-serina con un valor pH y una temperatura óptima de 7,5 y 37 °C, respectivamente, aunque algunos autores han detectado actividad a pH 5,4-5,7 (Richardson y Elston, 1984; Grufferty y Fox, 1988; Lane y Fox, 1999). Esta enzima junto a las enzimas del coagulante va a ser la responsable de la degradación inicial de las caseínas a péptidos de tamaño grande e intermedio. La especificidad de esta enzima se localiza sobre los enlaces péptidicos en el extremo C-terminal de residuos lisil y en menor grado arginil (Weinstein y Doolittle, 1972) sobre todo de las caseínas  $\alpha_{S2}$  y  $\beta$ , rindiendo a partir de esta última caseínas  $\gamma$  (fragmentos C-terminales) y proteosomas-peptonas (fragmentos N-terminales) (Walstra *et al.*, 2001). Farkye y Fox (1991) han comprobado que el ácido 6-aminohexanoico actúa como inhibidor de la plasmina y Bastian *et al.* (1997) han observado que la uroquinasa incrementa la proteólisis de la caseína  $\beta$ , habiéndose empleado para acelerar la maduración del queso Cheddar (Barrett *et al.*, 1999).

Respecto a las otras enzimas endógenas de la leche, la proteinasa ácida de la leche catepsina D presenta una afinidad semejante a la quimosina (Larsen *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1997), un peso molecular de 36.000 daltons, un valor pH óptimo de 4, se inactiva a 70 °C/10 minutos y fundamentalmente actúa sobre la caseína  $\alpha_{S1}$  (Kaminogawa, 1980) transformándola en el derivado  $\alpha_{S1}$ -I, con un papel importante en la maduración de quesos elaborados con leche cruda. En este sentido, Visser y Groot-Mostert (1977) le atribuyen la formación del péptido  $\alpha_{S1}$ -cn f24-199 en quesos elaborados sin el empleo de coagulante. Otras proteasas ácidas de la leche son la lactasa, la cual se ha verificado que puede degradar las caseínas  $\alpha_{S1}$  y  $\beta$ , después de 6 horas de incubación, rindiendo un amplio rango de péptidos (Considine *et al.*, 1998).

Otras enzimas con importancia desde el punto de vista tecnológico son las fosfatasa. Existen dos tipos, la fosfatasa alcalina (pH = 9-10) y la fosfatasa ácida (pH = 4). La primera se encuentra en la membrana del glóbulo graso, se destruye con la pasteurización, tiene un pH óptimo de 9,6 y actúa hidrolizando el fosfato orgánico en alcohol o fenol. La fosfatasa ácida es termoresistente, presenta un pH óptimo de 4,74 y realiza un efecto desfosforilador de la caseína.

## Introducción

Otras enzimas son las oxidoreductasas, como la superóxido dismutasa, la sulfhidril oxidasa, la lactoperoxidasa, empleada como método para la detección de leches mamíticas y calostrales y la xantino-oxidasa, que reduce los nitratos a nitritos, los cuales inhiben la germinación de esporas de bacterias butíricas alterantes.

Los agentes microbianos proteolíticos más importantes son *Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp. y otros géneros utilizados como cultivo iniciador, y presentan un sistema proteinasa/peptidasa ampliamente estudiado y revisado (Fox y McSweeney, 1996; Kungi *et al.*, 1996, Beresford *et al.*, 2001). Este grupo de enzimas pueden ser aportadas por las bacterias ácido lácticas presentes de forma natural en la leche cruda, bacterias añadidas en el cultivo iniciador y por otros microorganismos no incluidos en el cultivo iniciador. La importancia de este grupo de enzimas se acentúa en los quesos artesanos ya que al ser elaborados a partir de leche cruda mantienen intacto todo su potencial enzimático. Las enzimas de estos microorganismos se encuentran unidas en la pared celular (enzimas extracelulares), en la membrana y en menor grado localizadas en el citoplasma (enzimas endógenas) (Thomas y Pritchard, 1987; Peterson y Marshall, 1990). Las principales responsables de la producción de pequeños péptidos y aminoácidos libres son las proteasas y peptidasas de las bacterias lácticas iniciadoras, no participando notablemente en la formación de grandes péptidos (Fox, 1989b; Lane y Fox, 1997). Las proteinasas extracelulares de las bacterias lácticas degradan caseínas a péptidos distinguiéndose las tipo PI, que actúa principalmente sobre la caseína  $\beta$  y las proteinasas tipo PIII cuya acción proteolítica afecta a las  $\alpha_{S1}$ -caseínas,  $\kappa$  y  $\beta$ -caseína. Según Kaminogawa *et al.* (1986) y Fernández de Palencia *et al.* (1997b) el primer sustrato de las proteinasas y peptidasas de los lactococos y lactobacilos es el fragmento 1-23 de la  $\alpha_{S1}$ -caseína.

Los principales estudios sobre estas enzimas microbianas se han llevado a cabo en la bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Bockelman *et al.*, 1989; Laan y Konings, 1989; Oberg *et al.*, 1990; Exterkate *et al.*, 2001) aunque se han realizado estudios en otros microorganismos como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. plantarum* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Hegazy y Abo-Enalga, 1987a,b; El Soda *et al.*, 1986c; Ezzat *et al.*, 1987). La hidrólisis de péptidos dando lugar a compuestos esenciales para el crecimiento de las bacterias es catalizada por las peptidasas (Tan *et al.*, 1993). Se han detectado dos endopeptidasas que degradan el fragmento 1-23 de la  $\alpha_{S1}$ -caseína, la denominada LEP-I asociada a la pared celular que actúa a nivel de los enlaces Glu<sub>18</sub>-Asn<sub>19</sub> y la LEP-II (es intracelular y

## Introducción

consecuentemente necesita la lisis celular previa) que interviene en Gln<sub>9</sub>-Gly<sub>10</sub>, Gln<sub>13</sub>-Glu<sub>14</sub> y Leu<sub>20</sub>-Leu<sub>21</sub> (Yan *et al.*, 1987a,b; Tan *et al.*, 1991). Se distinguen dos tipos de exopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Las carboxipeptidasas tradicionalmente se pensaba que no eran producidas por los microorganismos del estárter (Visser, 1993), sin embargo se han detectado en muchos de ellos como el *Lactobacillus casei* (El Soda *et al.*, 1978; Abo-Enalga y Plapp, 1987), propionibacterias (Langsrud *et al.*, 1995), varias especies de lactobacilos (Gómez *et al.*, 1996) y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Vafopoulou-Mastrojiannaki, 1999). A partir de microorganismos iniciadores se han aislado y purificado una gran variedad de aminopeptidasas (Tan y Konings, 1990; Fernández de Palencia *et al.*, 1997a; Fernández-Esplá *et al.*, 1997, Shao *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1998). El papel de estas peptidasas en la proteólisis es muy importante puesto que presentan especificidad sobre los enlaces peptídicos que contienen prolina que son muy resistentes a otro tipo de proteinasas y peptidasas, y la caseína es muy rica en prolina. En este sentido, se han aislado y purificado iminopeptidasas, X-prolil dipeptidil aminopeptidasas, oligopeptidasas y endopeptidasas de algunas propionibacterias del cultivo iniciador del queso Cheddar (Fernández-Esplá y Fox, 1998) y Emmental (Kosikowski y Mistry, 1997a), enzimas que mejoran el flavor del queso (Tobiassen *et al.*, 1996; Fernández-Esplá y Fox, 1998; Stepaniak *et al.*, 1998).

Lemieux y Simard, (1991) asocian la presencia de lactococos con la aparición de péptidos amargos en el queso. Para solucionar este problema se adicionó lactobacilos en los cultivos iniciadores, obteniendo resultados satisfactorios (Bartels *et al.*, 1987; Skeie *et al.*, 1997).

En los quesos madurados por mohos se añade una flora secundaria, que junto a las condiciones ambientales contribuyen al acabado del producto. Así, la función de las enzimas proteolíticas de *Penicillium roqueforti* en quesos azules, *P. camemberti* en queso Brie y Camembert, *Propionibacterium* sp. en quesos suizos y *Brodellus linens* en quesos de flora superficial, ha sido revisada y se ha constatado la presencia de aspartil proteinasas y metaloproteiniasas (Fox y McSweeney, 1996).

Las bacterias lácticas no iniciadoras (NSLAB) que están en baja concentración al principio, se desarrollan rápidamente hasta alcanzar tasas de 10<sup>7</sup> ufc/g al mes de maduración y permanecen estables a lo largo de toda la fase madurativa (Folkertsma *et al.*, 1996). La importancia de este tipo de microorganismos radica en los quesos elaborados a partir de leche cruda, complementando la acción proteolítica del cultivo

## Introducción

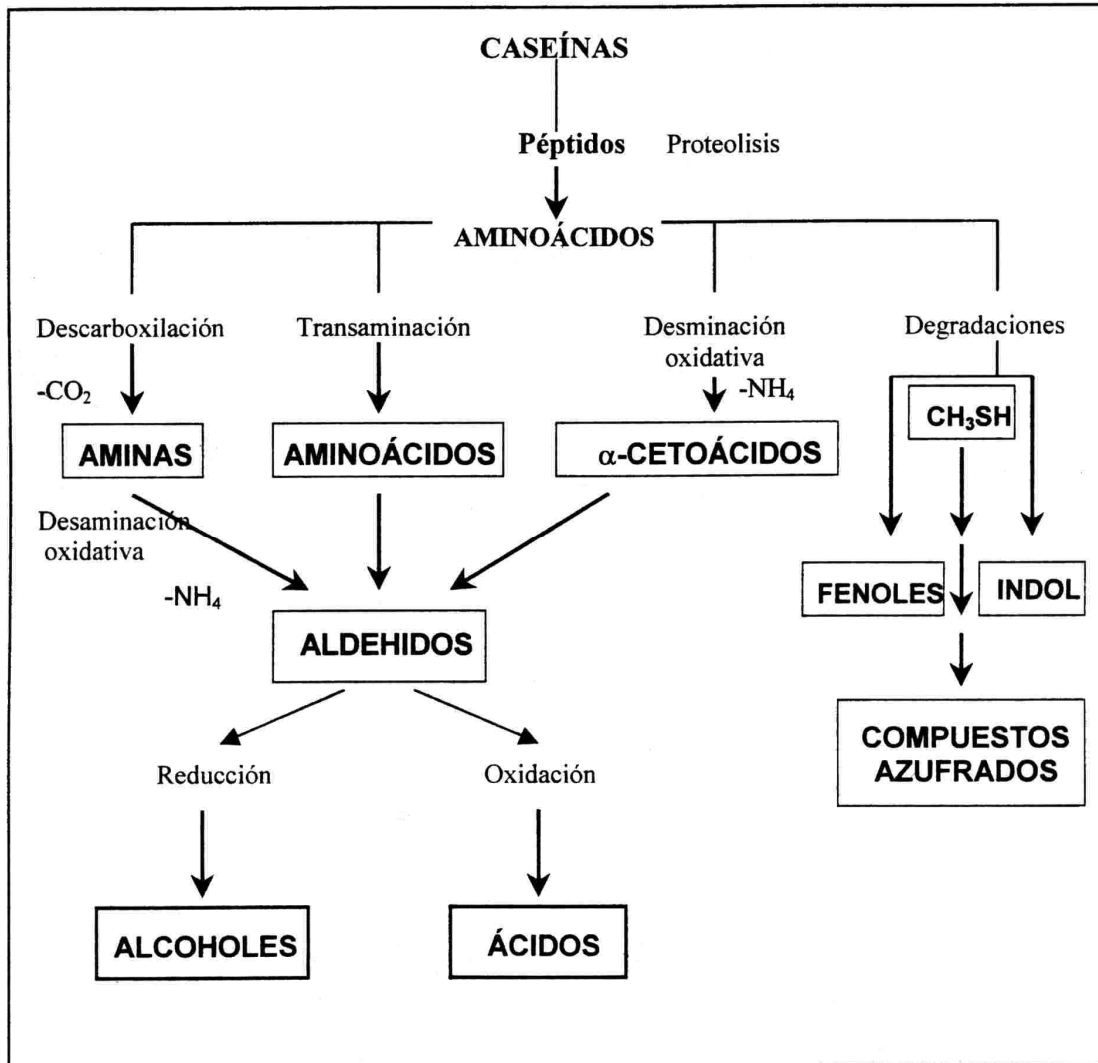
iniciador y produciendo péptidos de peso molecular similar y aminoácidos libres (Demarigny *et al.*, 1997; Lynch *et al.*, 1997).

Tras la proteólisis sufrida durante la fase de maduración aparecen los aminoácidos libres, los cuales sufren en primer término reacciones de descarboxilación, desaminación, transaminación, desulfuración y quizás hidrólisis de la cadena lateral del aminoácido, y en segundo lugar una conversión a aldehidos por acción de desaminasas sobre las aminas y finalmente se reducen a alcoholes o se oxidan a ácidos (Hemme *et al.*, 1982; Fox *et al.*, 1995; Fox y Wallace, 1997). Las rutas del catabolismo de los aminoácidos libres se muestran de forma esquemática en el Cuadro 5. Los productos de todas estas reacciones son amoniaco, aldehidos, fenoles, indoles y alcoholes que contribuyen de manera importante al sabor y al aroma del queso.

La concentración final de aminoácidos libres, que depende de la variedad de queso, ha sido tradicionalmente utilizado como índice de maduración (Fernández-Salguero, 1978; Marcos *et al.*, 1979a; Aston *et al.*, 1983; Puchades *et al.*, 1989; McSweeney y Fox, 1997). Debido a la degradación de las caseínas, la concentración de aminoácidos libres aumenta durante la maduración excepto la arginina, que se ha comprobado que disminuye en maduraciones prolongadas (Puchades *et al.*, 1989). La proporción de aminoácidos individuales respecto del total es similar en muchas variedades de quesos, la proporción relativa individual se considera un factor importante en el desarrollo del sabor típico del queso (Broome *et al.*, 1990) y otros consideran que no existe correlación entre el sabor del queso y la concentración de aminoácidos libres (Fox y Wallace, 1997) puesto que diferentes tipos de queso, con sabores distintos, presentaron concentraciones y proporciones relativas de aminoácidos libres muy similares. En consecuencia se cree que la producción de aminoácidos no es limitante durante la maduración del queso, pero sí puede serlo el tipo de transformación química o enzimática que puedan sufrir estos aminoácidos.

Una consecuencia negativa de la proteólisis que se desarrolla durante el período de maduración es la formación de aminas biógenas, la mayoría tóxicas y responsables de diversos síntomas de malestar (dolor de cabeza o mareos). Se originan tras la descarboxilación de aminoácidos, por determinadas especies bacterianas y, probablemente, por otros microorganismos.

**Cuadro 5.** Principales rutas metabólicas del catabolismo de los aminoácidos.



La concentración de aminas biógenas es menor en quesos elaborados a partir de leche pasteurizada (no están presentes estos microorganismos descarboxilantes) que en los quesos fabricados a partir de leche cruda y de calidad microbiológica deficiente. La producción de aminas está determinada por la formación de aminoácidos libres, es decir por la proteólisis (Walstra *et al.*, 2001). Por lo tanto la cantidad de aminas biógenas aumenta durante la maduración. La flora láctica tiene un papel destacado siendo capaces de formar aminas como histamina, tiramina, putrescina y cadaverina (Ordóñez *et al.*, 1997; Leuschner *et al.*, 1998, 1999).



## Introducción

Algunos aminoácidos como la leucina, fenilalanina y metionina sufren una ruta de degradación mediante la acción de transaminasas, desaminasas y descarboxilasas microbianas dando lugar a compuestos aromáticos (Varnam y Sutherland, 1995; Yvon *et al.*, 1997, 2000). Se han adicionado a la pasta del queso aminoácidos de cadena ramificada, aromáticos y sulfurados para acelerar la maduración (Engels y Visser, 1996; Wallace y Fox, 1997). La acción de los aminoácidos sobre el flavor del queso es indirecta, a través de microorganismos presentes durante la maduración, que producen sustancias volátiles y aromáticas como ácidos, aldehidos, alcoholes, ésteres y tioles.

### I.3.4.- MINERALES.

En el Cuadro 6 se muestra la concentración de los elementos minerales mayoritarios de la leche de vaca, de oveja y de cabra (Juárez *et al.*, 1984), que se presentan de forma relativamente constante, en función de diversos factores como las características genéticas, la fase de lactación y las condiciones medioambientales.

Entre las denominadas sales mayoritarias del queso destacan cloruros, fosfatos y citratos de calcio, potasio, magnesio y sodio además de la sal añadida durante la etapa de salado del proceso de elaboración quesera. Se distribuyen entre una fase soluble, fundamentalmente lactosuero y otra coloidal sobre las micelas de caseína, dependiendo de diversos factores como el valor pH y la temperatura de maduración, encontrándose los iones monovalentes principalmente en la fase soluble.

**Cuadro 6.-** Elementos minerales mayoritarios de las leches de oveja y cabra.

LECHE	MINERAL (%)				
	Na	K	Ca	Mg	P
OVEJA	0,048	0,121	0,186	0,018	0,127
VACA	0,045	0,140	0,123	0,009	0,095
CABRA	0,037	0,147	0,162	0,012	0,093

La adición de sal se puede realizar de diferentes maneras: mediante frotamiento de sal seca en superficie (aproximadamente 7 kg/100 kg de queso) como en muchos quesos artesanales de pequeña producción (p.e. queso de Los Pedroches,

## Introducción

Grazalema), por inmersión en baño de salmuera tras el prensado (3-4 kg/100 kg de queso) como en el caso del queso Manchego (la salmuera suele tener una concentración de cloruro sódico del 18-20%), por adición de sal a la leche (quesos de pasta dura) o por adición de sal a la cuajada antes del moldeado y prensado (2 kg/1000 l) como en los quesos tipo Cheddar (Walstra *et al.*, 2001).

Durante la elaboración del queso el objetivo del salado es detener la acidificación y conseguir una concentración final de sal entre 1,5-2,5 %, además de que influye en la maduración del queso y en su calidad. La adición de sal contribuye directamente al sabor del queso, enmascara el sabor no agradable que aportan otras sustancias producidas a lo largo de la maduración, ayuda a la formación de la corteza y provoca una disminución de la actividad de agua del queso lo que afecta a la actividad de varios enzimas presentes en la pasta (Scott, 1981; Guinee y Fox, 1993), incluyendo el coagulante, enzimas endógenas de la leche y enzimas microbianas. Como consecuencia se produce una mayor sinéresis o retracción en la cuajada, lo cual disminuye el contenido en humedad del queso (completa el desuerado) e influye en el crecimiento y la actividad microbiana, particularmente en el metabolismo de la lactosa residual en la cuajada por las bacterias de la flora vanal y del cultivo iniciador (lo cual afecta al valor pH). Además la adición de sal presenta un efecto inhibitorio sobre microorganismos indeseables (Choisy *et al.*, 1990). Así, se han detectado en queso Idiazábal un descenso de microorganismos de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* y un aumento de *Micrococcus* sp., mohos y levaduras cuando se aumenta la concentración de sal añadida (Pérez-Elortondo *et al.*, 1999a). Weimer *et al.* (1997) vieron que la adición de sal reduce la actividad de lipasas, esterases y aminopeptidasas. Nájera *et al.* (1999a) han constatado que un aumento del contenido de cloruro cálcico de 3-4 % potencia la lipólisis. Skeie *et al.* (1997) observaron que los quesos de bajo contenido en sal presentaban un valor pH más alto, un menor porcentaje de materia seca, menor firmeza, mayor proteolisis y sabores amargos. En los quesos salados hay una mayor concentración de  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y para- $\kappa$ -caseína intactas, posiblemente debido a que la sal origina una apertura de la microestructura produciéndose un incremento de la capacidad de retención de agua y de la solubilización de las caseínas intactas en la matriz de paracaseína (Guo *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista de la fabricación del queso los fosfatos y citratos de calcio y magnesio son las sales más importantes. Aproximadamente 1/2 del fósforo y

## Introducción

2/3 del calcio se encuentran en estado coloidal participando en la estructura del complejo caseínico (un 21 % unido a las caseínas y 46 % en forma de  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ ) mientras que tan sólo una décima parte se encuentra en forma de calcio reactivo. La presencia de calcio y su estado afectan a las propiedades reológicas de la cuajada y la textura del queso (Dordevic, 1971). Según Balcones *et al.* (1996) el principal factor que afecta a la coagulación de la leche de oveja es su concentración de calcio. El tamaño de las micelas de caseína se ve afectado por la presencia de calcio disponible, por lo que la adición de cloruro cálcico antes del cuajado aumenta el tamaño de las micelas (Scott, 1991). Se ha propuesto una clasificación del queso basándose en los índices Ca/proteína, Ca/P y P/proteína, ya que dan información acerca del modo de producción del queso y de sus características estructurales (Lucey y Fox, 1993).

El tratamiento térmico de la leche provoca que el calcio y el fósforo solubles se insolubilicen parcialmente y se asocien con las micelas de caseína, de forma que, por ejemplo, en la leche UHT un 40-50 % del calcio soluble aparece en forma coloidal. De la Fuente *et al.* (1997) han observado que durante el almacenamiento en refrigeración y en congelación de la leche se produce un incremento de los contenidos de fósforo coloidal, calcio y magnesio y se modifican las propiedades de coagulación de la misma. Lucey y Fox (1993) y Le Graet y Gaucheron (1999) señalan que la preacidificación de la leche durante la fabricación del queso provoca la transformación del  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4$  y magnesio coloidal insoluble a formas solubles, produciéndose una desmineralización durante la posterior etapa de desuerado. Además la pérdida de minerales de la cuajada es mayor a medida que se reduce el valor pH del suero. Este valor pH es característico de cada variedad de queso y depende del momento en que se produzca la formación del ácido láctico, antes del desuerado (p.e. Cheddar) o después del prensado (p.e. Gouda). Cuando el valor pH de la cuajada desciende la retención de calcio es mucho menor que la de fósforo y disminuye la relación Ca/P, sucediendo lo contrario cuando el valor pH se mantiene elevado. Durante la elaboración de determinadas variedades de quesos la cuajada es sometida a un calentamiento rápido a altas temperaturas, con lo que las partículas se contraen rápidamente expulsando la fase acuosa donde se encuentran las formas solubles de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4$  (Lucey y Fox, 1993).

Se ha reducido el contenido de cloruro sódico en algunas variedades de quesos como Kefalograviera, Camembert, Gouda y Feta, mediante su sustitución por mezclas

## Introducción

de KCl/NaOH, obteniéndose quesos más saludables (la hipertensión y la osteoporosis son algunos de los efectos perjudiciales del exceso de sal en los alimentos), con similares características composicionales, físico-químicas y sensoriales (Iwanczak *et al.*, 1995; Katsiari *et al.*, 1997, 1998). Sin embargo, Zorilla y Rubiolo (1999) han detectado un ligero sabor amargo en queso Fynbo salado con la mezcla KCl/NaOH.

Los oligoelementos minerales presentes en el queso están constituidos por los componentes minerales derivados de los cloruros, fosfatos y citratos de sodio, calcio y magnesio que forman parte de las sales de la leche y de la constitución de los componentes orgánicos y por la sal añadida a la cuajada o a la leche pasteurizada y refrigerada durante largo tiempo para restablecer el equilibrio entre el calcio coloidal y soluble y facilitar el proceso de coagulación y mejorar la consistencia del coágulo. Entre ellos cabe destacar el manganeso, cinc y fundamentalmente el hierro y el cobre, de elevada importancia técnica y nutritiva. Aproximadamente el 10 % del cobre total y la mitad del hierro se encuentra asociados a la membrana del glóbulo graso. El cinc se halla predominantemente en el fosfato coloidal. El cobre presenta acción catalítica en la autooxidación de la grasa y el manganeso tiene importancia en el metabolismo de determinadas bacterias lácticas, especialmente para la fermentación del citrato. Zhang y Mahoney (1991) y Rice y McMahon (1998) han adicionado hierro a la leche para la elaboración de quesos tipo Cheddar y Mozzarella, en forma de  $\text{FeCl}_3$  y hierro quelado a caseína o a las proteínas del suero con el objetivo de prevenir la anemia en grupos de alto riesgo, consiguiendo resultados satisfactorios.

La evolución del contenido mineral durante la elaboración y maduración del queso ha sido objeto de numerosos estudios (Moreno-Rojas *et al.*, 1992, 1994a,b y 1995; Macedo y Malcata, 1997b; Sanjuán *et al.*, 1998; Sánchez, 1999; Tejada, 2001, Roseiro *et al.*, 2003b).

### **I.3.5.- AGUA.**

El tipo de coagulación, el desuerado y el prensado influyen notablemente en el contenido en agua del queso, además de que durante la etapa de maduración se experimentan pérdidas importantes.

## Introducción

Scott (1991) afirma que el agua en el queso se encuentra en tres formas diferentes:

- Agua libre que contiene sustancias solubles.
  - Agua retenida por fuerzas de atracción a las partículas de la cuajada y la grasa.
  - Agua ligada a la estructura de algunos componentes de la cuajada (proteínas).
- En este sentido, Hardy (1997) y Eck (1990) señalan como factores principales que modifican el contenido de esta fracción de agua ligada al queso el salado de la cuajada y la deshidratación producida durante la maduración.

El agua puede pasar de una a otra fracción como consecuencia de determinadas reacciones o tras su liberación. Las reacciones bioquímicas catalizadas por las enzimas naturales de la leche, microbianas y del coagulante suceden en esta fase acuosa. Además para determinar la concentración de las enzimas y los sustratos es útil la cuantificación y caracterización de la fracción líquida.

Al principio de la maduración el queso presenta una estructura débil caracterizada por intensas reacciones enzimáticas producidas en la fase acuosa, favoreciéndose la proteólisis. Los movimientos del agua interna del queso hacia la superficie del mismo a través de aperturas y porosidades de la estructura causan una evaporación superficial con la consiguiente pérdida de agua. La desecación en la corteza del queso provoca la acumulación de sustancias solubles en esta zona. A medida que avanza la etapa de maduración la estructura del queso se hace más compacta y disminuye la velocidad de difusión del agua residual, siendo principalmente agua no solvente.

Krause *et al.* (1999) han observado que en quesos con bajo contenido en agua la proteólisis es menor debido a que la hidratación de las proteínas es prioritaria a la utilización de agua en la hidrólisis de las mismas por las enzimas. Guo y Kindstedt (1995) detectaron que a medida que aumenta el tiempo de maduración decrece notablemente la cantidad de suero exprimido por centrifugación, lo que indica un incremento de la capacidad de retención de agua. Jaros *et al.* (1997) han observado que el contenido en agua puede afectar a algunas propiedades reológicas del queso.

### I.3.6.- PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS: $a_w$ y pH.

#### I.3.6.1.- Actividad de agua ( $a_w$ ).

Se define como la relación entre la presión parcial de vapor de agua en el alimento y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura y presión total. Esta medida termodinámica permite predecir el estado y la estabilidad relativa de un alimento con respecto a sus propiedades físicas, crecimiento microbiano y velocidad de las reacciones de alteración (Labuza, 1980). Existe una gran diversidad de métodos experimentales para medir la actividad de agua de los alimentos. Gómez (1992) clasificó la metodología para la determinación de  $a_w$  en métodos que necesitan equipos específicos (higrómetro de cabello, eléctricos y de punto de rocío, medida manométrica de la presión de vapor y sicrómetros) y métodos que requieren del uso de instrumentos comunes de laboratorio (isotermas de sorción de humedad, medida de disminución del punto de congelación, medida del índice de refracción).

La actividad de agua del queso es el resultado de un conjunto de fenómenos físicos (difusión de sal, desuerado, deshidratación), químicos (interacción sustrato-cloruro de sodio) y bioquímicos (proteolisis). La  $a_w$  va a influir en la proteolisis, en el desarrollo de las bacterias ácido lácticas (responsables de la glucólisis) y en la inhibición del crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos y productores de toxinas (Marcos *et al.*, 1979b). Diversos autores (Marcos *et al.*, 1981; Fernández-Salguero *et al.*, 1986a; Marcos y Esteban, 1991; Millán *et al.*, 1991) han desarrollado ecuaciones específicas para diferentes variedades de quesos que permiten calcular la actividad de agua conociendo diversos parámetros composicionales y físico-químicos, como el contenido en agua, cenizas, sal, nitrógeno no proteico, etc.

#### I.3.6.2.- pH.

Como se ha comentado con anterioridad el grado de hidrólisis sufrido por la lactosa tras la coagulación de la leche así como la cantidad de la misma que queda retenida en la cuajada tras el desuerado van a regular el valor pH del queso. Transcurridas estas primeras operaciones de la elaboración del queso, las bacterias y mohos presentes en la cuajada van a degradar los componentes de la misma rindiendo sustancias neutras o alcalinas que aumentan el valor pH. Aunque en los

## Introducción

primeros estadios del período de maduración la capacidad tampón de la cuajada es elevada, ésta va disminuyendo a medida que avanza la proteólisis.

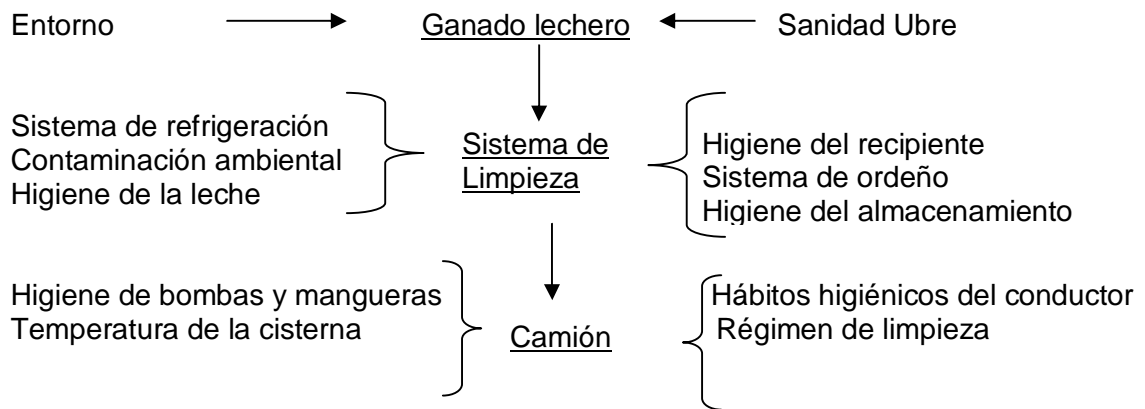
El pH óptimo durante la elaboración del queso está comprendido entre 5,7 y 6. A este valor pH se produce una red tridimensional muy regular que atrapa glóbulos grasos de 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, enlaces hidrófobos e interacciones electrostáticas) son las primeras fuerzas responsables de la cohesión. Marchesseau *et al.* (1997) señalan que pequeños cambios en la composición iónica modifican sustancialmente la interacción de la proteína y tienen una repercusión importante sobre la estructura final y la calidad del gel proteico. El valor pH del queso va a afectar a la actividad enzimática, a la textura del queso y al crecimiento microbiano y a la producción de toxinas. Hynes *et al.* (1999) señalan que los defectos de textura del queso Crecenza son debidos a la imposibilidad de las caseínas de formar agregados cuando el valor pH de queso es igual a su punto isoelectrico.

## **I.4.- MICROBIOLOGÍA.**

### **I.4.1.- CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LA LECHE.**

La microflora existente en la leche al llegar a la quesería constituye la flora microbiana inicial y va a influir notablemente en la calidad microbiológica de los quesos elaborados a partir de ella. Tomadijo *et al.* (1998) consideran que una leche destinada a la fabricación de queso es de buena calidad cuando contiene una carga microbiana baja y escaso o nulo número de microorganismos tecnológicamente indeseables. Las deficiencias de la leche utilizada como materia prima en la elaboración de quesos se relaciona con la mayoría de los defectos y accidentes del producto final. Limsowtin y Powel (1996) señalan como factores que afectan a la calidad microbiológica de la leche los que aparecen en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.-** Factores que afectan a la microbiología de la leche.



Por lo tanto la calidad microbiológica de la leche debe de empezar a cuidarse en la propia granja, para lo cual es requisito imprescindible la colaboración del ganadero, hecho que se asegura mediante información, incentivos para que instale equipos refrigerados y con primas por calidad microbiológica (García Fontán *et al.*, 1999). La leche constituye un medio prácticamente completo para satisfacer las necesidades de desarrollo y multiplicación de casi todos los microorganismos (posee todos los principios inmediatos en concentraciones adecuadas, así como numerosos factores de crecimiento). Además de la microflora propia de la leche hay que tener en cuenta la microflora contaminante. Por tanto la proliferación bacteriana en la leche es inevitable (ICMSF, 1985). Aún con medidas de higiene extremas es difícil conseguir recuentos inferiores a  $5 \times 10^3$ /ml en la leche, debido a los diversos microorganismos saprofitos (básicamente lactobacilos, estreptococos lácticos y micrococos) de la ubre y de los conductos galactóforos (Larpent, 1994).

Por otra parte la leche contiene inhibidores naturales, como las lacteninas presentes en la leche recién ordeñada. Se diferencian dos tipos, dependiendo de la especificidad con que actúan, las lacteninas de inhibición específica (inmunoglobulinas G1 y G2), junto a las cuales actúan sinérgicamente las aglutininas, y las lacteninas de inhibición inespecífica (lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa), todas contribuyendo al mantenimiento de la calidad higiénico-sanitaria de la leche (Walstra *et al.*, 2001). La lactoferrina liga el Fe, reduciendo la actividad de los iones  $Fe^{2+}$  que son necesarios para el desarrollo de algunas bacterias. La lisozima hidroliza los polisacáridos de la pared celular de las bacterias ocasionando la lisis del microorganismo. Además, en la leche de varias especies animales está presente un



## Introducción

sistema natural antimicrobiano, el sistema lactoperoxidasa (lactoperoxidasa/tiocianato/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La enzima lactoperoxidasa cataliza la oxidación del tiocianato por el peróxido de hidrógeno, produciéndose unos productos intermedarios de la reacción que tienen efecto antimicrobiano. Se ha comprobado la eficacia de este sistema contra microorganismos patógenos como *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolítica* (Farrag *et al.*, 1992a,b), *Aeromonas hydrophila* y otros microorganismos psicrotrofos presentes, en ocasiones, en la leche cruda (Santos *et al.*, 1995). En la leche de oveja el valor pH óptimo de actuación de la lactoperoxidasa es de 5,5. Además se ha comprobado que la enzima permanece activa durante la maduración del queso y que pierde el 10 % de su actividad tras el desnatado, entre un 10-30 % tras la pasteurización y un 65 % durante la etapa de desuerado (Chávarri *et al.*, 1998).

Los métodos de conservación y los distintos procedimientos tecnológicos de la leche afectan a las características microbiológicas de los quesos elaborados a partir de ésta.

El efecto inhibitor de la refrigeración, usada como método de conservación en la explotación ganadera o la industria láctea, sobre el crecimiento de las bacterias mesófilas permite prolongar el tiempo de almacenamiento antes de su procesado. No obstante, este método produce unas condiciones idóneas para el desarrollo de bacterias psicrotróficas presentes en la leche cruda, que aunque son destruidas fácilmente por diversos tratamientos, pueden producir enzimas extracelulares que no son destruidas por éstos y que afectan a la calidad de los productos lácteos. Diversos autores señalan que el procedimiento más adecuado para el control de estos microorganismos psicrotrofos puede ser el tratamiento de la leche refrigerada con CO<sub>2</sub> (Espie y Madden, 1997; Ruas-Madiedo *et al.*, 1998a). Además Ruas-Madiedo *et al.* (1996) y Amigo *et al.* (1995) observaron que el valor pH ajustado a 6,2 potencia el efecto inhibitor del gas.

La leche, antes de la pasteurización o de su utilización, se puede someter a un proceso de desgasificación a vacío hasta alcanzar valores pH próximos a 6,5-6,6 para prevenir los cambios de volumen por el gas ocluido en el pasterizador, la coagulación de la leche y obtener una leche aceptable para el consumo. Se ha probado este sistema en la elaboración de diversos quesos de coagulación ácida (Ruas-Madiedo *et al.*, 1998b) y de coagulación enzimática (Calvo *et al.*, 1993; Uceda *et al.*, 1994b; Montilla *et al.*, 1995; McCarney *et al.*, 1995) comprobándose una disminución en la cantidad de coagulante necesario y en el tiempo de coagulación y ruptura de la

## Introducción

cuajada. Hicks *et al.* (1986) y Caro y Mateo (2000) comprobaron que la disminución del rendimiento quesero tras un almacenamiento prolongado de la leche de partida en refrigeración se debe a la separación de determinadas submicelas de caseína, como la caseína  $\beta$  y a la degradación enzimática de la grasa y proteína por los microorganismos psicrófilos, lo cual incrementa sus pérdidas en el suero. Someter la leche a la inyección de CO<sub>2</sub> (Calvo *et al.*, 1993; Uceda *et al.*, 1994b; Ruas-Madiedo *et al.*, 1998b), o a un tratamiento de termización o a la preinoculación con cultivos lácteos productores de peróxidos (Caro y Mateo, 2000) son algunas alternativas para evitar este descenso del rendimiento quesero.

De las 700.000 toneladas/año de queso producido en Europa, los quesos elaborados con leche cruda representan un porcentaje importante, sobre todo en países como España, Portugal y Grecia (Grappin y Beuvier, 1997). No obstante la mayoría de los quesos, por motivos higiénicos, son obtenidos a partir de leche pasteurizada. Las ventajas de la pasteurización de la leche en la elaboración de los quesos son la destrucción de microorganismos patógenos, la reducción de la concentración de aminas biógenas, la mejora de la aptitud quesera al eliminar la mayor parte de la flora contaminante y el aumento del rendimiento quesero al lograr una cierta desnaturalización de las proteínas del suero que interactúan con las caseínas (vía formación de enlaces intermoleculares disulfuro) y son incorporadas a la cuajada, además de lograr una mayor uniformidad en los productos.

No obstante este tratamiento térmico presenta ciertos inconvenientes como la inactivación total de varias enzimas, como la catepsina D, el complejo plasmina/plasminógeno, la fosfatasa alcalina y lipasas lipoproteicas, el descenso del valor pH, el aumento de la acidez de valoración, la degradación parcial de la lactosa rindiendo lactulosa y ácidos orgánicos, la agregación de las micelas de caseína, el aumento de la cantidad de fosfato coloidal y la disminución del Ca<sup>+</sup> (fenómenos que disminuyen la aptitud de la leche para la coagulación), modificaciones en la proteolisis y una destrucción parcial de la microflora nativa de la leche de partida la cual es responsable del desarrollo del aroma típico del queso. Por estos motivos en la fabricación artesanal de determinados quesos se emplea leche cruda.

## I.4.2.- CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL QUESO.

La actividad microbiana juega un papel primordial en la elaboración de los cientos de variedades de quesos que se producen en el mundo. Como se ha comentado en apartados anteriores, durante la maduración, las enzimas microbianas intervendrán en la fermentación de la lactosa y otras sustancias y en fenómenos lipolíticos y proteolíticos, generando, entre otros, compuestos de naturaleza sávida y aromática. Los microorganismos contribuyen notablemente al desarrollo de sabores, aromas y características físicas de los quesos que aparecen fundamentalmente durante el período madurativo. En esta etapa se va a producir en la pasta del queso un crecimiento de bacterias lácticas y de gérmenes propiónicos del siguiente modo: Durante la fase de formación del ácido láctico van a crecer principalmente las bacterias lácticas y al agotarse la lactosa, se detiene el crecimiento de las primeras y se inicia el crecimiento de los microorganismos propiónicos. La formación de los “ojos” del queso, por producción de CO<sub>2</sub>, sucede en esta fase de crecimiento de las bacterias propiónicas. Al principio los gases producidos se disuelven en el agua de composición, pero cuando ésta se satura, el gas producido se desprende en forma de pequeñas burbujas que forman los ojos. El gas carbónico tiende a atraer más CO<sub>2</sub> de otras zonas y por tanto hace el ojo cada vez mayor. Si el desprendimiento del gas es brusco, se forma múltiples ojos de pequeño tamaño y, por el contrario, si es lento, se forman ojos grandes. La acción microbiana es tanto a nivel superficial como en la masa del queso.

Por otra parte, los microorganismos son responsables del desarrollo de sabores extraños, de defectos físicos y de la posibilidad de aparición de toxiinfecciones alimentarias a consecuencia del consumo de este derivado lácteo. Según Peláez (1985) *Staphylococcus* sp. es uno de los géneros bacterianos implicados en la mayor parte de las enfermedades transmitidas por los productos lácteos. Aunque la leche y los derivados lácteos históricamente han sido considerados alimentos seguros (Kosikowski y Mistry, 1997a,b), en la década de los 80 surgieron diversas publicaciones acerca de las patologías causadas por *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus* sp. en queso (Johnson *et al.*, 1990), lo cual hace imprescindible la implantación del Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) en leche y queso (Varnam y Sutherland, 1995).

## Introducción

Para intentar proteger al consumidor y asegurar un producto alimenticio en perfectas condiciones organolépticas las administraciones de los distintos países han dictado una serie de límites y normas microbiológicas en los alimentos. Así la legislación alimentaria española recoge límites microbiológicos y valores de referencia para distintos alimentos. Con estos valores se pueden conocer las condiciones en que se ha elaborado el producto para corregirlas y mejorarlas en caso necesario.

Acerca de la evolución de los recuentos de la flora microbiológica de quesos de oveja elaborados con leche cruda existen múltiples trabajos, entre otros, para queso Manchego (Núñez, 1976a,b,c, 1988; Martínez-Moreno y Núñez 1976; Ballesteros, 2002), Idiazábal (Barcina *et al.*, 1988; Pérez-Elortondo *et al.*, 1993a,b, 1998, 1999a,b), La Serena (Martínez y Fernández-Salguero, 1978; Fernández del Pozo *et al.*, 1988b, 1989; Medina *et al.*, 1991; Núñez *et al.*, 1991a), Picante (Freitas *et al.*, 1996), queso Serra de Estrella (Sousa y Malcata, 1996b; Macedo *et al.*, 2004), queso Torta del Casar (Pouillet *et al.*, 1991) y queso de Los Pedroches (Sánchez *et al.*, 1993; Carmona, 1994; Carmona y Gómez, 1994; Sánchez *et al.*, 1995; Carmona *et al.*, 1998, 1999; Sánchez, 1999; Vioque *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2001; Tejada, 2001; Tejada y Fernández-Salguero, 2003).

### **1.4.2.1.- Aerobios mesófilos.**

Los recuentos de aerobios mesófilos o viables totales son un número indicativo de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de alimento. A pesar de que no se reconozca una relación directa entre la flora aerobia y la posible presencia de microorganismos patógenos en los alimentos, recuentos altos en los mismos indican que los alimentos han podido estar sometidos a binomios de tiempo y temperatura tales que han permitido el desarrollo de los diferentes microorganismos (Mossel y Moreno, 1985).

La aplicación del estudio de los recuentos de microorganismos viables totales en los productos lácteos se debe a que la mayoría de los microorganismos patógenos que dan lugar a enfermedades en el hombre son mesófilos. La significación se traduce en una contaminación excesiva de la materia prima y una proporción alta de microorganismos termoresistentes la cual es indicativa de tratamientos térmicos insuficientes, recontaminaciones posteriores a los tratamientos térmicos o incrementos de la temperatura durante la conservación de productos lácteos refrigerados. En determinados países la utilidad de la leche para la producción de

## Introducción

derivados lácteos o para consumo tal cual, viene determinada por el recuento de viables totales.

La microflora inicial de la leche y la microflora de contaminación durante su manipulación van a influir en el número y tipo de microorganismos presentes en el queso. Así recuentos inferiores a  $10^3$ - $10^4$  ufc/ml indican una contaminación escasa durante la elaboración, mientras que valores iniciales superiores a  $10^5$ - $10^6$  ufc/ml indican una importante falta de higiene en la etapa de producción (Cristina y Bramley, 1981). Además estos recuentos de aerobios mesófilos totales de  $10^6$  ufc/ml son frecuentes en la leche procedente de granjas (Ojeda, 1973; Mayayo *et al.*, 1976; Petrova, 1981; Núñez *et al.*, 1984, 1986b; Bautista *et al.*, 1986; Núñez *et al.*, 1989; Fernández del Pozo *et al.*, 1988b).

### **I.4.2.2.- Enterobacterias y Coliformes.**

La familia *Enterobacteriaceae* está constituida por un amplio grupo de microorganismos Gram negativos localizados en el intestino del hombre y animales, suelo, agua y plantas. Comúnmente encontramos en quesos madurados elaborados a partir de leche cruda de oveja recuentos altos de enterobacterias (Fernández del Pozo *et al.*, 1988b, 1989; Barcina *et al.*, 1988; Pérez-Elortondo *et al.*, 1993a; Sánchez *et al.*, 1993, 1995; Freitas *et al.*, 1996; Macedo *et al.*, 1996a). Debido a su actividad proteolítica y lipolítica las enterobacterias, en algunas ocasiones, son consideradas responsables de defectos en los quesos como el sabor amargo y sabores y olores rancios y afrutados. Además poseen capacidad enterotoxigénica y son responsables de la alteración denominada "hinchazón precoz" producida en las primeras 48 horas de fabricación de los quesos, acompañada de un olor fecal y debido a una producción elevada de gas durante la fermentación mixta de la lactosa en la que junto al ácido láctico se produce ácido acético, etanol,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ . Esta alteración suele ir asociada a una falta de higiene en la producción y es producida por especies como *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, con la intervención de otros microorganismos como levaduras y especies del género *Bacillus* (Varnam y Sutherland, 1995; García-Fontán *et al.*, 1999).

Los coliformes son los microorganismos menos resistentes a las condiciones adversas y por su carácter termolábil se destruyen fácilmente con la pasteurización. Además al ser bacterias que habitan normalmente en el intestino del hombre y de los animales se consideran indicadores de contaminación fecal, pues su presencia en los

alimentos alerta más que el recuento de microorganismos aerobios mesófilos de la presencia de microorganismo patógenos también de procedencia entérica como *Salmonella* sp. y *Clostridium perfringens* (Sánchez, 1999). La aparición de coliformes también es indicativo de la presencia de los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, aunque no en todos los casos (Peláez, 1985).

#### **1.4.2.3.- Micrococos y estafilococos.**

En las primeras fases de maduración los micrococos alcanzan niveles importantes y producen proteasas y lipasas extracelulares (Bhowmilk y Marth, 1990; Ortiz de Apocada *et al.*, 1993) que permanecen activas durante todo el proceso de maduración, interviniendo en procesos proteolíticos y lipolíticos. Su actividad proteolítica extracelular se centra principalmente en la caseína  $\alpha_{s1}$  mientras que las proteinasas endocelulares degradan fundamentalmente la caseína  $\beta$ . Respecto a la acción lipolítica, producen ácidos grasos simples que son fácilmente metabolizados por algunas bacterias lácticas (Ordóñez, 1987; Bhowmilk y Marth, 1990).

En quesos como el Gouda se ha relacionado a los micrococos con alteraciones del color, produciendo coloraciones rosáceas por reducción de nitratos a nitritos a valor pH de 5,2-6,7 por parte de estos microorganismos. Aparte este género bacteriano ha sido empleado para acelerar la maduración de quesos fabricados con leche cruda y pasteurizada por su contribución en el desarrollo del flavor y por su actividad lipolítica y proteolítica (Mohedano *et al.*, 1996; Menéndez *et al.*, 1999).

Los estafilococos se encuentran presentes en la leche de los animales que sufren mamitis, en los operarios y en el ambiente que rodea al ganado. De ahí que el consumo de quesos duros y semiduros ha sido la causa de varias intoxicaciones estafilocócicas, habiéndose realizado diversos estudios acerca de la presencia de *Staphylococcus aureus* en queso (Varnam y Sutherland, 1995; Deluca *et al.*, 1997; Meyrand *et al.*, 1998; Meyrand y Vernozzy-Rozand, 1999). Una lenta acidificación debida a una actividad insuficiente del cultivo iniciador favorece el crecimiento y la producción de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus*, fenómenos que pueden continuar en la cuajada favorecidos por los altos niveles de sal y las temperaturas altas. Debido a que durante la maduración generalmente se destruye al microorganismo pero no la enterotoxina, se han desarrollado métodos para detectar la presencia de ésta última en queso (Meyrand *et al.*, 1998; Vernozzy-Rozand *et al.*, 1998).

#### **I.4.2.4.- Bacterias ácido lácticas (BAL).**

En 1919 Orla-Jensen reunió en un grupo diferentes géneros microbianos capaces de fermentar glúcidos produciendo ácido láctico, definiendo así el grupo de las bacterias ácido lácticas o bacterias del ácido láctico y separándolas de las bacterias productoras de ácido propiónico. Así quedaron divididas en heterolácticas, cuando se producían varias sustancias en la fermentación láctica como ácido acético, etanol o anhídrido carbónico y homolácticas, cuando prácticamente todo el producto formado era ácido láctico. Posteriormente se clasificaría a las bacterias lácticas en géneros: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Así mismo, Schleifer *et al.* (1985) sugirieron dividir el género *Streptococcus* sp. en el género *Lactococcus* sp. formado por los estreptococos lácticos mesófilos y el género *Enterococcus* sp. compuesto por los estreptococos fecales o D de Lancefield (Schleifer y Kilper-Bälz, 1987)

En la leche cruda de partida para la elaboración de quesos y debido a que *Pediococcus* sp. no siempre se puede detectar (Jordan y Cogan, 1993) y *Bifidobacterium* sp. tiene aplicaciones nutricionales y probióticas (Fuller, 1989), se puede reducir la flora láctica a tres géneros (Branger, 1992): *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

Fundamentalmente las bacterias ácido lácticas se aíslan de los vegetales, de la flora del rumen y de la leche. De hecho, antes de la introducción del ordeño mecánico y la refrigeración, las bacterias ácido lácticas eran predominantes en la leche cruda impidiendo la proliferación de otros microorganismos. Actualmente se conoce que no existe un reservorio natural de estos microorganismos que garantice unos niveles homogéneos en la leche, siendo además los peores adaptados al crecimiento en la leche cruda y en el material de ordeño, a diferencia de otros microorganismos. Por estos motivos se ha generalizado la adición de cultivos iniciadores a la leche durante el proceso de elaboración del queso.

Ordóñez (1987) ha descrito las diversas funciones que realizan las bacterias ácido lácticas durante la maduración de los quesos:

- Son capaces “per se” de coagular la leche y favorecer la acción del coagulante cuando la coagulación es mixta (ácida y enzimática). Además influyen en la retracción del cuajo formado y en la expulsión del suero confiriendo a la

## Introducción

cuajada ciertas características que van a influir en la textura final del queso elaborado.

- Proporcionan el potencial redox necesario para la formación de componentes azufrados reducidos que intervienen en el aroma de los quesos. Además contribuyen al sabor fresco y ácido de algunos tipos de queso fresco.
- Previenen el crecimiento de bacterias patógenas y otros microorganismos alterantes, con una triple acción: el valor pH bajo de las cuajadas inhibe el crecimiento de microorganismos indeseables, la acción de competencia con bacterias patógenas (particularmente *Salmonella* y *Staphylococcus* sp.) y la producción de determinados metabolitos tóxicos que inhiben el crecimiento de determinadas bacterias.
- Producen compuestos volátiles como el diacetilo y aldehídos, de carácter aromático, y otros gases como el CO<sub>2</sub> que contribuyen a la formación de los ojos.
- Mejoran la digestibilidad y valor nutritivo del queso gracias a la transformación de la lactosa en ácido láctico y al desdoblamiento de proteínas y grasas.
- Presentan actividad terapéutica. Como ejemplos el empleo del *Bifidobacterium* sp. y *Lactobacillus acidophilus* en el bio-yogur y productos similares e incluso se adicionan junto al cultivo iniciador en determinados quesos (Ghoddusi y Robinson, 1996).
- Poseen enzimas lipolíticas y proteolíticas que gobiernan las reacciones enzimáticas que suceden en el queso durante la etapa de maduración. Los lactobacilos presentan actividad lipolítica/esterolítica mientras que los lactococos poseen una actividad proteolítica limitada. La actividad acidificante y proteolítica son dos de los parámetros más importantes recogidos en la bibliografía a la hora de elegir determinadas especies microbianas como cultivo iniciador (Centeno *et al.*, 1996a,b; Cogan *et al.*, 1997; Hebert *et al.*, 1998; Menéndez *et al.*, 1998).

En relación con la actividad lipolítica de determinadas especies bacterianas presentes en la pasta del queso, Macedo y Malcata (1997c) tras inocular durante 21 días varias especies bacterianas aisladas en queso Serra de Estrella elaborado con leche de oveja, observaron que las especies de mayor actividad lipolítica fueron *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* (hidroliza ácidos grasos de cadena corta, media y larga), *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc lactis* (sobre todo hidrolizan ácidos grasos de cadena corta y media) y con menor intensidad



## Introducción

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Otras bacterias como *Lactobacillus paracasei* no presentaron actividad lipolítica. *Yarrowia lipolytica* fue la que más degradó la grasa de entre la microflora dominante del queso Picante (produciendo principalmente ácido oleico, palmítico, mirístico y cáprico) y en menor medida *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* y no presentaron actividad lipolítica *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei* (Freitas et al., 1999). En queso de Los Pedroches, las especies con mayor actividad lipolítica durante la maduración fueron *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, muy abundante al principio de la etapa de maduración para disminuir luego (30/13,53 %); También destacaron *Enterococcus faecalis* (18,57/25,71 %), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (3-5 %), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* (8,21/21,43 %) y *Lactobacillus plantarum* (10,13/30,71) (Sánchez, 1999). Se ha detectado cierta actividad lipolítica extracelular del *Lactobacillus casei* subsp. *casei* y *Lactobacillus plantarum* en queso Torta del Casar (Suárez et al., 1984) y en queso Cheddar (Olson et al., 1997).

Durante los 2 ó 3 primeros meses de maduración los lactococos son los microorganismos más abundantes y los desencadenantes de la acidificación. Más tarde su crecimiento disminuye y a los 6 ó 7 meses son superados por los lactobacilos, que parten de una tasa más baja y presentan un crecimiento más lento pero progresivo y una mayor resistencia a valores pH ácidos que los lactococos. *Lactococcus* sp. son ampliamente utilizados en la industria quesera. Jay (1994) señala que el 90 % de los cultivos iniciadores de tipo mixto contienen lactococos. Todos son mesófilos (su uso como iniciador sólo es adecuado en aquellos quesos en los que la temperatura de obtención de la cuajada no sea superior a 40 °C) y presentan una actividad fundamentalmente proteolítica dando lugar a aminoácidos libres y oligopéptidos. Frecuentemente aparecen en las primeras etapas de la fabricación quesera creando el ambiente ácido adecuado para el crecimiento de los lactobacilos (Ordóñez, 1987). El lactococo más destacado como desencadenante inicial de la acidificación es *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, aunque también puede ser debida a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, o a los dos juntos. Así, el lactococo más aislado de la leche cruda de oveja y de los quesos fabricados a partir de ella (Macedo et al., 1995) es el *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que generalmente se presenta en simbiosis con *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ya que fermenta varios azúcares, soporta temperaturas más altas (40 °C) y es ligeramente más resistente a la sal (concentraciones hasta el 6,5 %).

## Introducción

La combinación de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *cremoris* es muy utilizada en el caso de la fabricación de quesos de pasta dura, de forma que el primero permite reducir el tiempo de maduración y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* proporciona la forma consistente y el sabor y aroma adecuados.

Por otro lado las únicas bacterias lácticas capaces de metabolizar el citrato produciendo diacetilo y acetato, sustancias responsables del aroma de los quesos frescos y en parte de los madurados (Varnam y Sutherland, 1995) son *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* y *Leuconostoc* sp. Además de ser poco acidificantes y metabolizar el citrato, el género *Leuconostoc* se caracteriza por su crecimiento rápido al inicio de la maduración y por realizar una fermentación alcohólica con la formación de diacetilo y dióxido de carbono. Aunque suelen ser predominantes al inicio de la maduración, gradualmente son reemplazados por los lactobacilos, mucho más resistentes a las condiciones ácidas (Mossel y Moreno, 1985).

### **I.4.2.5.- Levaduras y mohos.**

Debido a las características físico-químicas (bajo valor pH y presencia de sal) el queso suele afectarse por el crecimiento de mohos y levaduras. De hecho en determinadas variedades de quesos con unas características organolépticas muy peculiares, como los quesos de vena azul y los madurados con mohos superficiales, resulta fundamental la presencia de especies de mohos como *Penicillium camemberti*, *P. candidum*, *P. caseicolum*, *P. roqueforti* y *P. glaucum*. Los mohos suelen presentar un crecimiento lento, de manera que otros microorganismos pueden deteriorar el queso antes de que el enmohecimiento sea evidente. Por otra parte, Serrano *et al.* (1997b) señalan que géneros como *Penicillium* y *Mucor* son muy frecuentes en la corteza de los quesos.

La alteración de este derivado lácteo por mohos, que con frecuencia pertenecen al género *Cladosporidium* sp., suele estar acompañada de una intensa lipólisis y proteólisis producida por *Penicillium* sp., en un 60-80 % de los casos, y *Aspergillus* (Varnam y Sutherland, 1995). Aparte del deterioro visible que provoca el crecimiento fúngico, el 20 % de los mohos presentes en el queso, *Penicillium* y *Aspergillus* sp., son productores potenciales de micotoxinas, que pueden tener acción tóxica y cancerogénica.

Determinadas especies de levaduras como *Kluiveromyces lactis* y *K. fragilis* fermentan la lactosa con elevada producción de gas, pudiendo ocasionar problemas de hinchazón precoz, apareciendo en la cuajada numerosas aberturas y un olor característico a alcohol avinagrado, levadura de pan o manzana fermentada (García-Fontán *et al.*, 1999). Además se puede producir un abundante crecimiento de levaduras sobre la superficie del queso ocasionando una corteza viscosa y un aspecto multicolor o rosáceo. El crecimiento de levaduras superficiales se favorece por un secado inadecuado de la corteza después de la salmuera y también cuando la corteza contiene mucha lactosa debido a una acidificación insuficiente en el queso.

## **I.5.- ANÁLISIS SENSORIAL.**

### **I.5.1.- GENERALIDADES.**

La aceptabilidad de un alimento viene determinada por un conjunto de factores que según Rohm *et al.* (1994) pueden dividirse en primarios o secundarios. Dentro de estos últimos destacan el precio, el envasado, el etiquetado y la imagen (Early, 1995). Entre los primarios aparecen una serie de características sensoriales como el olor, el sabor, la textura y la apariencia externa. Por otra parte, simplificando el concepto de calidad, la elección de un alimento estará condicionada por las sensaciones que perciba el consumidor y que sean capaces de satisfacer sus expectativas (Pagliarini *et al.*, 1991; Close, 1994; Linnemann *et al.*, 1999). En el mercado actual y debido a la demanda por parte de los consumidores y la competitividad existente es fundamental definir la calidad de los alimentos, siendo las características sensoriales las de mayor importancia y a la vez las más difíciles de evaluar de manera objetiva.

El "Análisis Sensorial" se define como una disciplina científica empleada para medir, analizar, evocar e interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos que se perciben por los sentidos de la vista, el olfato, el oído, el gusto y el tacto. En este sentido el Análisis Sensorial se muestra como una herramienta útil para conocer ciertas características de los alimentos posibilitando una fabricación adecuada de los mismos con el objetivo de satisfacer las demandas específicas de los consumidores a los que van destinados. Esta técnica que precisa al hombre como instrumento de medida (llegando a obtener resultados poco objetivos pero muy

## Introducción

exactos) permite estudiar características de calidad, tipicidad y cambios organolépticos, que pueden complementar a la información obtenida de los análisis químicos e instrumentales. Así, se llega a superar el límite de la sensibilidad instrumental de manera que nuestros sentidos pueden percibir un ligero sabor, olor, etc. cuando no aparece señal en un detector mecánico. Además los sentidos humanos nos muestran una impresión global de aroma, sabor, aspecto, temperatura, etc., mientras que los instrumentos de medida sólo pueden analizar componentes simples.

Las aplicaciones de la evaluación sensorial son múltiples y variadas, jugando un papel importante en muchas de las actividades de investigación y desarrollo en los alimentos. El control de calidad, la tipificación de alimentos, el desarrollo e investigación de nuevos productos con características organolépticas diferentes y el establecimiento de perfiles sensoriales adecuados son algunas de éstas.

A partir de los métodos organolépticos basados únicamente en la experiencia individual del examinador, se han desarrollado los métodos sensoriales. Para que los resultados obtenidos sean objetivos, además de tener en cuenta la exactitud y seguridad de los resultados obtenidos por los órganos de los sentidos, las personas encargadas de los ensayos deben aplicar técnicas de examen concediéndole importancia a la preparación, desarrollo y valoración del examen organoléptico.

Según Stone y Sidel (1985) existen tres tipos de pruebas:

- Las de preferencia y/o aceptación (escala hedónica) que determinan el grado de aceptación de un alimento y si es preferible frente a otros.
- descriptivas, que indica si existen diferencias entre dos o más muestras y además indican la naturaleza, sentido y magnitud de las mismas.
- discriminatorias que aportan información sobre la diferenciación con respecto a un atributo o grupos de atributos.

De estos tres tipos de análisis sensorial, el de mayor interés es el descriptivo al permitir identificar y cuantificar los atributos de un alimento (ASTM, 1992; Setser, 1994). Este tipo de exámenes descriptivos comenzaron a utilizarse en los años cincuenta y han continuado hasta nuestros días (Cairncross y Sjöstron, 1950; Stone *et al.*, 1974; Williams y Langron, 1984; Oreskowich *et al.*, 1991; Hort *et al.*, 1997a; Ordóñez *et al.*, 1998a), aunque el análisis descriptivo cuantitativo convencional ha sido sustituido por un método llamado perfil de libre elección, que se fundamenta en la

## Introducción

utilización y selección de descriptores por parte de los jueces de manera individual (Jack *et al.*, 1993; Parolari *et al.*, 1994). A pesar de que la interpretación de los resultados presenta cierta complejidad (Issanchou *et al.*, 1997) esta técnica se ha empleado con éxito en la evaluación de diversos productos alimenticios como productos gelificados, bebidas alcohólicas, y quesos (Piggot y Mowat, 1991; Jack *et al.*, 1993).

Independientemente del método empleado, el análisis descriptivo aporta una interesante información acerca del alimento objeto de estudio. Así nos indica qué hacer para obtener un producto con características similares a las de un control o qué y cuanto hay que cambiar en un producto alimenticio cuando éste es rechazado por el consumidor. El grado de utilidad y el valor de los resultados obtenidos en un perfil sensorial va a depender del tipo de técnica empleada para escoger los atributos que describan los estímulos percibidos, la aptitud de los jueces para asociar los binomios descriptor-sensación y el análisis estadístico aplicado para el estudio de los datos.

El método tradicional para la selección de atributos es la confección de una lista por discusión abierta entre equipos de catadores que conozcan el alimento (Heynemann y Noble, 1987). El método de la lista previa (Moskowitz, 1983) y la descripción entrecruzada (Helleman *et al.*, 1987; McEwan y Thomson, 1988; Gains y Thomson, 1990) son otros métodos para escoger atributos. El inconveniente de estos métodos es que se generan listas de atributos muy amplias. Por razones prácticas éstas listas deben reducirse siendo la reducción por consenso (Durán *et al.*, 1989; Hunter y Muir, 1993; Noronha *et al.*, 1995; González-Viñas *et al.*, 2001a) la técnica de aplicación más común.

Otro aspecto a tener en cuenta es la selección y preparación de los jueces (Costell, 1983; Sinesio *et al.*, 1990; Setser, 1994). Al aplicar escalas no estructuradas se puede emplear el análisis de varianza con el objetivo de identificar la significación estadística de las diferencias observadas. Por otro lado, se hace necesario el uso de técnicas de análisis estadístico multivariante (análisis de componentes principales) para conocer información acerca de las posibles relaciones existentes entre atributos diferentes, y una imagen de percepción global del alimento. Estas técnicas multivariantes permiten apreciar las diferencias globales entre muestras, considerando de forma conjunta la variación de todos los atributos analizados (Bieber y Smith, 1986; Piggott y Sharman, 1986; Oreskowich *et al.*, 1991).

## I.5.2.- ANÁLISIS SENSORIAL APLICADO AL QUESO.

Cada vez es más frecuente la aplicación del análisis sensorial a este derivado lácteo, siendo para ello necesario definir unos atributos que permitan un buen conocimiento organoléptico del queso de cara a realizar un control eficaz del origen geográfico y de la calidad que defina la peculiaridad del mismo frente a posibles imitaciones (Bertozzi y Panari, 1993).

Roberts y Vickers (1994), Hort *et al.* (1997b) y Wium y Qvist (1998) han publicado estudios en los cuales mediante curvas de regresión se consigue predecir el desarrollo del sabor del queso y su aceptabilidad a partir de índices químicos y atributos sensoriales del queso al inicio de la maduración. Se han detectado diferencias sensoriales entre quesos elaborados con leche pasteurizada y leche cruda (Mendia *et al.*, 1999; Ginzinger *et al.*, 1999), y se ha comprobado el efecto del período de lactación, alimentación del ganado y estación del año sobre las características sensoriales de los quesos (Rohm *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 1997; Jaros *et al.*, 1998; Buchín *et al.*, 1999), así como del tipo de cultivo iniciador (Ortigosa *et al.*, 1999) y composición del mismo (Macedo *et al.*, 2004) empleado en la elaboración del queso. Otros factores que afectan a las características sensoriales del queso son el tipo de coagulante ensayado, la microflora de la leche cruda y contaminante y la sal añadida.

Son varios los estudios que se han realizado en los últimos años acerca de la relación entre la composición química y las características físicas de distintos quesos. Uceda *et al.* (1994a), Tejada (2001) y Vioque (2002) han establecido una relación indirecta entre la humedad y la dureza del queso. Younis *et al.* (1991) han descrito una relación directa entre el contenido de proteínas y la dureza del queso. Tunick *et al.* (1991) y Kindstedt (1993) afirman que el aumento del contenido de grasa disminuye la dureza del queso. Pagliarini *et al.* (1997) detectaron entre varios lotes de quesos con contenidos de grasa desiguales características sensoriales muy diferentes. Kindstedt (1993) relaciona el valor pH de manera directa con la dureza del queso, aunque otros autores detectaron lo contrario (Rohm *et al.*, 1992). Otros autores detectaron una correlación significativa entre el pH y la cremosidad (Hort *et al.*, 1997b). El grado de proteólisis se ha relacionado de forma indirecta con la dureza (Rohm *et al.*, 1992; Uceda *et al.*, 1994a; Ustunol *et al.*, 1995; Tejada, 2001; Vioque, 2002).

## Introducción

Los quesos elaborados a partir de leche de vaca han sido los más estudiados respecto de sus características sensoriales. Así, hay estudios que establecen relaciones directas entre las propiedades sensoriales y la calidad para determinadas variedades italianas (Noël *et al.*, 1996, 1998; Zannoni y Pigonni, 1997; Corradine e Innocente, 1998) y se ha empleado el análisis sensorial para la diferenciación del queso Grana Padano de sus imitaciones (Zannoni *et al.*, 1994; Moio y Addeo, 1998). Bérodièr *et al.* (1997b) describieron 91 descriptores en el queso Comté. En queso Gruyère se ha estudiado la influencia de la temperatura y condiciones de salado en la formación de grietas y ojos durante la maduración (Grappin *et al.*, 1993) y la influencia de la microbiota nativa sobre el perfil sensorial (Demarigny *et al.*, 1997). En el queso Cheddar se ha estudiado la relación entre las características físicas, químicas y de textura (Hort, 1996), el uso de cultivos iniciadores (Midje *et al.*, 2000) y características del aroma y sabor (Murray y Delahunty, 2000a,b).

Además varios investigadores (Carminati, 1997; Muir *et al.*, 1995; Drake *et al.*, 1999) han desarrollado programas de colaboración interlaboratorial para tipificar, en base a sus características sensoriales, determinadas variedades de quesos como el Gruyère, Danish Blue, Gouda, Parmesano, Edam, Gorgonzola y Emmental.

Por otro lado, respecto a los quesos elaborados con leche de oveja existen pocos estudios a pesar de la gran variedad existente y de su importancia económica (Núñez *et al.*, 1986a). Este hecho puede explicarse por tratarse de variedades de ámbito local, de mínima producción y comercialización en el mercado, o de variedades severamente controladas por Denominaciones de Origen Protegidas en las cuales el análisis sensorial se emplea para el control de calidad del producto.

Dentro del análisis sensorial de los quesos de oveja de pasta dura y semidura, los estudios se han orientado a establecer métodos estandarizados de evaluación. Un ejemplo de ello son las guías editadas por el programa AIR2039/COST95 para evaluar la textura de este tipo de quesos (Ballesteros, 2002). Igualmente las guías diseñadas de caracterización olfato-gustativa de quesos de vaca (Bérodièr *et al.*, 1997a) se están adaptando a quesos elaborados a partir de leche de oveja. Dentro de los parámetros estudiados en el análisis sensorial de los quesos, como es el color (Rohm y Jaros, 1997a,b; Frau *et al.*, 1999), aroma y olor (Moio y Addeo, 1998; Mulet *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 1999; Fernández-García *et al.*, 2004), la textura puede ser el más importante en la valoración de la calidad. Debido a esto la metodología empleada en la valoración sensorial de la textura de quesos de pasta dura y semidura

## Introducción

elaborados a partir de leche de vaca ha sido elegida, con modificaciones, para el análisis de quesos de leche de oveja (Lavanchy *et al.*, 1993; Zannoni *et al.*, 1994).

Respecto a los quesos españoles elaborados con leche de oveja, el Idiazábal ha sido el más estudiado desde el punto de vista de sus características sensoriales (Bárcenas *et al.*, 1997, 1998a,b, 1999; Ordóñez *et al.*, 1998a). Vicente *et al.* (1992) evidenciaron diferencias en la textura, gusto, número y tamaño de los ojos al estudiar la relación existente entre el tipo de cuajo empleado y la adición de cultivos iniciadores sobre las características organolépticas de este tipo de queso. También se ha estudiado el efecto de la presencia de cultivos iniciadores y la pasteurización de la leche con respecto a los cambios organolépticos del queso Idiazábal (Pérez-Elortondo *et al.*, 1993a; Ordóñez, 1995; Mendia, 1998, Ortigosa *et al.*, 1999) y la influencia de la estación de producción y del ordeño (Mendia *et al.*, 2000a).

Sanjuán, (1992), Tejada (2001) y Vioque (2002) han aportado datos sobre características sensoriales de queso de Los Pedroches elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal fresco y liofilizado. También se han aportado datos sensoriales de quesos de esta misma variedad elaborados en diferentes condiciones de maduración (Carmona, 1994), conservados en aceite y a vacío (Gómez *et al.*, 1996; Vioque, 1997; Vioque *et al.*, 1999) y sometidos a un proceso de congelación durante su almacenamiento (Tejada, 1999a; Tejada *et al.*, 1999a, 2000, 2001b).

Se han realizado diversos trabajos de metodología sensorial y su posible aplicación a quesos amparados bajo la Denominación de Origen Protegida como el queso Manchego (Pérez-Elortondo *et al.*, 1999c; Bárcenas *et al.*, 1999). Además se han llevado a cabo estudios de correlación de parámetros químicos y atributos olfato-gustativos sobre variedades de queso de leche de oveja, cruda y pasteurizada, y grupos comerciales de quesos de pasta blanda, semiduros, Manchego y de “tipo Manchego” (González-Viñas *et al.*, 1999; 2001a). Muchos de los autores únicamente evalúan la intensidad y calidad del aroma y sabor, correlacionándolos fundamentalmente con parámetros físico-químicos y de textura (Núñez *et al.*, 1986b; Gaya *et al.*, 1990). En los últimos años se han aportado datos sobre características sensoriales de queso Manchego (Ballesteros, 2002) y se ha abordado el estudio de las características reológicas y sensoriales del queso Manchego (González-Viñas *et al.*, 2001b).

En los últimos años y debido a su objetividad y reproducibilidad se ha pretendido evaluar las características sensoriales del queso mediante el análisis instrumental,



## Introducción

bien por diversas técnicas cromatográficas, de destilación, etc. (Mentasti *et al.*, 1997; Moio y Addeo, 1998; Berger *et al.*, 1999; Escriche *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 1999; Mulet *et al.*, 1999; Thierry *et al.*, 1999) o mediante la nariz electrónica (Zannoni *et al.*, 1995; Mariaca y Bosset, 1997) para analizar la fracción volátil del queso con el objetivo de tratar de definir el aroma y olor del mismo, cualitativamente y cuantitativamente. Por espectrocolorimetría (Frau *et al.*, 1999) y por métodos de reflectancia (Rohm y Jaros, 1997a,b) se ha evaluado el color el queso. Sin embargo, los parámetros de textura del queso (dureza, elasticidad, adhesividad, cohesividad, etc) son los más medidos mediante técnicas instrumentales (Lane *et al.*, 1997; Lobato-Calleros *et al.*, 1997; Ibáñez *et al.*, 1998; Benedito *et al.*, 2000). Además se ha descrito una metodología para evaluar sensorialmente la textura de quesos de pasta semidura o dura, diferenciando tres grupos de características texturales (características de superficie, mecánicas y geométricas) (Lavanchy *et al.*, 1993). Kasprzak *et al.* (1994) y Hough *et al.* (1995) han demostrado la existencia de una alta relación entre la dureza determinada sensorialmente e instrumentalmente, aunque para otras variables la relación existente es escasa (Hort *et al.*, 1997a). Un estudio interlaboratorial europeo con varios tipos de queso determinó que muchos de los valores del análisis sensorial se relacionaban con los instrumentales (Noél *et al.*, 1998). Así, Drake *et al.* (1999) detectaron mediante el análisis multivariante una elevada relación entre los resultados instrumentales y sensoriales. Benedito *et al.* (2000) han observado una alta correlación entre las medidas instrumentales y sensoriales de la textura del queso Mahón.

## **I.6.- COAGULANTES.**

### **I.6.1.- ASPECTOS GENERALES.**

Desde hace aproximadamente 8.000 años se tienen datos acerca del empleo de enzimas en la industria láctea, principalmente en la fabricación del queso (Fox, 1993). Aunque son varias las proteasas que pueden producir la coagulación de la leche, algunas de ellas son poco específicas y demasiado proteolíticas pudiendo originar una reducción en el rendimiento quesero y en la calidad final del queso por proteolisis excesivas o atípicas que dan lugar a problemas de textura o de flavor. Hasta la

## Introducción

década de los 1950-1960 los coagulantes utilizados estaban preparados a base de proteinasas de origen animal y vegetal. Hoy en día se distinguen varios tipos de coagulantes:

1) *Coagulantes de origen animal*. De uso tradicional y extraídos del cuajar o cuarto estómago de rumiantes lactantes que suelen estar preparados como una mezcla natural de quimosina y pepsina. Debido a su mayor contenido en quimosina son más apreciados los de ternera, cordero y cabrito. También se han utilizado las pepsinas de buey, cerdo, oveja, cabra y pollo como coagulante animal (Folegatti *et al.*, 1997; Awad *et al.*, 1998). La quimosina pertenece al grupo de las proteasas aspárticas (anteriormente denominada proteasas ácidas). Proviene del precursor pre-pro-quimosina que a través de una serie de enlaces proteolíticos en la porción N-terminal se convierte en pro-quimosina, que es inactiva y está compuesta por 365 restos de aminoácidos. Mediante autocatálisis la pro-quimosina es convertida en una enzima activa a pH ácido. Durante este proceso de activación, a pH 4,5 se separan 42 restos de aminoácidos de la fracción N-terminal de la pro-quimosina. A pH 2 solamente se separan dos aminoácidos de la pro-quimosina y da lugar a una pseudoquimosina. Ambas fracciones pseudoquimosina y quimosina son enzimas coagulantes y por tanto enzimáticamente activas. La quimosina existe en forma de dos isoenzimas (A y B) diferenciándose únicamente en el resto aminoacídico 243, que en la forma A es ácido aspártico y en la forma B está ocupado por glicina. Ambas variantes alélicas se encuentran en las terneras de todo el mundo, aunque una ternera dada tendrá un solo alelo (bien como gen quimosina A o bien como gen quimosina B).

2) *Coagulantes microbianos*. Descubiertos en las décadas de los 1960-1970 a partir de diversas cepas de *Rhizomucor* (tradicionalmente denominado *Mucor*). Proteinasa obtenidas a partir de *Bacillus polymyxa*, *Endothia parasitica*, *Mucor miehei* y *Mucor pusillus*, han recibido nombres comerciales como emporasa, hanilasas, renilasas, suparen, etc. Pertenecen a la misma clase de proteasas que la quimosina, con una secuencia aminoacídica y estructura terciaria muy similares (Yun *et al.*, 1993; Ustunol y Zeckzer, 1996). Sin embargo, presentan algunos inconvenientes como su elevada termoestabilidad (problemas tecnológicos durante el procesado del suero y la elaboración de quesos de pasta cocida) y su poca especificidad, hidrolizando diversas fracciones caseínicas con la liberación de

### Introducción

péptidos amargos y apareciendo diferencias en la firmeza de la cuajada (Law, 1987; Trujillo *et al.*, 1994).

3) *Coagulantes de origen vegetal*. De aplicación restringida en ámbitos locales y en la elaboración artesanal o semiindustrial de quesos, son obtenidos a partir de hojas, flores, jugos o frutos de diversas especies vegetales tras un maceramiento en agua. La Orden de 20 de febrero de 1996 que modifica la Norma general de identidad y pureza para el cuajo y otros enzimas coagulantes de la leche destinados al mercado interior aprobada por la Orden de 14 de enero de 1988 (Anónimo, 1988), reconoce como coagulante de la leche en la elaboración de quesos a varias proteínas procedentes de la higuera (*Ficus carica*) y del cardo (*Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*) (Anónimo, 1996a). Además de estas dos, se han empleado extractos de papaya (*Carica papaya*), extractos de piña (*Ananas sativa*), extractos de semilla de *Ricinus communis* y extractos de "hierba col", obtenidos de la planta *Galium verum* y utilizados en la fabricación del queso Mató.

Se han desarrollado trabajos acerca del empleo de otras especies vegetales como coagulantes de la leche pero sin éxito ya que su baja proporción entre la actividad caseinolítica/proteolítica da lugar a la formación de numerosos péptidos amargos durante la maduración en ausencia de flora iniciadora y debido además a un rendimiento quesero bajo al poseer poca capacidad coagulante. Así, se han estudiado enzimas procedentes de la calabaza (*Benincasa cerifera*) (Gupta y Eskin, 1977), papaya (Cabezas *et al.*, 1981), manzana (*Calotropis procera*) (Ibiama y Griffiths, 1987; Mohamed y O'Connor, 1999), *Dieffenbachia maculata* (Padmanabhan *et al.*, 1993), piña (Cattaneo *et al.*, 1994) y de las frutas *Solanum dohium* (Yousif *et al.*, 1996) y *Opundia ficus-indica* (Pintado *et al.*, 2001). A partir de la *Centaurea calcitrapa*, planta que pertenece a la familia *Asteraceae*, Domingos *et al.* (1996) han aislado dos enzimas mediante métodos cromatográficos que poseen mayor actividad proteolítica que el cuajo animal y mayor especificidad sobre las caseínas de la leche de cabra y oveja. Por este motivo Tavaría *et al.* (1997) piensan en su empleo para la fabricación de quesos de pequeños rumiantes siempre y cuando sea necesaria una proteolisis elevada en los primeros estadios de la maduración.

En la orden de 20 de febrero de 1996 se definen los términos cuajo, coagulantes de la leche y quimosina. Ésta última se define como la enzima obtenida bien por extracción de los cuajares de rumiantes, procediendo posteriormente a la separación de la quimosina pura por métodos físico-químicos especiales, o bien por fermentación

## Introducción

a partir de un microorganismo modificado genéticamente, en el que se ha incorporado el gen responsable de la síntesis de quimosina, permitiéndose por tanto la fabricación de queso con quimosina transgénica. Exclusivamente se han autorizado, tras su evaluación por el Comité de expertos de alimentación de la FAO/OMS y el Comité Científico de la Alimentación Humana, a las cepas de *Kluyveromyces lactis* o *Aspergillus niger var. awamori* que contienen el gen de la proquimosina B de ternera y *Escherichia coli* k-12, que porta el gen de la proquimosina A. Tanto la escasez de cuajo de ternera como su alto precio en la década de los años 1970, que se agravó posteriormente con la aparición, y consiguiente sacrificio de numerosas vacas, de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), se solventaron cuando en 1990 se comenzó a comercializar la primera proteína transgénica animal que fue la quimosina recombinante. Se estima que más de la mitad de la quimosina utilizada en la industria quesera es recombinante (Fernández-Salguero *et al.*, 2003b).

Existen varios estudios acerca de la capacidad coagulante y actividad proteolítica de la quimosina recombinante (Ortiz de Apocada *et al.*, 1994; Yamashita *et al.*, 1994; Fox y Mcsweeney, 1996; Ustunol y Zecker, 1996; Reys *et al.*, 1997; Awad *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2000). Experimentalmente se ha empleado esta quimosina transgénica para la fabricación de quesos tipo Burgos e Hispánico (Medina *et al.*, 1992), queso Manchego (Núñez *et al.*, 1992; Picón *et al.*, 1994), queso Cheddar (Lane *et al.*, 1997), queso Feta (Kandarakis *et al.*, 1999) y queso Domiati (Mehanna *et al.*, 2002; Abdel-Kader, 2003), entre otros, sin que aparecieran diferencias significativas en las características reológicas y sensoriales de estos quesos con respecto al cuajo animal tradicional. Collin *et al.* (1997) han desarrollado métodos para detectar la quimosina transgénica, a través de una técnica ELISA que detecta proteínas contaminantes derivadas de los microorganismos o del medio de cultivo donde ocurre la fermentación.

### **I.6.2.- COAGULANTES VEGETALES: CYNARA SP.**

Desde la antigüedad en algunos países mediterráneos se emplea como coagulante de la leche extractos acuosos de las flores desecadas del cardo del género *Cynara* L. (*Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, *Cynara scolymus*). Según la traducción que D. Juan M. Álvarez de Sotomayor y Rubio hizo en 1824 del tratado de Agricultura de Columela "*De re rustica*", mencionaba el empleo de la flor de cardo

## Introducción

silvestre en la fabricación de quesos y también Don Miguel de Cervantes cita la adición de la flor de cardo en la elaboración del queso Manchego en su obra maestra “El Quijote” (Fernández-Salguero y Gómez, 1997).

En las regiones mediterráneas y macaronésicas (Madeira y Canarias) la especie *Cynara cardunculus* crece de forma espontánea. En años de escasez de *Cynara cardunculus* o supuestamente mezclada con esta se utiliza otra especie, que es más abundante, *Cynara humilis* (Fernández-Salguero, 1975; Pires *et al.*, 1994; Sanjuán *et al.*, 2002; Vioque *et al.*, 2000).

Se han empleado extractos acuosos crudos de flores desecadas de cardos silvestres pertenecientes a varias especies del género *Cynara* L. en la elaboración de quesos de oveja italianos, franceses, portugueses y españoles (Vieira de Sá y Barbosa, 1972; Fernández-Salguero, 1975; Barbosa *et al.*, 1976). En España se elaboran con *Cynara cardunculus* los quesos con denominación de origen de La Serena y Torta del Casar y las variedades de Los Pedroches, Montes de San Benito, Queso de Santa María de Guía (Fernández-Salguero *et al.*, 1991), Tronchón, Serrat y Tupi (Fernández-Salguero, 2005), así como en algunas variedades de queso de cabra (Zona de Zuheros y Cáceres). En Portugal se elaboran con *Cynara cardunculus* los quesos con denominación de origen Serra da Estrela, Serpa, Azeitao, Castelo Branco, Nisa y Évora, entre otros (Macedo *et al.*, 1993a).

Las flores del cardo *Cynara humilis* también se pueden emplear en la fabricación de quesos para coagular la leche. Martínez (1979) realizó estudios sobre la capacidad coagulante de *C. humilis* en leche en polvo reconstituida, Serrano (1979) estudio su actividad proteolítica en caseína entera ovina y Cabezas (1980) investigó sobre la difusión de las proteinasas del cardo en gel de agar y la estabilidad de las enzimas al calor y al valor pH. También se ha estudiado la inactivación térmica (Marcos *et al.*, 1980) y la estabilidad de las proteasas del cardo (Esteban *et al.*, 1982). Se ha investigado la calidad microbiológica de los extractos acuosos de los cardos *Cynara cardunculus* y *C. humilis* (Fernández-Salguero *et al.*, 1999). También se han estudiado las características físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales de quesos elaborados a partir de leche de oveja coagulada con *Cynara cardunculus* y con *C. cardunculus* y *C. humilis* (Sánchez, 1999; Vioque *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2001; Vioque, 2002).

De los cardos se extraen, además de las enzimas coagulantes, otras sustancias para fines diversos como uso culinario, producción de biomasa para la obtención de

## Introducción

energía y pulpa de papel (Foti *et al.*, 1993, 1999), biomasa fresca para alimentación animal y humana (Carjaville *et al.*, 1999), obtención de esencias en la preparación de bebidas alcohólicas (Oliaro, 1969) y precursores de sustancias medicamentosas (Kouba *et al.*, 1999).

Como no existe ningún tratamiento especial para las flores del cardo recolectadas, salvo la desecación natural, Martíns *et al.* (1996a,b) y Vioque (2002) han verificado que dependiendo del grado de secado de la flor aparecen diferencias en la capacidad coagulante. Macedo *et al.* (1993a), Cordeiro *et al.* (1994a) y Vioque (2002) han comprobado que también influyen la variedad y el estadio madurativo. Además, la temporada y el lote influyen en la composición química de los cardos (Barbosa, 1985).

Aunque las especies *Cynara cardunculus* y *C. humilis* presentan gran similitud, la actividad coagulante y enzimática de ambas especies de cardo son diferentes (Faro *et al.*, 1987; Pires *et al.*, 1994; Fernández-Salguero y Gómez, 1997). La primera especie de cardo posee una enzima muy similar a la quimosina y otra semejante a la pepsina, mientras que *Cynara humilis* sólo presenta un componente parecido a la quimosina (Faro *et al.*, 1992; Pires *et al.*, 1994). Se han purificado y caracterizado las proteasas presentes en las flores del cardo (Heimgartner *et al.*, 1990) identificándose tres proteasas aspárticas, denominadas "ciprosinas 1, 2 y 3" (Campos *et al.*, 1990; Faro, 1991; Cordeiro *et al.*, 1992). Estas proteinasas exhiben su máxima actividad a los valores pH de 5,1, 5,7 y 6,0. a diferentes temperaturas y bajo fuerzas iónicas equivalentes de 0,1 a 0,6 M (Faro *et al.*, 1992), por lo que se trata de proteasas ácidas. La ciprosina 3 es la más similar a la quimosina (Cordeiro *et al.*, 1992), con una elevada capacidad coagulante y una alta especificidad hidrolítica sobre las proteínas, menos en leche de vaca que en la de oveja.

Dos nuevas proteinasas aspárticas (cardosinas A y B) han sido purificadas y caracterizadas a partir de los estigmas del cardo *Cynara cardunculus* (Verissimo *et al.*, 1996) siendo productos de dos genes, diferentes aunque relacionados, que difieren significativamente de las denominadas ciprosinas (Ramalho-Santos *et al.*, 1996). Estructuralmente las cardosinas son glicoproteínas, con dos subunidades de glucosacáridos con un alto contenido en manosa y unidas por interacciones no covalentes, que se pueden destruir en condiciones de desnaturalización extremas (Heimgartner *et al.*, 1990; Faro *et al.*, 1995). Según Verissimo *et al.* (1995, 1996) la cardosina A estaría formada por dos subunidades de 31 kDa y 15 kDa de peso

## Introducción

molecular, y 34 kDa y 14 kDa para la cardosina B. Castanheira (1998) observó que la cardosina A se localiza fundamentalmente en la parte superior de los pistilos de las flores de *Cynara cardunculus* L. mientras que en la parte inferior predomina la cardosina B.

Se ha sugerido que se puede obtener la cipsosina pura por electroenfoque en tres isoenzimas con puntos isoeléctricos próximos (Cordeiro *et al.*, 1994b). Brodelius *et al.* (1996) han observado que las tres isoenzimas de la cipsosina 3 presentan diferentes propiedades catalíticas y se ha realizado la caracterización parcial de las tres isoenzimas de la cipsosina 3 (Brodelius *et al.*, 1995). Se ha obtenido cipsosina recombinante en levaduras y cloroplastos (Planta *et al.*, 2000) y se ha conseguido fabricar biomasa de células de flores de *Cynara cardunculus* L. mediante cultivo celular (Figueiredo *et al.*, 1987; Esquivel *et al.*, 1988; Lima-Costa *et al.*, 1988). Estas células presentan una similar actividad coagulante y proteolítica a la de las células de cardos silvestres, lo que constituye un potencial importante para la producción de proteasas en la elaboración de quesos.

Varios autores (Christen y Virasoro, 1935; Perreira de Mantos y Vieira de Sá, 1948, Vieira de Sá y Barbosa, 1972; Cabezas *et al.*, 1981; Barbosa, 1985, Sanjuán y Fernández-Salguero, 1994; Sanjuán, 1992; Tejada, 2001; Vioque, 2002, Tejada *et al.*, 2005) han destacado la temperatura, el valor pH, la concentración de enzima y la naturaleza del sustrato como los principales factores de la actividad coagulante del cardo. De todos estos factores el más destacado es la temperatura. La actividad proteolítica aumenta hasta los 70 °C, para luego disminuir hasta desaparecer a los 75 °C (Vieira de Sá y Barbosa, 1972). La temperatura de fabricación de la mayoría de las variedades de queso es de 28-30 °C, por debajo de la óptima de la enzima, 32 °C.

Se pensaba que esta cipsosina hidrolizaban la caseína  $\kappa$  en posición distinta de otras enzimas coagulantes (Vieira de Sá y Barbosa, 1972), con un mecanismo de actuación ambivalente, bien como endopeptidasas (Heimgartner *et al.*, 1990; Faro *et al.*, 1995) o como exopeptidasas con preferencia sobre las cadenas peptídicas con aminoácidos apolares (Faro *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios realizados con caseínas bovinas demostraron que la enzima escindía el enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la caseína  $\kappa$ , como sucede con otras enzimas coagulantes (Cordeiro *et al.*, 1992; Faro *et al.*, 1992; Macedo *et al.*, 1993b; Lamas *et al.*, 2001). Pires *et al.* (1994) concluyen que las diferencias observadas en quesos coagulados con cipsosinas no se deben a la acción de estas sobre la  $\kappa$ -caseína. Por otra parte, ocurre todo lo contrario en el caso

## Introducción

de las caseínas  $\alpha_{S1}$  y  $\alpha_{S2}$ . Respecto a la primera, las cipsosinas atacan las zonas voluminosas e hidrofóbicas, hidrolizando los enlaces péptidicos del segmento Ala<sub>163</sub>-Val<sub>167</sub> liberando péptidos potencialmente amargos (Pires *et al.*, 1994; Macedo y Malcata, 1997f). Además hidrolizan la caseína  $\alpha_{S2}$ , generalmente resistente a las proteinasas ácidas, a nivel de los enlaces Phe<sub>88</sub>-Tyr<sub>89</sub> y Tyr<sub>95</sub>-Leu<sub>96</sub>, produciendo un péptido amargo similar a un neuropéptido con actividad opioide. Las cipsosinas atacan en mayor medida que las quimosina a la  $\beta$ -caseína, a nivel de la región Ala<sub>189</sub>-Tyr<sub>190</sub> con la formación de varios péptidos amargos (Macedo *et al.*, 1993b). Macedo *et al.* (1999a,b) han utilizado técnicas de electroforesis capilar de zona para dilucidar la acción de estas proteasas sobre el carbono terminal de la  $\beta$ -caseína.

En diversos estudios para comprobar la diferencia entre la acción proteolítica de la cardosina A y B sobre la  $\alpha_{S1}$ -caseína bovina se ha observado que aunque ambas en un primer término hidrolizan los enlaces Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub>, Phe<sub>153</sub>-Phe<sub>154</sub>, Trp<sub>164</sub>-Trp<sub>165</sub>, además la cardosina B escinde el Phe<sub>150</sub>-Arg<sub>151</sub> (Ramalho-Santos *et al.*, 1996). Las dos cardosinas hidrolizan los enlaces Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> y Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub> de  $\kappa$  y  $\beta$ -caseína bovina.

Para unas mismas condiciones de pH las cipsosinas actúa más intensamente sobre el caseinato de cabra que en el de oveja. Una concentración de cloruro sódico del 5 % causa una fuerte disminución de la proteólisis de la caseína  $\alpha$  y  $\beta$ . Frecuentemente las cipsosinas provocan la escisión en Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> de la  $\kappa$ -caseína ovina y Lys<sub>116</sub>-Thr<sub>117</sub> de la  $\kappa$ -caseína caprina. Respecto a la caseína  $\beta$ , las cipsosinas actúan sobre los enlaces Leu<sub>127</sub>-Thr<sub>128</sub> y Leu<sub>190</sub>-Tyr<sub>191</sub> de la  $\beta$ -caseína ovina y sobre el Glu<sub>100</sub>-Thr<sub>101</sub>, Leu<sub>127</sub>-Thr<sub>128</sub>, Leu<sub>136</sub>-Pro<sub>137</sub> y Leu<sub>190</sub>-Tyr<sub>191</sub> en la caprina. La caseína  $\alpha_{S1}$  ovina es degradada a nivel de la Phe<sub>23</sub>-Val<sub>24</sub> y en el caso de la  $\alpha_{S1}$ -caseína de cabra es a nivel de los enlaces Phe<sub>23</sub>-Val<sub>24</sub>, Trp<sub>164</sub>-Tyr<sub>165</sub> y Tyr<sub>173</sub>-Thr<sub>174</sub>. Referente a la  $\alpha_{S2}$ -caseína, la de oveja es generalmente atacada por la cardosina a nivel de la Phe<sub>88</sub>-Tyr<sub>89</sub>, y la caprina a nivel Ser<sub>9</sub>-Ser<sub>10</sub>, Phe<sub>88</sub>-Tyr<sub>89</sub>, y Tyr<sub>179</sub>-Leu<sub>180</sub>. (Sousa y Malcata, 1998a).

Sousa y Malcata (1998b) han detectado diferencias en los péptidos producidos en quesos de oveja elaborados con cuajo animal con respecto a los quesos con coagulante vegetal. Así, en los primeros quesos se detectaron el  $\beta$ -(f164-\*) y  $\alpha_{S1}$ -(f120-191), mientras que los péptidos  $\beta$ -(f128-\*),  $\beta$ -(f166-\*),  $\beta$ -(f191-\*), y  $\alpha_{S1}$ -(f24-165) son consecuencia de la acción de *Cynara cardunculus*. También se han detectado diferencias en los péptidos producidos por *Cynara cardunculus* en quesos de oveja,



### Introducción

de cabra y de vaca (Sousa y Malcata, 2002). Se han realizado estudios acerca de la composición en ácidos grasos (Sanjuán *et al.*, 1995, Tejada *et al.*, 2003a) y en elementos minerales (Sanjuán *et al.*, 1998, Tejada, 2001) en quesos de Los Pedroches coagulados con cuajo animal y coagulante vegetal.

Silva y Malcata (1998) han observado que aunque los porcentajes de degradación de las caseínas  $\alpha_s$  y  $\beta$  bajo la acción de la cardosina A son 46 y 76 % respectivamente, cuando la enzima actúa sobre los dos sustratos de manera aislada estos porcentajes se elevan hasta 67 % para la  $\alpha_s$ -caseína y 76 % para la  $\beta$ -caseína. Por otro lado la caseína  $\alpha_s$  se muestra más sensible que la  $\beta$ -caseína a la acción de la cardosina B, siendo los enlaces Trp<sub>164</sub>-Tyr<sub>165</sub> y el Leu<sub>165</sub>-Ser<sub>166</sub> respectivamente los más susceptibles a su ataque (Silva y Malcata, 1999).

### I.6.3.- UTILIZACIÓN DE *CYNARA CARDUNCULUS* EN LA ELABORACIÓN DEL QUESO.

El uso de este tipo de coagulante vegetal suele estar restringido a la fabricación artesanal de quesos en comarcas muy delimitadas y generalmente empleando la especie *Cynara cardunculus*, aunque también se emplea la especie *Cynara humilis*, bien como sustituto del anterior o mezclado con él (Fernández-Salguero y Sanjuán, 1999). Este coagulante vegetal suele utilizarse como extracto acuoso crudo, obtenido por maceración de las flores desecadas del cardo. Picón *et al.* (1996, 1997) han ensayado el encapsulamiento en liposomas de las enzimas del cardo en la elaboración de queso Manchego. Actualmente se está estudiando el efecto de la mezcla de *Cyara cardunculus* y cuajo animal, en diversas proporciones, sobre las características bioquímicas, físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de quesos de oveja tipo Manchego (Galán, 2005).

El mayor inconveniente del empleo de las flores desecadas del cardo *Cynara cardunculus* como coagulante es la escasa estandarización de las características de los quesos elaborados con ellas, que está relacionado con la forma y el momento de recolección, la manipulación y el almacenamiento de las flores. Podemos encontrar diferente capacidad coagulante en flores recolectadas en diversos estadios de maduración, regiones geográficas y temporadas. Así, durante la recolección además de *Cynara cardunculus* y *C. humilis* se puede coger otras especies de cardo de

## Introducción

aparición similar como *Cynara algarbiensis*, *Cynara baetica*, *Silybum marianum*, *Centaurea calcitrapa*, *Ptilostemon hispánicus*, etc. que presentan una actividad coagulante diferente a las primeras e incluso, en algunas especies, nula. Además se dificulta la estandarización de la cantidad de enzima que se adiciona a la leche por las impurezas (brácteas, restos de hojas, etc.) que contienen las flores desecadas. Durante la recolección y el almacenamiento una incorrecta manipulación hace que se puedan alterar. El contenido en humedad de las flores varía según las condiciones climáticas externas y consecuentemente se modifica el tiempo de coagulación al haber añadido diferentes concentraciones de enzimas. Por otro lado, esa humedad relativamente elevada puede originar una contaminación fúngica, que se traduzca en una alteración del poder coagulante. Así se han encontrado unos recuentos microbianos elevados en los extractos acuosos de *Cynara cardunculus* y *C. humilis* (Fernández-Salguero *et al.*, 1999), destacando los recuentos medios de enterobacterias, superiores a  $1 \times 10^5$  ufc/ml.

Como alternativa a la utilización de los extractos acuosos crudos de las flores del cardo se comercializa el coagulante vegetal en forma líquida adicionado de un conservante. Esta presentación comercial en forma líquida se encuentra como coagulante vegetal solamente o mezclado con cuajo animal. También, como alternativa a los extractos acuosos crudos y al coagulante vegetal líquido comercial, se han patentado las enzimas coagulantes liofilizadas a partir de extractos acuosos crudos de las flores desecadas del cardo (Fernández-Salguero *et al.*, 2003a). Se trata de un producto cuya presentación es en forma de polvo, que no contiene gérmenes contaminantes, perfectamente estandarizable, soluble en agua y estable a temperatura ambiente y que se puede adicionar directamente a la leche para su coagulación (Tejada, 2001).

Lo mismo que la ingeniería genética solventó los problemas de la utilización y comercialización del cuajo animal mediante la producción de quimosina recombinante, en el caso de la cipsosina del cardo *Cynara cardunculus* también se ha patentado su obtención en forma recombinante (Planta *et al.*, 2000) y recientemente se ha comprobado su idoneidad en la producción de quesos de oveja (Fernández-Salguero *et al.*, 2003b).

La utilización del coagulante vegetal en sus diferentes formas de presentación en la elaboración de muchas variedades de queso está basada en la mayor calidad organoléptica de los quesos elaborados con este coagulante que se traduce en la

## Introducción

apreciación de una textura más fina, una mayor untuosidad en la degustación y una fortificación del aroma y sabor sin la aparición de sabores amargos (Tejada, 2001; Vioque, 2002; Fernández-Salguero *et al.*, 2004) y en la posibilidad de obtención de los quesos en “tortas” para untar, como sucede con parte de la producción de los quesos extremeños con Denominación de Origen Protegida “Torta del Casar” y de “La Serena”.

Finalmente señalar que el coagulante vegetal procedente del cardo *Cynara cardunculus* se está utilizando en el creciente mercado de los quesos ecológicos y también estos quesos pueden ser consumidos por los lactovegetarianos y además cumplen las especificaciones Kosher y Halal (Fernández-Salguero *et al.*, 2003a).

## **I.7.- QUESOS DE OVEJA.**

Los quesos de oveja deben sus características a la composición de la leche de partida. Por término medio se obtiene el doble de queso con leche de oveja que con leche de vaca para una misma cantidad de leche inicial. Esto es debido a la riqueza en componentes lecheros, proteínas y grasa, de la leche ovina. Además los quesos fabricados con leche de oveja presentan una aroma y sabor especial y apreciado, producido por el olor y gusto característico de la leche de estos pequeños rumiantes. En líneas generales, los mismos criterios empleados para clasificar los quesos se pueden aplicar a los quesos de oveja (porcentaje de grasa sobre el extracto seco, porcentaje de humedad, tiempo y proceso de maduración, materia prima y sistema de producción).

En 1990 el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación recogía los siguientes queso de oveja en el “Catálogo de los Quesos de España” (Anónimo, 1990): Ansó-Hecho, La Bureba, Cáceres, Calahorra, Castellano, Grazalema, Idiazábal, Mallorquín, Manchego, Oropesa, de Los Pedroches, Roncal, de La Serena, Serrat, Torta del Casar y Zamorano. Aparte, otros quesos de oveja no recogidos en este catálogo son el queso de Aragón, de Cervera, de Cincho, Gorbea, de Huelva (también llamado de los Montes de San Benito), Urbasa y queso del Andévalo (Fernández-Salguero y Gómez, 1997). La fabricación artesanal, parcial o totalmente, es el denominador común de todos estos tipos de quesos, que el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación propuso a la Unión Europea en 1994 para optar a la

## Introducción

denominación de tradicionales. Algunas de estas variedades artesanales han sido objeto de estudio como es el caso del queso de Grazalema, Calahorra y Montes de San Benito, entre otras (Fernández-Salguero *et al.*, 1995; Fernández-Salguero y Gómez, 1997, Gómez *et al.*, 1998).

Aunque la mayor parte de los quesos producidos en España se elaboran en forma industrial con leche pasteurizada, sobre todo en las zonas de Castilla La Mancha y Castilla León (variedades Manchego, Castellano y Zamorano) y Navarra (variedad Roncal o Idiazábal), también se obtienen bastantes variedades de quesos de oveja de manera artesanal, en quesería ubicadas en comarcas donde impera la ganadería de razas autóctonas criadas semiextensivas o extensivas, fundamentalmente de Andalucía y Extremadura.

En Extremadura cuyos quesos artesanos se producen en industrias queseras legalizadas con su correspondiente número de registro sanitario y que han desarrollado normativas legislativas autonómicas para proteger y promocionar sus quesos e incluso celebran ferias y fiestas anuales del queso (Fernández-Salguero y Gómez, 1997), ha dado como fruto que los quesos de oveja Torta del Casar y La Serena tengan reconocida la Denominación de Origen Protegida, mientras que la falta de apoyo legislativo en Andalucía hace que aún no exista queso alguno con Denominación de Origen.

Generalmente el proceso de fabricación artesano presenta una serie de características que lo diferencian de la producción industrial, como puede ser: empleo de una cantidad limitada de leche frecuentemente procedente de ovejas, de raza autóctona, de la propia explotación o vecinas, ausencia de tratamiento térmico previo a la leche de partida, fabricaciones en instalaciones rudimentarias y de carácter estacional, utilización de coagulantes naturales de origen animal o vegetal y maduración en las propias salas dentro de la explotación.

La Asociación de queseros artesanos exige el cumplimiento de una serie de características para considerar la elaboración quesera “artesana” (Fernández-Salguero y Gómez, 1997):

- Utilización de leche, preferentemente cruda, procedente de los animales de la propia explotación, o de explotaciones vecinas del mismo municipio o de municipios limítrofes, y que estas ganaderías cumplan los planes de

## Introducción

saneamientos exigibles por la autoridad veterinaria competente (Brucelosis, Tuberculosis, etc.).

- Una producción diaria máxima de 500 litros de leche/persona que trabaje en la quesería, aunque esta cifra se duplica en el caso de cooperativas ganaderas, sociedades de transformación, etc.
- Elaboración quesera utilizando productos naturales y mediante procedimientos compatibles y respetuosos con el medio ambiente, es decir, estará prohibido el empleo de ciertos aditivos de forma continuada, aunque estén autorizados (p.e. antibutíricos, lisozima, etc).
- Poseer el correspondiente Registro Sanitario y cumplir toda la legislación vigente con respecto a la producción, comercialización y transformación.

Hoy en día y a pesar de unas características organolépticas más apreciadas, y de desarrollar un flavor más intenso (Sousa y Malcata, 1996a). Algunos países de la Unión Europea se muestran reacios a comercializar con quesos elaborados con leche cruda por motivos de seguridad alimentaria. En este sentido, países como Alemania, Holanda y Suiza que mayoritariamente emplean leche de vaca se diferencian de países mediterráneos como Grecia, Italia y España que emplean leche de pequeños rumiantes. Prácticamente toda la leche de oveja se emplea para la producción de queso.

Uno de los principales problemas de la fabricación quesera es la estacionalidad de la producción lechera del sector ovino. Con objeto de regular el mercado evitando la formación de excedentes en determinadas épocas del año y de déficit en otras, se ha realizado diferentes estudios acerca de métodos de conservación que no modifiquen sensiblemente las características iniciales del queso. En queso madurado de Los Pedroches se ha estudiado el efecto la congelación sobre las características microbiológicas (Sánchez *et al.*, 1998a,b), físico-químicas, bioquímicas (Tejada *et al.*, 2002, 2003b) y sensoriales (Tejada *et al.*, 2000). Además, en esta misma variedad de queso, se ha estudiado la influencia del envasado en aceite y a vacío y en película plástica sobre las características físico-químicas, microbiológicas y organolépticas (Gómez *et al.*, 1996; Vioque *et al.*, 1997; Vioque *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2000). En queso tipo Manchego también se han desarrollado estudios acerca de las consecuencias del almacenamiento en congelación sobre los parámetros bioquímicos, físico-químicos, microbiológicos y sensoriales de quesos con largos

## Introducción

períodos de maduración (Prados *et al.*, 2002a,b; Fernández-Salguero *et al.*, 2003c; Prados *et al.*, 2004) y en aceite de oliva (Poveda *et al.*, 1999a).

Aunque las denominaciones de origen se establecieron con la finalidad de proteger los productos tradicionales (Bertozzi y Panari, 1993), en la mayoría de los casos no están reconocidas de manera universal (Núñez *et al.*, 1989) El reglamento 2081/92 reguló la identidad de los productos alimenticios agrupándolos en las denominaciones de “Indicación Geográfica Protegida” y “Denominación de Origen Protegida”. Este último concepto coincide con la “Denominación de Origen” de la legislación alimentaria española para quesos y otros productos.







## III. - PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS





## II.- PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.

Las enzimas presentes en las flores del cardo *Cynara cardunculus* se han utilizado desde la antigüedad en la coagulación de la leche durante el proceso de elaboración de quesos. Como hemos señalado anteriormente, en la actualidad existen muchas variedades de quesos de oveja españoles y portugueses que se elaboran utilizando los extractos acuosos crudos de las flores desecadas del cardo. Este coagulante vegetal le imprime a los quesos unas características organolépticas que los hace muy apreciados por el consumidor. También permite la obtención de quesos “tipo torta”, su utilización en el mercado ecológico y en el de los lactovegetarianos y también cumple las especificaciones Kosher y Halal. Sin embargo, la preparación actual de los extractos acuosos no cumple las mínimas normas de higiene y sanidad exigible a un ingrediente alimentario. Aunque se tolera la utilización de estos extractos, se comercializan sin el correspondiente Registro Sanitario ya que como se ha comprobado en nuestro grupo del Plan Andaluz de Investigación AGR 120 (Fernández-Salguero, *et al.*, 1999), contiene altos recuentos de gérmenes viables totales ( $> 5 \log \text{ ufc/ml}$ ), así como elevadas tasas de enterobacteriáceas ( $> 5 \log$  de  $\text{ufc/ml}$ ) y de coliformes ( $> 3 \log \text{ ufc/ml}$ ). También la utilización de las flores desecadas directamente no permite una correcta estandarización de la cantidad de enzima que se adiciona a la leche.

Como alternativa a la utilización de estos extractos acuosos se planteó la obtención de las enzimas liofilizadas como coagulante vegetal en polvo que ha sido patentado (Fernández-Salguero *et al.*, 2003a). Se ha demostrado la validez y utilidad de estas cipsosinas liofilizadas en quesos de oveja de carácter artesanal y de formato pequeño como es el queso de Los Pedroches (Tejada, 2001). Al objeto de comprobar igualmente la validez y utilidad de dicho coagulante vegetal en polvo en un queso de oveja de mayor formato, con un periodo de maduración más prolongado y de mayor trascendencia en el mercado español se ha abordado en este trabajo la elaboración de lotes de queso “tipo Manchego”. Puesto que tanto el queso Manchego y Zamorano con DOPs como el queso de similar formato (denominado tipo Manchego) se elaboran casi exclusivamente con cuajo animal, en esta memoria se aborda el estudio comparativo de las características químicas, físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales en lotes de quesos coagulados con quimosina y con el coagulante vegetal liofilizado.

### Planteamiento y Objetivos

En un intento de solventar los problemas derivados de la recogida de las flores del cardo silvestre *C. cardunculus* (contaminadas, en muchas ocasiones, con otras especies del género *Cynara* L.), así como los derivados de la comercialización y almacenamiento de dichas flores, se planteó, hace unos años, en un proyecto europeo en que participaba nuestro Grupo, junto a otros de diferentes países, la obtención de cipsosina transgénica. Así al igual que se consiguió la quimosina recombinante en 1990, se aisló el gen responsable de la síntesis de la cipsosina 3 a partir de las flores de *C. cardunculus* y se introdujo en cloroplastos y en levaduras para que elaboraran dicha enzima (Heimgartner *et al.*, 1990, Cordeiro *et al.*, 1994a; Brodelius *et al.*, 1995) que posteriormente se ha patentado (Planta, *et al.*, 2000). La aplicación tecnológica de esta enzima recombinante se ha hecho por primera vez en la elaboración de quesos de oveja (Fernández-Salguero, *et al.*, 2003b), presentándose en este trabajo los resultados del estudio comparativo de quesos tipo Manchego elaborados con quimosina y con cipsosina recombinante.

### III. - MATERIAL Y MÉTODOS



## **III.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **III.1.- MATERIAL.**

#### **III.1.1.- MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO.**

El equipo instrumental empleado es el que se describe a continuación, clasificándose en el utilizado para técnicas físico-químicas y el empleado en técnicas microbiológicas. Por otro lado, el equipo instrumental específico de técnicas analíticas concretas como espectrofotometría de absorción atómica y cromatografía de gases serán descritos en el momento en que se aborden las mismas. Además se utilizó una amplia gama de material fungible de uso común en laboratorio (matraces erlenmeyer, probetas, buretas, matraces aforados, pipetas, vasos de precipitado, etc.) para el desarrollo de los análisis realizados en este trabajo.

##### **III.1.1.1.- Análisis físico-químico.**

Los productos químicos empleados fueron en su mayoría Panreac de calidad reactivo p.a. o químicamente puros y las soluciones acuosas, salvo en los casos que se indique lo contrario, fueron preparadas con agua destilada.

- Agitador de tubos **Ika-Vibro-fix**.
- Agitador magnético **P-Selecta Agimatic 243**.
- Agitador vibrador **Heidolph DSG 304**.
- Arcón congelador **Lieb-Herr**.
- Balanza analítica **Metler Toledo PB 3002** y **Metler H 10 TW**, según el grado de precisión exigido.
- Balanza electrónica de precisión **Cobos M-200-CS H**.
- Baño termostático **P-Selecta Digiterm** mod. 3000542 con fluctuación térmica de  $\pm 1$  °C.
- Baño termostático **B-Braun Thermomix 1441**.
- Batería de digestión **System 6 1007 Digester Tecator**.



### Material y Métodos

- Batería Microkjeldahl **Electrotherm** con 6 mantas calefactoras provistas de regulador individual de temperatura.
- Bureta electrónica de 50 ml **Digitrate Jencons**.
- Cámara climática de maduración **ASL B3-400**.
- Campana de flujo **Flowtronic Burdinola ST 1500**.
- Centrifuga **Gerber- Lacta**.
- Centrifuga **P-Selecta Centromix** con tacómetro incorporado.
- Centrifuga refrigerada **Lactofuge 400 R. Heraeus**.
- Desionizador sistema **Optimun-Maxima Elga Pure Water** provisto de cartuchos Elgastat LC-111.
- Destilador de agua **Elgastat Opción 3 Elga**, con depósito de 75 litros Reservoir Elga.
- Espectrofotómetro **Shimadzu UV/VIS 1700**.
- Estufa para desecación por convección natural **P-Selecta** mod. Conterm 2000210 con 80 litros de capacidad y  $\pm 1,6$  % de homogeneidad.
- Frigorífico **Crolls**.
- Higrómetro de punto de rocío CX-1 suministrado por **Decagon Devices, Inc.** Pullman, WA, USA.
- Homogeneizadora Omnimixer **Heidolph**.
- Horno de mufla digitalizado con pirómetro **P-Selecta Selec-Horn**.
- Liofilizador **Thermo Savant ModulyoD Freeze Dryer** con bomba **Salvant VLP200**.
- pH-metro digital **Beckman 3500** con electrodo combinado.
- Picadora **Moulinex 320 MX**.
- Placas calefactoras **P-Selecta Combimax 3002302**, para temperaturas de hasta 400 °C con regulador electrónico de energía de calefacción.
- Unidad de destilación **Pro-Nitro P-Selecta**.

#### **III.1.1.2.- Análisis microbiológico.**

La mayor parte de los medios de cultivo y suplementos empleados en el presente trabajo fueron Oxoid y Merck. Para la elaboración de los medios de cultivo se empleó agua destilada y las soluciones acuosas se elaboraron en agua destilada o desionizada, según el caso. Aparte se utilizó una extensa gama de material fungible de uso común en laboratorios de microbiología y el siguiente equipo instrumental:

- Autoclave **P-Selecta Autotester 437 G**.
- Campana de flujo laminar **Burdinola AV-100**.
- Cronómetro analógico **Dolmy**.
- Estufas de cultivo **P-Selecta** de fluctuación térmica  $\pm 1$  °C y estufa de CO<sub>2</sub> **Incubator CO<sub>2</sub>** de fluctuación térmica  $\pm 3$  °C.
- Homogeneizador **Blander Stomacher 400**.
- Pipeta automática **Nichiryo Nichiper 5000DG** (10 –100  $\mu$ l) y **Biochit Proline** (200-1000  $\mu$ l).
- Placas calefactoras magnéticas **P-Selecta Univeba 400** y **P-Selecta Multimatic-5N**.

### III.1.2.- MATERIAL EXPERIMENTAL.

#### III.1.2.1.- Elaboración del queso.

En una quesería de la dehesa “Las Tobosas” ubicada en el término municipal de Belálcazar, en el Valle de los Pedroches, en la zona norte de la provincia de Córdoba, se elaboraron 10 lotes de quesos, que fueron objeto de estudio en la presente memoria.

Se emplearon tres agentes coagulantes diferentes en la elaboración de los lotes de quesos:

- Cuajo animal Chr Hansen´s suministrado por NaturenTM (80 % quimosina y 20 % pepsina) con una fuerza de 550 u.c.
- Coagulante vegetal liofilizado obtenido a partir de las flores de cardos silvestres de la especie *Cynara cardunculus*.
- Ciprosoina 3 recombinante obtenida mediante ingeniería genética.

Los quesos fueron elaborados a partir de cuatro partidas de leche cruda de ovejas merinas durante el período 2000-2003. Las tres primeras partidas de leche se emplearon, cada una, en la fabricación de dos lotes de queso, uno coagulado con cuajo animal y otro elaborado con coagulante vegetal liofilizado. Con la cuarta partida de leche se fabricaron cuatro lotes de quesos, dos coagulados con cuajo animal y dos obtenidos mediante ciprosoina recombinante.

### Material y Métodos

El cultivo iniciador utilizado fue un cultivo comercial mixto de acción directa “Ezal®” suministrado por Rhodia, S.A. para la elaboración de quesos de oveja. Se presenta liofilizado en sobres a vacío y está compuesto por las siguientes bacterias aerobias mesófilas: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*.

Los quesos fueron elaborados siguiendo la metodología de fabricación del queso Manchego, procurando idénticas condiciones en todas las partidas elaboradas. La leche de oveja depositada en la cuba de elaboración fue calentada hasta los 32 °C (temperatura óptima para la acción de las enzimas coagulantes) junto con el cultivo iniciador, cloruro de calcio y lisozima. Acto seguido se adicionó, según el lote, el cuajo animal (a concentración de 2-2.5 gr/100 litros de leche), el coagulante vegetal liofilizado disuelto en agua destilada (a razón de 16-18 gr/100 litros de leche de oveja), y la cipsosina recombinante en solución. Los tiempos medios de coagulación fueron 48 minutos para el cuajo animal y 55 minutos para el coagulante vegetal liofilizado y para la cipsosina recombinante.

Tras la coagulación mixta (por la acidificación causada por la acción de los cultivos iniciadores y la acción de los coagulantes añadidos) se procedió al corte o rotura en granos de la cuajada formada mediante “liras”. Después se procedió a un recalentamiento de la leche a 38 °C y agitación, para iniciar la fase de desuerado, durante 35 minutos, aproximadamente. A continuación el contenido de la cuba se pasó a una mesa donde se realizó un primer prensado con la ayuda de una prensa de aire comprimido y se cortó, con ayuda de un molde metálico, la cuajada en los trozos que iban a constituir los futuros quesos. Las piezas cortadas se colocaron en moldes de plástico recubiertos con paños y se dispusieron varias horas en la prensa hidráulica para completar el desuerado.

Una vez elaborados los quesos se pasaron a una salmuera (concentración de ClNa del 18 %) durante 24 horas y a continuación se almacenaron en un cámara de oreo a 12 °C y 80 % de humedad relativa durante 72 horas.

Tras el oreo las piezas fueron sometidas a un tratamiento por inmersión en un líquido mezcla de polietileno de vinilo (película plástica para mejora aspecto del producto final) y sorbato potásico (antifúngico). A continuación los quesos fueron trasladados en neveras isoterma al laboratorio donde maduraron en una cámara climática ASL.B-3-400 durante 120 ó 180 días, según el lote, en condiciones controladas a una temperatura de 11 °C y una humedad relativa de 85 %. Se empleó

un queso de cada lote para su análisis bioquímico, físico-químico y microbiológico a los 2, 15, 30, 60, 90 y 120 días de maduración. En el caso de las tres primeras partidas de leche, coaguladas con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, además se realizó un posterior control a los 180 días de maduración y un análisis sensorial a partir de los dos meses de maduración.

### **III.1.2.2.- Obtención de los extractos de flores liofilizados.**

Los extractos acuosos de las flores del cardo se obtuvieron por maceración de flores de la especie *Cynara cardunculus* durante 24 horas a temperatura ambiente en una relación de 1,5 g/10 ml. El extracto se filtró y se distribuyeron aproximadamente 60 ml en placas de vidrio de gran diámetro para su posterior congelación a una temperatura de  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Los extractos congelados se sometieron a un proceso de desecación al vacío mediante sublimación o liofilización en las siguientes condiciones: presión de la cámara 4-13 Pa, temperatura del condensador ( $-30-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y tiempo de liofilización de 48 horas (Fernández-Salguero *et al.*, 2003a). El polvo liofilizado obtenido se envasó en botes de cierre hermético y se conservó en congelación a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **III.1.2.3.- Obtención de la cipsosina recombinante.**

La obtención de la cipsosina 3 recombinante empleadas en la elaboración de 4 lotes de quesos del presente trabajo se enmarcó dentro de un Trabajo de Investigación presentado a la Unión Europea con el título “**Large scale production of a new milk-clotting enzyme (cyprosin) of plant origin and its evaluation for use in cheese industry**” con participación de grupos de investigación de Bioquímica y Biología Celular como la Universidad de Lisboa (Portugal) encargados del aspecto básico de obtención de la enzima y de grupos de Tecnología de los Alimentos, como el nuestro, encargados de su aplicación práctica en la industria quesera. En este sentido, nuestro grupo de investigación AGR 120 del Plan Andaluz de Investigación ensayó por primera vez la cipsosina recombinante en la elaboración de quesos de oveja (Fernández-Salguero *et al.*, 2003b).

El proceso de obtención de la cipsosina recombinante, que ha sido descrito previamente (Heimgartner *et al.*, 1990; Brodelius *et al.*, 1995; Cordeiro *et al.*, 1994a,b) patentado por Planta *et al.* (2000) básicamente consiste en extraer el gen que codifica

la síntesis de la enzima a partir de las flores del cardo *Cynara cardunculus* e introducirlo en levaduras o cloroplastos, que se multiplican y desarrollan la cipsosina.

La cipsosina recombinante nos fue facilitada para su ensayo experimental por el grupo de investigación que dirige la profesora M.S. Pais del departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Lisboa (Portugal).

#### **III.1.2.4.- Preparación de las muestras analíticas.**

La preparación de las muestras se realizó de acuerdo con la norma UNE 34 105 hl (1969). Tras la toma de muestras para los análisis microbiológicos se realizaron, con la ayuda de un cuchillo de hoja puntiaguda, dos cortes radiales convergentes al centro del queso para conseguir un sector que, tras ser desprovisto de la corteza superficial no consumible, alcance un peso superior a 250 g. Posteriormente el producto se preparó adecuadamente para la realización del análisis sensorial. A continuación se trituró con ayuda de la picadora y se depositaron en botes de plástico de cierre hermético, obteniéndose de esta forma las muestras para el análisis físico-químico, de donde se obtuvieron las alícuotas correspondientes a cada tipo de análisis

Los parámetros inmediatos  $a_w$ , pH, humedad y contenido en ácido láctico fueron los primeros en determinarse. Posteriormente el resto de la muestra se presionó adecuadamente en el interior del envase para evitar al máximo los espacios de aire que pudieran provocar una pérdida de humedad en el producto. Los botes de muestra se conservaron en arcón congelador a temperatura de  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  para realizar los análisis no inmediatos y disponer de muestras de reserva. Todos los análisis se realizaron por duplicado, siendo los resultados media aritmética de los mismos.

## **III.2.- MÉTODOS.**

### **III.2.1.- DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.**

#### **III.2.1.1.- Actividad de agua ( $a_w$ ).**

##### *Fundamento*

Se utilizó un higrómetro de punto de rocío Decagon Devices CX-1. El aparato consta de una cámara con un espejo y un ventilador que enfría el aire y lo hace circular por la superficie de la muestra a analizar. El aire enfriado por el ventilador se condensa depositándose en el espejo. El higrómetro determina la temperatura de condensación del vapor de agua, que está directamente relacionado con la  $a_w$  de la muestra. El higrómetro presenta un microprocesador que controla la formación del condensado y mide la temperatura exacta de condensación, con una precisión de 0,003 unidades, en el intervalo de 0,03 a 1,00 unidades.

##### *Procedimiento*

Las muestras de queso son homogeneizadas y colocadas a modo de fina capa en cápsulas de plástico cubriendo totalmente el fondo. Las cápsulas se cierran y se dejan atemperar hasta alcanzar aproximadamente 20 °C. Posteriormente las cápsulas destapadas se depositan individualmente en la cámara de medición del higrómetro para la lectura digital de la  $a_w$  y de la temperatura, que se obtiene normalmente a los 2 ó 3 minutos.

#### **III.2.1.2.- pH.**

Se realizó una determinación potenciométrica introduciendo el electrodo combinado del pH-metro en un homogeneizado de queso y mediante lectura directa.

## III.2.2.- PARÁMETROS DE COMPOSICIÓN QUÍMICA.

### III.2.2.1.- Humedad.

La humedad se determinó por desecación en estufa de aire caliente ( $105 \pm 1$  °C) hasta peso constante (British Standards Institution, B.S. 770, 1963), siguiendo las indicaciones de la técnica descrita por Kosikowski y Mistry (1997b).

### III.2.2.2.- Grasa.

Se cuantificó por el método Gerber según describe la Netherland Standard NEN 3059 (1969) empleándose el butirómetro de Van Gulik.

### III.2.2.3.- Proteína.

Se obtuvo multiplicando el nitrógeno total por 6,38, determinado según el método Kjeldahl (AOAC, 1990).

### III.2.2.4.- Cenizas.

El contenido en cenizas se determinó al incinerar la muestra en un horno de mufla provisto de pirómetro a temperatura no superior a 550 °C (AOAC, 1990).

### III.2.2.5.- Cloruro Sódico.

Los cloruros totales se determinaron siguiendo el método de Volhard modificado, según las indicaciones de Kosikowski (1970) y Fernández-Salguero (1975). Se añadieron a la muestra después de la mineralización con ácido nítrico y la oxidación simultánea con permanganato potásico, 2 ml de nitrobenzeno con objeto de eliminar las fases de decantación, filtración y ajuste de volumen digerido inicial. Finalmente se tituló con sulfocianuro potásico 0,1 N, utilizando sulfato amónico-férrico en solución saturada.

### **III.2.2.6.- Acidez titulable.**

La acidez expresada como ácido láctico, se determinó de acuerdo con las indicaciones de la AOAC (1990), realizando la titulación con NaOH 0,1 N y fenoftaleína como indicador.

### **III.2.3.- DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES NITROGENADOS.**

Para la determinación de los compuestos nitrogenados se utilizaron los extractos de quesos que se describen en el fraccionamiento seguido en el Cuadro 8 (Fernández-Salguero, 1975; Fernández-Salguero *et al.*, 1989; Carmona, *et al.*, 1999).

#### **III.2.3.1.- Nitrógeno soluble (NS).**

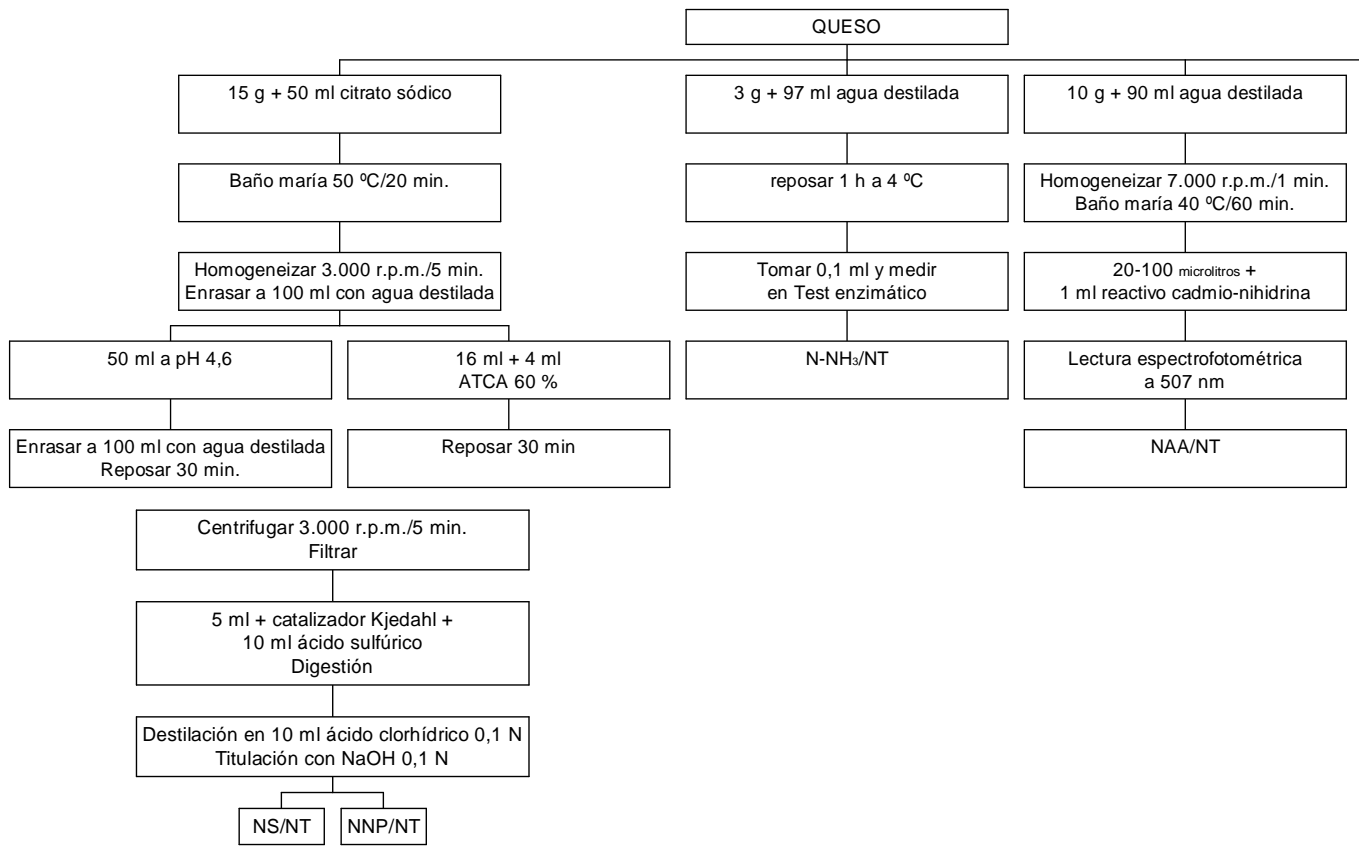
Se determinó a partir de una suspensión de queso, tras haberla liberado de la fracción insoluble a pH 4,6 (Lenoir, 1963), por el método Kjeldahl (AOAC, 1990).

##### *Reactivos*

- Solución de hidróxido sódico (0,1 N).
- Solución de hidróxido sódico al 35 %.
- Ácido sulfúrico 98 %.
- Rojo de metilo al 1 %.
- Selenio como catalizador.
- Solución de citrato sódico: Se obtuvo pesando 105 g de ácido cítrico cristalizado a los que se le añadió suficiente cantidad de una solución de NaOH ( $d = 1,33$ ) hasta conseguir un pH 7, evidenciándose con el viraje de la fenoftaleína. Finalmente se enrasó a 1 litro con agua destilada.
- Ácido clorhídrico 1 y 0,1 N.









*Procedimiento*

Se mezclaron 15 g de queso con 50 ml de citrato sódico. Tras 20 minutos en el baño maría a 50 °C, se homogeneizó durante 5 minutos y se diluyó a 100 ml con agua destilada. Se tomaron 50 ml de la suspensión de queso y se le añadió ácido clorhídrico 1 N hasta alcanzar pH 4,6, precisando con ácido clorhídrico 0,1 N y se adicionó agua destilada hasta conseguir un volumen de 100 ml aproximadamente. Transcurridos 30 minutos y después de centrifugar y filtrar, se tomaron alícuotas de 5 ml que se transfirieron a matraces de digestión. Posteriormente fueron mineralizadas con 10 ml de ácido sulfúrico y dos tabletas de catalizador y expuestas a digestión aproximadamente 30 minutos. Finalizada la oxidación y tras el enfriado de las muestras se añadió agua destilada. Se realizó una destilación en exceso de NaOH, recogiendo el destilado en un matraz con 10-15 ml de HCl. Finalmente, se cuantificó el contenido de nitrógeno en la muestra valorando el exceso de HCl 0,1 N mediante NaOH 0,1 N, debido al viraje de rojo a amarillo que se produce en el indicador rojo de metilo. Los resultados se expresaron en gramos de nitrógeno soluble por 100 gramos de nitrógeno total.

### **III.2.3.2.- Nitrógeno no proteico (NNP).**

El nitrógeno no proteico se estimó después de precipitar las proteínas con ácido tricloroacético (ATCA) al 12 %.

Se añadieron 4 ml de ácido tricloroacético (ATCA) al 60 % a 16 ml de la suspensión de queso en citrato sódico. Transcurridos 30 minutos, se realiza una centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. Tras el filtrado se tomaron 5 ml que fueron sometidos a digestión con 10 ml de ácido sulfúrico y selenio como catalizador, determinando la cantidad de nitrógeno mediante el método Kjeldahl, como se describió en el apartado anterior para el NS.

### **III.2.3.3.- Nitrógeno aminoacídico (NAA).**

Para la cuantificación de los aminoácidos libres totales, Folkertsman y Fox (1992) propusieron un nuevo método basado en la mayor reacción de la cadmio-nihidrina con los grupos amino de los aminoácidos que con los grupos amino de pequeños péptidos (Doi *et al.*, 1981).

## Material y Métodos

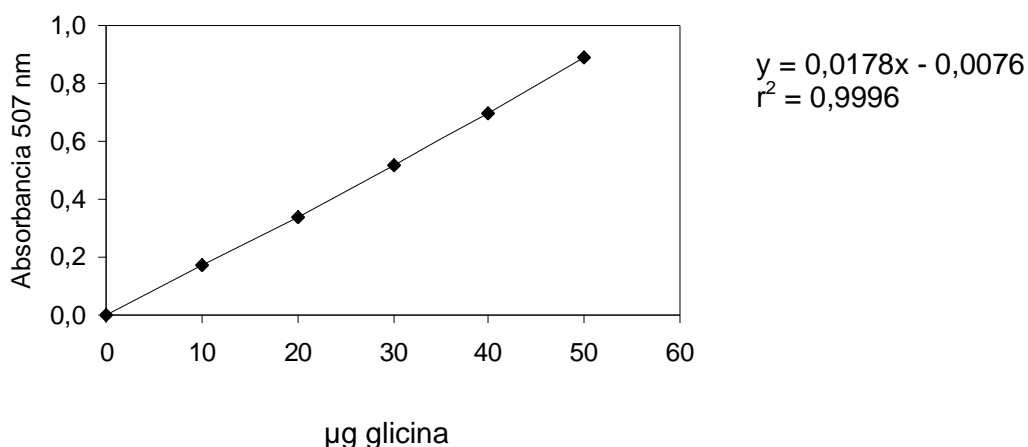
### *Reactivos*

- Reactivo de la cadmio-ninhidrina. Se obtuvo mezclando 0,8 g de ninhidrina con 80 ml de etanol absoluto (95 %) y 10 ml de ácido acético glacial. Finalmente se añadió 1 g de cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) disuelto en 1 ml de agua destilada.

### *Procedimiento*

Se añadieron 90 ml de agua destilada a 10 g de queso, homogenizándose la mezcla en un Omni-mixer a 7.000 r.p.m. durante 1 minuto. Posteriormente la mezcla se mantuvo a 40 °C durante 1 hora y se centrifugó durante 30 minutos a 3.000 r.p.m.. Del sobrenadante (nitrógeno soluble en agua) se tomaron alícuotas de 20 a 100  $\mu\text{l}$ , dependiendo de la concentración de aminoácidos esperada, completándose hasta 1 ml con agua destilada. Se añadieron 2 ml de reactivo de cadmio-ninhidrina, preparado inmediatamente antes de ser utilizado, y conservado en refrigeración a una temperatura de 2-4 °C no más de una semana, al abrigo de la luz. Seguidamente se calentó durante 5 minutos a una temperatura de 84 °C. Posteriormente se enfrió en corriente de agua fría, apareciendo un color rosado más o menos intenso, que pone de manifiesto la reacción. Finalmente se leyó en espectrofotómetro a 507 nm. De forma paralela se realizó un ensayo en blanco. Los resultados se calcularon a partir de la curva patrón obtenida con concentraciones conocidas de glicina (Figura 1).

**Figura 1.-** Curva patrón para la determinación del nitrógeno aminoacídico (NAA).



### III.2.3.4.- Nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

El N-NH<sub>3</sub> se determinó mediante un método enzimático de Boehringer Mannheim (Anónimo, 1999). En presencia de glutamato deshidrogenasa (GIDH) y nicotinamin adenin dinucleótido reducido (NADH), el amoniaco reacciona con el 2-oxoglutarico, dando lugar a L-glutamato, siendo el NADH oxidado:



La cantidad de NADH oxidado a lo largo de la reacción es proporcional a la cantidad de amoniaco. El NADH se determina por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm.

#### *Reactivos*

- Solución 1: Tampón trietanolamina con pH 8 y 2-oxoglutarico.
- Tabletas 0,4 mg de NADH.
- Solución 2: Glutamato deshidrogenasa (GIDH).

#### *Procedimiento*

Para la preparación de la muestra se homogeneizaron 3 g de queso en 97 ml de agua destilada durante 1 minuto a 9.500 r.p.m. mediante Omni-mixer. El homogeneizado se filtró tras 1 hora de almacenamiento en refrigeración (Rohm *et al.*, 1997). Se puso 1 ml de la solución 1 en la cubeta y se añadió 1 tableta de NADH, solubilizándose con la ayuda de una espátula. Se añadieron 0,1 ml de muestra y se completó hasta 2 ml con agua destilada. Simultáneamente se preparó un blanco añadiendo solamente 2 ml de agua destilada. La mezcla se disolvió agitando la cubeta tras haberla cubierto con papel Parafilm. Se midió la absorbancia de la solución después de 5 minutos a 20-25 ° C (A<sub>1</sub>). Se adicionaron 0,020 ml de solución 2 (GIDH) para provocar la reacción. Tras mezclar y esperar 20 minutos, se leyó la absorbancia de la solución A<sub>2</sub>. Los cálculos se realizaron según la siguiente expresión:

$$c = [(V \times pm) / (E \times d \times v \times 1000)] \times dA \text{ (g/l)}$$

### Material y Métodos

donde E es el coeficiente extinción del NADH<sub>340</sub> (6,3); d es el camino óptico (1 cm); v es el volumen de muestra (0,1), V= 3,020, MW: peso molecular (pm 17,03) y dA= (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) muestra – (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) blanco. El resultado está expresado en gramos amoniaco/ litro de solución de la muestra. Debido a que sólo se detecta una relación lineal entre 0,2 y 8 µg de amoniaco, la cantidad de éste en la cubeta no debe sobrepasar estos límites, de no ser así habría que diluir la muestra.

#### **III.2.3.5.- Determinación de grupos amino libres (N-NH<sub>2</sub>).**

Se determinó los grupos amino libres (-NH<sub>2</sub>/NT) utilizando el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) (Mckellar, 1981; Rolleman *et al.*, 1989).

##### *Reactivos*

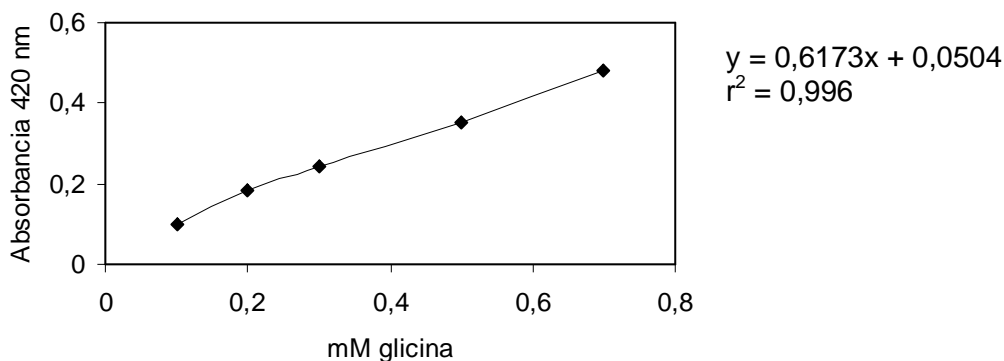
- Solución de TNBS (100 µg/ml), conservado en refrigeración y preservado de la luz.
- Solución 2 mM de fosfato sódico y 18 mM de sulfito sódico.
- Borato sódico 0,1 M y pH 9,5, preparado en caliente hasta completa disolución.

##### *Procedimiento*

Se obtuvo la fracción de nitrógeno soluble en agua siguiendo el procedimiento de Kuchroo y Fox (1982): 10 g de muestra se homogeneizaron con 50 ml de agua destilada. A continuación el homogeneizado se mantuvo en baño a 40 °C durante 30 minutos, centrifugándose a 3.000 r.p.m., 30 minutos a 20 °C. Posteriormente se enfrió en baño de hielo durante 30 minutos y se filtró.

Se tomó una alícuota de 100 µl del filtrado y se le añadió 1 ml de tampón borato sódico y 400 µl de la solución de TNBS. Después de una hora de incubación a 37 °C en la oscuridad se paró la reacción con 0,4 ml de una solución de fosfato/sulfito sódico preparada momentos antes y se midió la absorbancia a 420 nm utilizando como blanco agua destilada. Paralelamente se realizó una curva patrón de glicina de concentraciones comprendidas entre 0,1 mM y 0,8 mM (Figura 2). Los resultados se expresaron como gramos de glicina por 100 g de NT (-NH<sub>2</sub>/NT x100).

**Figura 2.-** Curva patrón para la determinación de los grupos amino (N-NH<sub>2</sub>).



### **III.2.3.6.-** Cálculo del nitrógeno de las proteínas (NP), nitrógeno de las caseínas (NC), nitrógeno de las proteasas peptonas (Npp) nitrógeno de los péptidos (Np).

Según el planteamiento de Lenoir (1963) y Fernández-Salguero (1975) y Fernández-Salguero *et al.* (1978), por diferencia de los datos obtenidos experimentalmente en las fracciones nitrogenadas anteriormente descritas (NS, NNP, NAA y N-NH<sub>3</sub>) se realizó el cálculo de estas fracciones nitrogenadas, mediante las siguientes expresiones:

$$NP = 100 - NNP$$

$$NC = 100 - NS$$

$$Npp = NS - NNP$$

$$Np = NNP - (NAA + NNH_3)$$

### **III.2.4.-** ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

#### **III.2.4.1.-** Preparación de muestras y diluciones.

Se ha seguido el método descrito por Beerens y Luquet (1990) para quesos de pasta semidura siguiendo el procedimiento de Sánchez (1999) en la toma de muestras para los análisis microbiológicos. Para la preparación de las diluciones decimales se tomaron 10 g de queso que se homogeneizaron con 90 ml de una solución de citrato sódico al 10 % (p/v) previamente calentado a 45 °C durante 2



### Material y Métodos

minutos. Acto seguido se prepararon las sucesivas diluciones decimales seriadas en agua de peptona estéril (Oxoid CM9) al 0,1 %.

Al objeto de que no se modificara la flora microbiana de forma sensible, la siembra en los medios de cultivo a partir de las diluciones decimales correspondientes se realizó en un tiempo inferior a media hora.

#### **III.2.4.2.- Determinaciones microbiológicas.**

Los análisis microbiológicos se realizaron por duplicado, mediante las técnicas descritas a continuación sobre leche, cuajada y quesos a los 2, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días de maduración, según el lote. Sólo se tuvieron en cuenta las placas con recuentos entre 30 y 300 colonias y los resultados se expresaron como log ufc/ml para leche y log ufc/g para cuajada y queso, para todos los microorganismos objeto del presente estudio.

#### **III.2.4.3.- Aerobios mesófilos.**

Se realizó según recomendaciones de la APHA (1985). Se depositó por duplicado a partir de la dilución correspondiente 1 ml en placas de Petri estériles, adicionando seguidamente 10-15 ml de agar para recuento en placa (PCA), previamente licuado y enfriado a 45-50 °C. Las placas se agitaron con movimientos circulares y de vaivén a fin de que el inóculo se homogeneizara y se incubaron a 30 °C durante 72 horas y posteriormente se efectuó el recuento de colonias visibles.

#### **III.2.4.4.- Enterobacterias.**

El recuento de enterobacteriáceas se realizó según recomendaciones de la APHA (1985) realizándose la siembra por homogeneización de 1 ml de la dilución correspondiente en masa de doble capa de agar VRBG (Agar Bilis Lactosa Glucosa Rojo Neutro Cristal Violeta, Oxoid CM485) e incubado a 37 °C durante 24 horas. Las colonias típicas de enterobacterias se muestran como colonias violeta rojizo por fermentación de la glucosa con formación de ácido y con halos del mismo color por precipitación de los ácidos biliares del medio.

## Material y Métodos

Las pruebas de confirmación fueron las siguientes:

1.-Morfología: En preparación en fresco de cultivos en Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón, Oxoid CM225) incubados a 30 °C durante 18 horas.

2.-Tinción diferencial de Gram: Se realizó a partir de una siembra sobre agar PCA (Oxoid CM325) incubada a 30 °C durante 18 horas. Las enterobacterias muestran bacilos Gram negativos.

3.- Prueba de la citrocromo-oxidasa (CO): Las enterobacterias son citrocromo-oxidasa negativas. Para la comprobación de la producción de esta enzima, se colocó un papel Whatman de 5 cm<sup>2</sup> en una placa de Petri vacía y se colocaron tres gotas del reactivo CO recién preparado (disolviendo 100 g de N-dimetil-parafenildiamina en 100 ml de agua destilada). Se tomó una porción del cultivo crecido sobre PCA y se extendió sobre el papel impregnado de reactivo, en una zona de 4-5 mm. La reacción se consideró positiva con la aparición de color violeta oscuro en la extensión del cultivo.

### **III.2.4.5.- Coliformes.**

Se realizó siguiendo las recomendaciones de la APHA (1992). La siembra se realizó por homogeneización en masa de 1 ml de muestra con una doble capa de agar VRBA (Agar con Bilis, Rojo Neutro y Cristal Violeta, Oxoid CM107), incubado a 37 °C durante 24 horas.

En este medio de cultivo las colonias se muestran de color rojo amoratado bajo la superficie del medio, con un diámetro de 1-2 mm y suelen estar rodeadas de una zona rojiza de precipitación de bilis. El cristal violeta y las sales biliares del medio inhiben el crecimiento de la flora acompañante Gram positiva y la fermentación de la lactosa hace que vire el indicador rojo neutro a un color púrpura. Sobre este tipo de colonias se realizaron las pruebas enumeradas en el apartado anterior.

### **III.2.4.6.- Estafilococos.**

El recuento de *Staphylococcus* sp. se realizó según el procedimiento de Buttiaux (1974). A partir de la dilución correspondiente y por duplicado se sembró 0,1 ml de inóculo sobre agar Baird Parker (Oxoid CM275) bien seco, extendiéndose el inóculo

con ayuda de una asa de vidrio acodada estéril, incubando posteriormente a 37 °C durante 24-78 horas.

Un vez esterilizado y enfriado a 50 °C el medio de cultivo se suplementó con una emulsión yema de huevo telurito (Oxoid SR54) en un proporción de 50 ml por cada litro de medio de cultivo. Transcurrido el tiempo de incubación el crecimiento de estos microorganismos se evidencia con la aparición de colonias negras.

#### **III.2.4.7.- Micrococos.**

El recuento de micrococos se realizó según Chapman (1945), realizándose la siembra en masa por homogeneización en agar MSA (Agar Manitol Sal, Oxoid CM85) e incubando a 37 °C durante 72 horas. Las colonias de micrococos se muestran rodeadas de halos amarillo brillante indicativo de que se trata de colonias coagulasa positivas, mientras que las colonias de micrococos coagulasa negativa aparecen rodeadas de un halo púrpura.

Se realizaron las siguientes pruebas de confirmación:

Morfología: En preparación en fresco de cultivos en Caldo BHI (Oxoid CM225) incubados durante 18 horas a 30 °C.

Tinción diferencial de Gram: Se realizó a partir de picaduras en agar PCA (Oxoid CM325) incubados a 30 °C durante 18 horas, mostrándose los micrococos Gram positivos y asociados en cadenas cortas.

Producción de catalasa: Sobre un portaobjetos con una masa celular de un cultivo crecido en caldo BHI (CM225) incubado a 30 °C durante 18 horas se depositó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %. La aparición de burbujas de O<sub>2</sub> indica un resultado positivo.

#### **III.2.4.8.- Bacterias ácido lácticas (BAL).**

Siguiendo las recomendaciones de la APHA (1976) la siembra se realizó por homogeneización en masa de 1 ml de inóculo de la dilución correspondiente con una doble capa de agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe, Oxoid CM361), acidificado a pH 5,5 con una solución estéril de ácido acético al 10 % e incubado a 37 °C durante 24 horas en estufa para anaerobios.

### **III.2.4.9.- Levaduras y mohos.**

El recuento de levaduras y mohos se realizó según recomendaciones de la APHA (1985). Se tomó por duplicado 1 ml de la dilución correspondiente y se realizó la siembra por homogeneización en masa en placas de Petri estériles adicionando 10-15 ml de agar PDA (Agar Patata Dextrosa, Oxoid CM139) acidificado a pH 3,5 con ácido tartárico al 10 %. Las placas se incubaron a 26 °C durante 96 horas.

### **III.2.4.10.- Cálculo de la velocidad de muerte microbiana.**

La velocidad de muerte se obtuvo mediante la ecuación de regresión del log ufc/g sobre el tiempo de maduración del queso y se expresó como el descenso medio del log ufc/g por semana de maduración (Fernández del Pozo *et al.*, 1988b, Sánchez, 1999).

## **III.2.5.- ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN MINERAL.**

### **III.2.5.1.- Pretratamiento de la muestra.**

Para el análisis del contenido mineral se utilizó el método de Osborne y Voogt (1986) siguiendo el procedimiento descrito por Moreno *et al.* (1994a,b). Se depositaron 15 g de queso en crisoles de porcelana previamente tarados. Las muestras se desecaron en estufa a 105 °C durante 24 horas. Una vez desecadas se incineraron en mufla de acuerdo con el siguiente programa de tiempos/temperaturas, para evitar pérdidas por volatilización.

<i>Temperaturas</i>	90°C-250 °C	450 °C	450 °C-100 °C
<i>Tiempo (minutos)</i>	400	460	300
<i>Velocidad (°C/Hora)</i>	38	50	70

Tras el enfriado de los crisoles se añadieron 2 ml de ácido nítrico 2 N para proceder al blanqueado de las cenizas. Se desecó la mezcla ácida en placas termostáticas, evitándose una ebullición violenta para no provocar pérdida de analito por salpicadura. Una vez desecados, los crisoles se introdujeron en un horno

microondas MAS-2000 CEM con reactor de teflón, donde se alcanzaron 450 °C de forma rápida, manteniéndose a esta temperatura durante 1 hora.

La recuperación de las cenizas blancas se realizó mediante la adición de 5 ml de ácido nítrico 2 N para disolver las cenizas, calentándose los crisoles (80-90 °C) para facilitar la disolución de éstas en la mezcla ácida. Posteriormente, se añadieron alícuotas de 5 y 10 ml de ácido nítrico 0,1 N, procurando siempre humedecer la mayor parte de la superficie interna del mismo. Las soluciones finales se transfirieron volumetricamente a un matraz aforado de 25 ml, enrasado con ácido nítrico 0,1 N, y tras su homogeneización se almacenaron en condiciones de refrigeración hasta su análisis en recipientes de polipropileno con cierre hermético.

### **III.2.5.2.- Determinaciones analíticas.**

Se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama para Cu, Fe, Zn, Mn, Ca y Mg, utilizándose la variante de la emisión atómica para el análisis de Na y K. Las determinaciones analíticas se realizaron con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 2380, empleándose acetileno como combustible y aire como oxidante.

Se optimizaron una serie de parámetros instrumentales en función de las concentraciones presentes en las muestras. Se realizó una dilución instrumental usando diferentes nebulizadores y/o por la rotación del quemador que modifica el ángulo de incidencia del haz de luz. Los parámetros optimizados fueron:

- Altura y posición del quemador (únicamente para la determinación de Mg y Ca se giró el mechero a una posición de 90°).
- Tipo de nebulizador, utilizándose bola de impacto, excepto en Cu y Zn que se usó spoiler.
- Ajuste de longitud de onda, intensidad de la lámpara, velocidad de aspiración de la muestra y flujos de gases.
- El Mn fue el único elemento mineral que precisó de corrector de fondo de la lámpara de Deuterio.
- En los casos de Ca, Mg, Na y K las muestras se diluyeron 1:100.
- Para la determinación del Ca y Mg, se adicionó cloruro de lantano en una proporción de 0,27 %, al objeto de evitar interferencias aniónicas que pudieran afectar al resultado del análisis.

### Material y Métodos

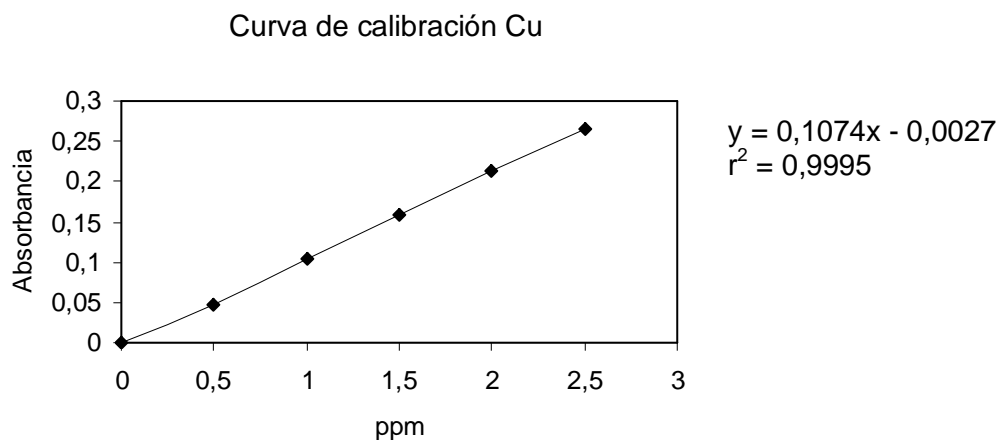
Las condiciones instrumentales establecidas para la determinación de cada uno de los elementos minerales considerados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones instrumentales para espectrofotometría de absorción atómica.

Elemento	$\lambda$ /slit	Nebulizador	Ángulo del mechero	Corrector de fondo
Cu	324,8/0,7	Spoiler	0°	No
Fe	248,3/0,2	Bola de impacto	0°	No
Zn	213,9/0,2	Spoiler	0°	No
Mn	279,5/0,2	Bola de impacto	0°	Si
Ca	422,7/0,7	Bola de impacto	90°	No
Mg	285,2/0,7	Bola de impacto	90°	No
Na	589,0/0,2	Bola de impacto	0°	-
K	766,5/0,2	Bola de impacto	0°	-

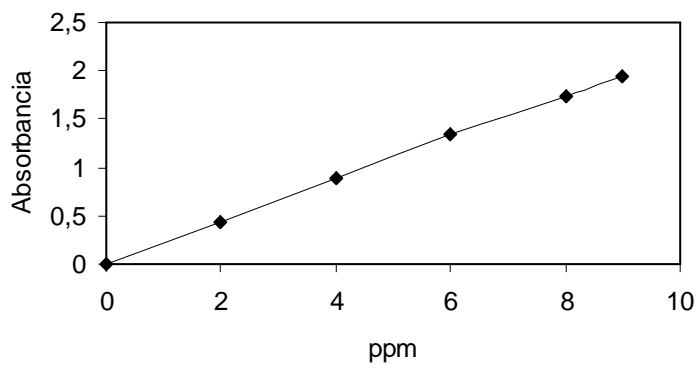
A partir de las soluciones stock de Titrisol de concentración conocida, se elaboraron las curvas patrón, obteniendo las soluciones patrones de trabajo por dilución ácida de las soluciones madres hasta rangos de concentración similares a los esperados en las muestras. A continuación se representan las diferentes curvas patrón junto con su ecuación y el coeficiente de correlación  $r^2$  obtenido (Figura 3).

**Figura 3.-** Curvas de calibración de los elementos minerales determinados.



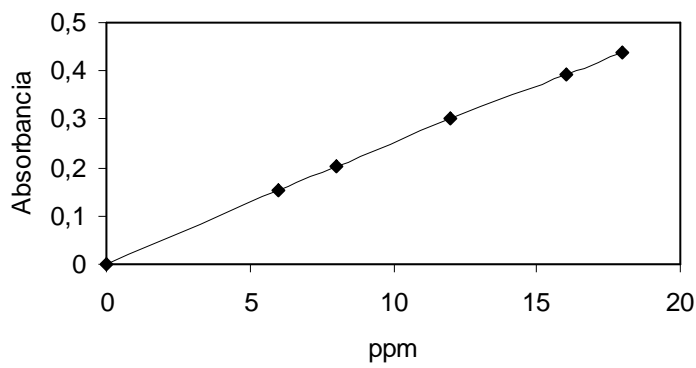
Material y Métodos

Curva calibración Fe



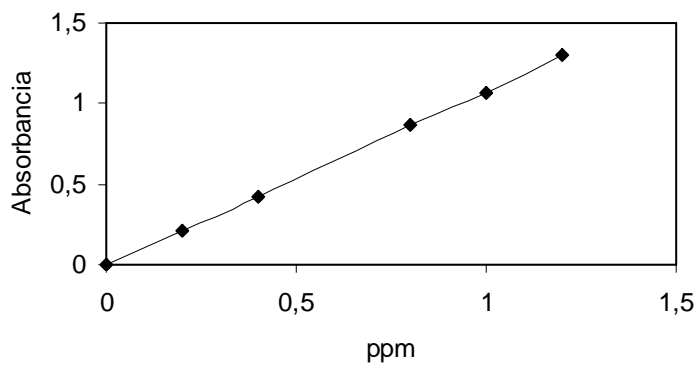
$y = 0,2173x + 0,0081$   
 $r^2 = 0,9996$

Curva calibración Zn



$y = 0,0244x + 0,0035$   
 $r^2 = 0,9994$

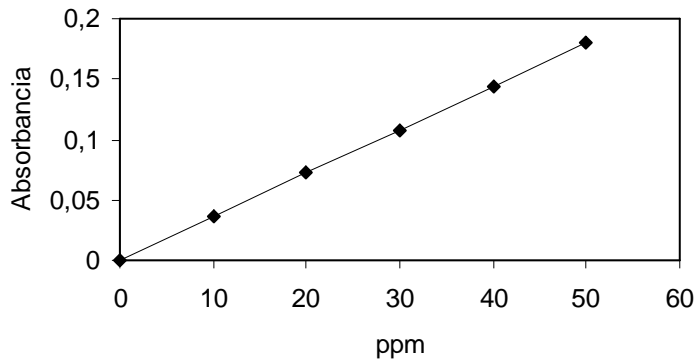
Curva calibración Mn



$y = 1,0839x - 0,0054$   
 $r^2 = 0,9998$

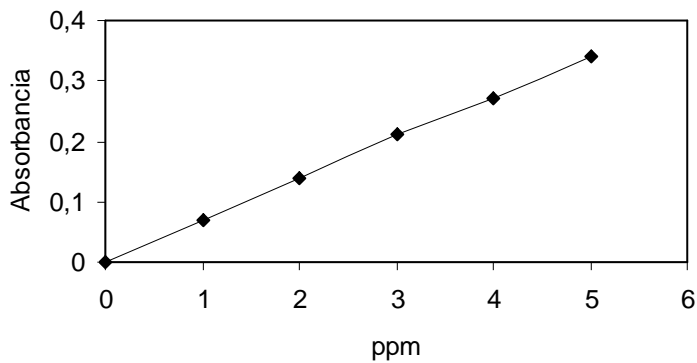
Material y Métodos

Curva calibración Ca



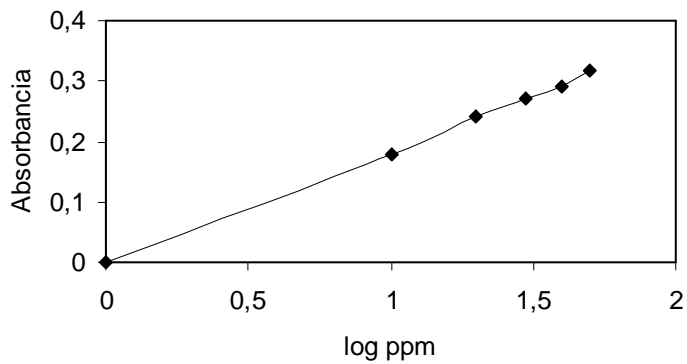
$y = 0,0036x + 0,0006$   
 $r^2 = 0,9999$

Curva calibración Mg



$y = 0,0677x + 0,0025$   
 $r^2 = 0,9994$

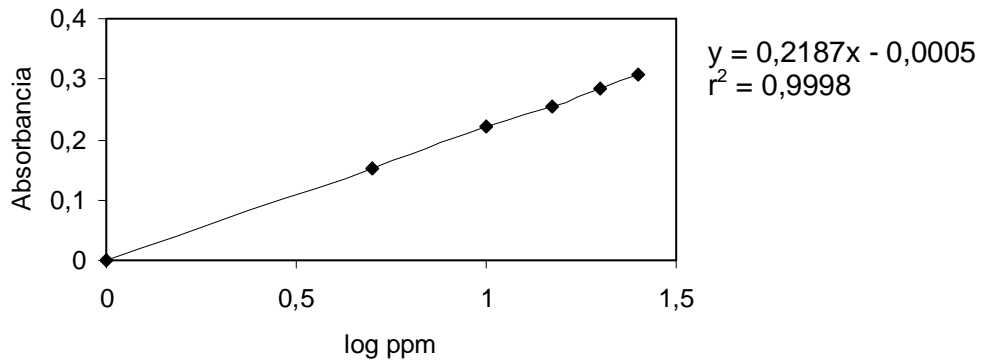
Curva calibración Na



$y = 0,1847x - 0,0015$   
 $r^2 = 0,9991$



Curva calibración K

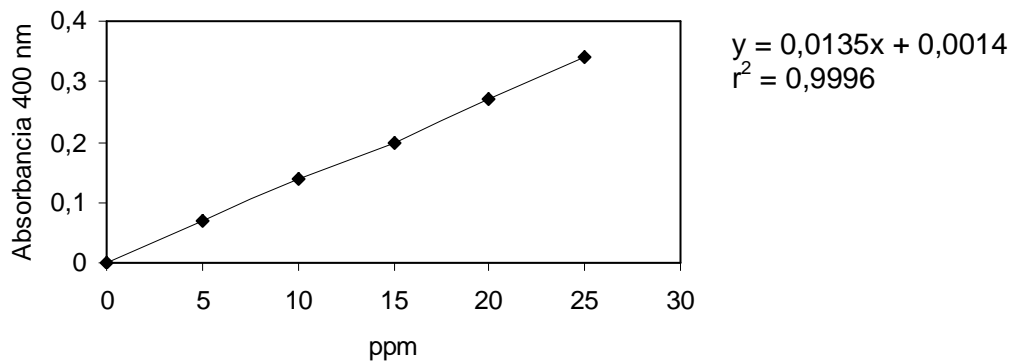


\* En la curva de calibración del Na y K la concentración está expresada en log ppm, obteniéndose una línea recta en la correspondiente representación gráfica.

### III.2.5.3.- Determinación de fósforo.

La determinación de fósforo se realizó por espectrofotometría ultravioleta visible, según el método colorimétrico del molibdo vanadato (AOAC, 1991) partiendo de las soluciones finales de muestras obtenidas en el proceso de mineralización descrito anteriormente (apartado III.2.5.1). La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 400 nm y la concentración de P se calculó según la curva de calibración mostrada en la Figura 4.

Figura 4.- Curva calibración Fósforo.



### III.2.6.- ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA.

#### Extracción de la Grasa.

Para la extracción de la grasa se siguieron las indicaciones de la norma de la FIL-IDF (International Dairy Federation, 1966). Se mezclaron 12 g de queso con suficiente cantidad de sulfato de sodio anhidro para desecar la muestra en un matraz erlenmeyer de 250 ml de volumen. Se añadieron unos 150 ml de éter de petróleo y tras agitar intensamente se tapó el matraz y se mantuvo 24-48 horas a temperatura ambiente, siendo agitado varias veces. Se recogió el sobrenadante por filtración en un matraz Soxhlet que se conectó al rotavapor para separar la grasa del solvente. La grasa obtenida se congeló a  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

#### Preparación de los ésteres metílicos.

Para preparar los ácidos grasos esterificados se utilizó el método descrito por Christopherson y Glass (1969), siguiendo la norma UNE 55-118 (1979) y de acuerdo a las condiciones descritas por Fernández-Salguero *et al.* (1986c), empleando hidróxido potásico como catalizador.

#### Reactivos

- Hexano riqueza superior al 99 % y cuyo contenido en benceno no sea superior al 0,1 %.
- Metanol absoluto (99,8 %), de calidad reactivo para análisis.
- Hidróxido potásico 2 N, preparado disolviendo 11,2 g de hidróxido potásico de calidad reactivo para análisis en 100 ml de metanol.
- Soluciones estándar de referencia: se utilizaron como patrones para la identificación de los ácidos grasos puros n-heptanoico, laúrico, heptadecanoico, esteárico, oleico, linoléico y araquídico (Sigma).

#### Procedimiento

Se pesaron 0,5 g de la grasa, fundida a la temperatura más baja posible, en un tubo cónico de centrifuga y se añadieron 5 ml de hexano, agitándose hasta disolución total de la grasa. Se añadieron 0,25 ml de la solución 2 N de hidróxido potásico y se sometió a agitación suave durante 30 segundos, apreciándose la rápida sedimentación del glicerol. Para facilitar esta separación, los tubos fueron sometidos a

### Material y Métodos

una centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron alícuotas que se inyectaron directamente en el cromatógrafo, obteniendo el área de cada pico y el porcentaje relativo de cada una de los ácidos grasos esterificados directamente del integrador. Las condiciones técnicas del método operativo cromatográfico se muestran en el Cuadro 9.

Este procedimiento de metilación constituye un paso intermedio en la reacción de saponificación con el hidróxido potásico. Debido a que una demora prolongada puede dar lugar a la formación de jabones, los ésteres metílicos así obtenidos no se conservaron más de 12 horas a temperaturas de refrigeración.

### III.2.7.- EVALUACIÓN DE LOS ATRIBUTOS SENSORIALES.

Se realizó un análisis sensorial para los seis lotes de queso coagulados tres con cuajo animal y otros tres con coagulante vegetal liofilizado a los 60, 90, 120 y 180 días de maduración mediante un panel de catadores integrado por 10 personas vinculadas al departamento, con experiencia en este tipo de pruebas. Las sesiones de evaluación sensorial se llevaron a cabo en la sala de cata, dotada de un área de prueba, con iluminación adecuada y exenta de olores, y con un área de preparación de muestras, adecuadamente separada de la anterior. En esta última área se procedió, mediante los equipos y utensilios adecuados, a la preparación de la muestra. Las muestras se presentaron de acuerdo a los hábitos de consumo, en pequeñas piezas triangulares de escaso grosor codificadas con números de tres cifras, para evitar los sesgos de preferencia individual y dispuestas en un orden determinado, para evitar sesgos de posición. Se colocaron en bandejas de plástico en el área de prueba, las cuales se introdujeron a través de una ventanilla con cubierta corrediza junto a un cuestionario de cata.

Para la valoración de las características sensoriales se utilizó una Prueba Descriptiva de calificación con escalas no estructuradas. La escala no estructurada se caracteriza por presentar solamente valores extremos (o sea, máximo y mínimo), aunque en el presente trabajo se optó por incluir un punto intermedio, para solventar el problema que se suele presentar respecto a la subjetividad de los jueces

**Cuadro 9.-** Condiciones técnicas del método operativo cromatográfico.

<b>Cromatógrafo</b>	Hewlett Packard 5890 SERIE II.
<b>Detector</b>	FID: Ionización de llama de hidrógeno.
<b>Columna</b>	HP-5 Cross-linked 5% Fenil Metil Siloxano. Diámetro interno 0,32mm. Grosor fase estacionaria 0,25 µm. Longitud 30 metros
<b>Gas portador</b>	Helio (Air Liquide)
<b>Gas auxiliar</b>	Nitrógeno (Air Liquide)
<b>Flujo HELIO + NITRÓGENO</b>	20 ml / minuto.
<b>Gases para llama</b>	Hidrógeno (Air Liquide) 36 ml / minuto Aire sintético (Air Liquide), 380 ml / minuto
<b>Purga</b>	2 ml / minuto
<b>Split</b>	100:1.7
<b>Presión en cabeza de columna</b>	10 psi
<b>Temperatura del detector</b>	275 °C
<b>Temperatura del inyector</b>	250 °C
<b>Temperatura de columna</b>	60 °C (3 minutos)/ de 60 a 180 °C a 10 °C/minuto. 180 °C (15 minutos). De 180 a 220 °C a 20 °C/ minuto. 220 °C (10 minutos)
<b>Rango</b>	2
<b>Integrador</b>	Hewlett Packard HP 3395
<b>Condiciones integrador</b>	Atenuación: 5 Velocidad del papel: 0,5 cm / minuto Umbral: 3 Anchura de pico: 0,04

### Material y Métodos

El catador debe expresar su apreciación de la intensidad de un atributo, marcando sobre la línea comprendida entre ambos extremos (Amerine *et al.*, 1965). Se utilizaron escalas de aproximadamente 15 cm, que son las más adecuadas, puesto que si se usaran escalas más largas, los jueces “se pierden” en ellas y suelen poner sus calificaciones en uno de los dos extremos. Las escalas muy pequeñas, pueden provocar confusiones en la apreciación de los jueces (Anzaldúa-Morales, 1994). La interpretación de los resultados de calificaciones, requiere una transformación de las lecturas (longitud desde el mínimo hasta el punto marcado), dividiéndolas entre la longitud total de la escala, y multiplicándolo por 10 para obtener escalas decimales.

En la ficha de evaluación sensorial (Cuadro 10) se recogían 3 atributos de olor (intensidad, ácido y picante), 4 de apariencia interna (color, tamaño y número y distribución de ojos), 3 de textura (dureza, firmeza y cremosidad) y 5 de sabor (intensidad, picante, ácido, salado y amargo). Finalmente se realizó la valoración y el tratamiento estadístico de los resultados.

### III.2.8.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

Para el correspondiente tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico StatSoft, Inc. (1997), STATISTICA v. 6.0 para Windows. Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA), de dos factores con repetición. Un diseño factorial con varias medidas por casilla, que se ajusta al siguiente modelo:

$$X_{ijk} = \mu + P_i + T_j + PT_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $\mu$  es la media general,  $P_i$  es el efecto del tipo de coagulante utilizado en la elaboración del queso,  $T_j$  es el efecto del tiempo de maduración,  $PT_{ij}$  expresa el efecto de la interacción entre el tipo de coagulante y tiempo de maduración, y  $\varepsilon_{ijk}$  el efecto del individuo  $k$  (parámetro determinado en queso) dentro de la combinación  $ij$ .

Una vez determinada la existencia de diferencias significativas entre las diferentes variables se aplicó la prueba Test de Tukey, para realizar una comparación múltiple de medias, solamente en aquellos casos en los que el ANOVA fue significativo. Finalmente, para el estudio de la relación entre variables se realizó el análisis de correlación, el análisis de componentes principales y el análisis discriminante.

**Cuadro 10.-** Ficha de Evaluación Sensorial.

<b>NOMBRE</b>	<b>FECHA</b>	<b>MUESTRA</b>
Se pretende valorar los atributos sensoriales más característicos de este tipo de queso. Sus puntuaciones, deberá expresarlas trazando una raya que corte verticalmente cada una de las escalas gráficas que figuran a continuación:		
<u>A) OLOR</u>		
<b>Intensidad</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intensa 10</i>
<b>Ácido</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
<b>Picante</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
<u>B) APARIENCIA INTERNA</u>		
<b>Color</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
<b>Número ojos</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy numerosos 10</i>
<b>Tamaño ojos</b> <i>0 muy pequeños</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy grandes 10</i>
<b>Distribución ojos</b> <i>0 muy irregular</i>	<i>5 normal</i>	<i>uniforme por toda la pasta 10</i>
<u>C) TEXTURA</u>		
<b>Dureza</b> <i>0 muy blando</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy duro 10</i>
<b>Firmeza</b> <i>0 muy blando</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy duro 10</i>
<b>Cremosidad</b> <i>0 no cremoso</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy cremoso 10</i>
<u>D) SABOR</u>		
<b>Intensidad</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intensa 10</i>
<b>Picante</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
<b>Ácido</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
<b>Salado</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intensa 10</i>
<b>Amargo</b> <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intensa 10</i>







## IV. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN





## **IV.A. QUESOS TIPO MANCHEGO ELABORADOS CON CUAJO ANIMAL Y CON COAGULANTE VEGETAL LIOFILIZADO.**

A continuación se muestran los resultados obtenidos de los análisis físico-químicos, químicos, bioquímicos, microbiológicos y organolépticos para los tres lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y los tres lotes obtenidos con coagulante vegetal liofilizado (CVL) a los 2, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días de maduración, así como la correspondiente discusión.

Referido a cada parámetro o grupo de parámetros estudiados se presenta una tabla en la que se muestran los valores obtenidos en cada lote, los valores medios y las desviaciones estándar de los grupos considerados, además de los resultados obtenidos en el test de comparación múltiple de medias para aquellos factores que resultaron estadísticamente significativos (prueba de contraste de Tukey). Asimismo se incluye una representación gráfica de los valores medios de los lotes estudiados a lo largo de la maduración, junto a la ecuación de la línea de tendencia obtenida y el coeficiente de correlación al cuadrado ( $r^2$ ) que indica la idoneidad del modelo. En cada apartado se procede igualmente a la discusión del mismo y en la última parte aparecen los resultados del análisis discriminante y del análisis de componentes principales.

### **IV.A.1.- COMPOSICIÓN QUÍMICA.**

#### **IV.A.1.1- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE Y DE LAS CUAJADAS.**

En la Tabla 2 se muestra el valor pH y la composición química bruta de la leche de partida utilizada en cada una de las tres elaboraciones y de las cuajadas obtenidas en cada fabricación con los dos coagulantes ensayados.

La leche presentó un valor pH medio mayor que el de las cuajadas, observándose un valor pH medio ligeramente superior en las cuajadas de los lotes

## Resultados y Discusión

elaboradas con cuajo animal (CA) con respecto a las obtenidas mediante coagulante vegetal liofilizado (CVL).

**Tabla 2.-** pH y composición química bruta (g/100 g de queso) de la leche y de las cuajadas.

	pH	humedad	grasa	proteína	ceniza	lactosa
<b>LECHE</b>						
Elaboración 1	6,65	81,61	8,00	6,03	0,83	3,54
Elaboración 2	6,56	81,26	8,00	6,43	0,70	3,62
Elaboración 3	6,60	81,66	7,40	7,05	0,72	3,18
x ± sd	6,60 ± 0,05	81,51 ± 0,22	7,79 ± 0,35	6,49 ± 0,51	0,75 ± 0,07	3,44 ± 0,23
<b>CUAJADAS</b>						
<b>CA</b>						
Lote CA1	6,28	54,68	25,00	16,87	1,67	0,78
Lote CA2	5,78	55,18	23,75	16,36	1,80	0,91
Lote CA3	5,91	55,11	22,25	16,56	2,00	1,08
x ± sd	5,99 ± 0,26	54,99 ± 0,27	23,67 ± 1,38	16,60 ± 0,26	1,82 ± 0,17	0,92 ± 0,15
<b>CVL</b>						
Lote CVL1	5,89	55,83	24,29	16,05	1,83	1,00
Lote CVL2	5,98	54,25	23,50	17,19	2,00	1,06
Lote CVL3	5,72	54,64	23,50	16,06	1,83	0,97
x ± sd	5,86 ± 0,13	54,41 ± 0,82	24,26 ± 0,46	16,43 ± 0,66	1,89 ± 0,10	1,01 ± 0,05

Los valores pH medios de las leches empleadas en las tres elaboraciones de quesos estudiados en el presente trabajo (Tabla 2) fueron similares a los obtenidos en otros trabajos para leche de ovejas de la raza Manchega (Pardo-González, 1995; García-Ruiz *et al.*, 1998; Poveda, 2001) y a los citados para leche de ovejas de la raza Merina (Carmona, 1994; Roa *et al.*, 1997; González *et al.*, 1997; Pérez-Elortondo *et al.*, 1998, 1999a,b; Tejada, 2001; Soryal, 2002; Vioque, 2002).

El porcentaje medio de humedad para las tres partidas de leche fue del 81,51 %, siendo similar al obtenido en otros trabajos (Bencini y Purvis, 1990; Núñez *et al.*, 1991a; Carmona, 1994; Pardo-González *et al.*, 1995; Roa *et al.*, 1997; González *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1998; Pérez Elortondo *et al.*, 1998, 1999a,b; Poveda, 2001; Tejada, 2001; Vioque, 2002) pero superior a los detectados por González *et al.* (1991) y López Gallego (1996) que hallaron porcentajes entre el 74 y el 79 %, respectivamente.

Los porcentajes medios de grasa y proteína detectados en la leche (7,79 % y 6,49 %, respectivamente) son similares a los observados por Carmona (1994),

## Resultados y Discusión

González *et al.* (1997), Poveda (2001), Tejada (2001) y Vioque (2002). No obstante Serrano *et al.* (1998) obtuvieron tasas de grasa y proteína inferiores a los del presente trabajo y González *et al.* (1991), Núñez *et al.* (1991a), Bencini y Purvis (1990), López Gallego (1996) y Roa *et al.* (1997) detectaron contenidos en grasa y proteína en leche de ovejas de la raza Merina superiores a los obtenidos por nosotros. Delacroix-Buchet *et al.* (1994) y Poveda (2001) hallaron porcentajes de grasa de leche de ovejas manchegas del 7,79 % y 6,38 %, respectivamente. En esta misma variedad de leche con destino a la fabricación de queso Manchego, Pardo-González *et al.* (1995) y Pavia *et al.* (2000a) obtuvieron porcentajes medios de 7,31 % y 6,90 % de grasa y de 5,38 % y 5,50 % de proteína, respectivamente. Pellegrini *et al.* (1994) y Guindeo *et al.* (1990) hallaron porcentajes medios de proteína del 5,83 %, 5,31 % y 5,35 % en leche de ovejas de las razas Manchega, Latxa y Lacaune, respectivamente. Mataix *et al.* (1995) describe porcentajes de grasa y proteína en leche de oveja de 6,50 % y 5,30%, respectivamente. Teniendo en cuenta que la composición de la leche varía estacionalmente y depende de factores como la alimentación, edad, variabilidad genética, estado de lactación y condiciones fisiológicas del animal, estas variaciones existentes entre los componentes composicionales de la leche se pueden considerar normales.

No se han detectado diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre el valor pH y la composición química bruta de las cuajadas elaboradas con ambos tipos de coagulantes ensayados, aunque las cuajadas elaboradas con cuajo animal presentaron algo más de humedad y menos grasa que las obtenidas con coagulante vegetal liofilizado. Núñez *et al.* (1991a) en queso de La Serena observaron en cuajadas obtenidas con coagulante vegetal (*Cynara cardunculus*) menor humedad y mayor contenido en grasa y proteína que en las elaboradas con cuajo animal. Tejada (2001) obtuvo mayor contenido en humedad y menor en grasa en las cuajadas elaboradas con cuajo animal de quesos de Los Pedroches respecto de las obtenidas con coagulante vegetal fresco y liofilizado, sin llegar a establecer diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos. Vioque (2002) detectó en cuajadas elaboradas con coagulantes vegetales frescos (*Cynara cardunculus* y *C. humilis*) porcentajes de grasa y de humedad significativamente superiores e inferiores ( $p < 0,05$ ), respectivamente, a los de las cuajadas obtenidas mediante cuajo animal. Diferencias entre las leches de partida y variaciones relacionadas con las distintas etapas de la fabricación artesanal de los quesos pueden ser la causa de las pequeñas diferencias existentes en la composición química bruta de las cuajadas.

#### IV.A.1.2.- EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y QUÍMICOS DE LOS QUESOS A LO LARGO DE LA MADURACIÓN.

##### IV.A.1.2.1.- Actividad de agua ( $a_w$ ).

En la Tabla 3 y Figura 5 se recogen los valores de la  $a_w$  de los lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL) durante el proceso de maduración estudiado.

En todos los lotes de quesos estudiados la actividad de agua mostró un descenso significativo ( $p < 0,001$ ) a lo largo del período de maduración considerado (Figura 5). Esta disminución de la  $a_w$  fue más pronunciada en los lotes de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado que en los elaborados con cuajo animal.

Esta evolución descendente de la  $a_w$  a lo largo de la maduración se debe a la pérdida de humedad durante el proceso madurativo, la difusión de sal desde la superficie al interior de la pasta del queso y a la progresiva formación de compuestos del metabolismo tales como ácido láctico y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular con efecto depresor de la presión de vapor. Ruegg y Blanc (1977), Marcos *et al.* (1981) y Schlessner *et al.* (1992) atribuyen el descenso de la  $a_w$ , en etapas avanzadas del proceso madurativo, a peptonas, péptidos y aminoácidos libres derivados de la proteólisis de las caseínas. La hidrólisis de los enlaces peptídicos para producir grupos iónicos presenta tendencia a fijar el agua libre (Lawrence *et al.*, 1987). Por esta razón la mayor actividad proteolítica de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado produce un acúmulo mayor de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular en el queso y consecuentemente una disminución más pronunciada de la  $a_w$ . En este sentido se ha detectado una correlación negativa altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre la  $a_w$  y las fracciones nitrogenadas determinadas (Tabla 83) y entre la  $a_w$  y el contenido en ácido láctico (Tabla 82).

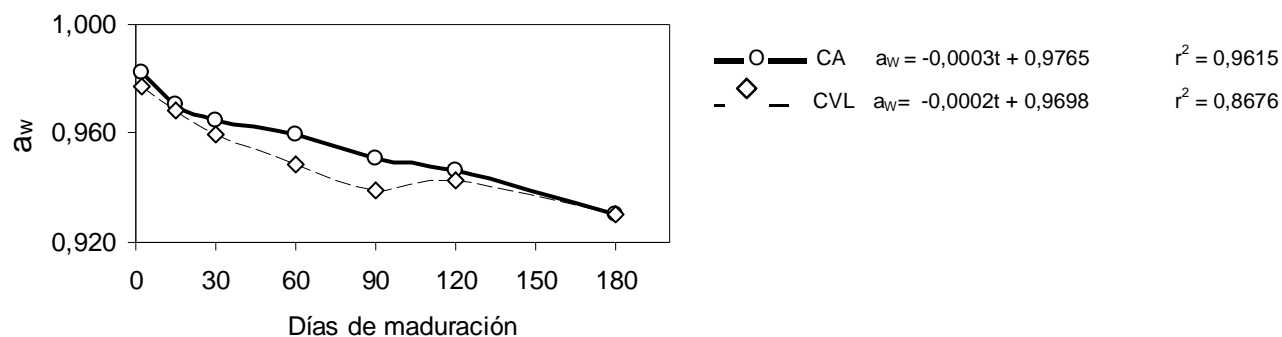
Freitas y Malcata (1996) en queso Picante y Sanjuán (1992), Gómez *et al.* (2001), Tejada (2001), Sanjuán *et al.* (2002) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches detectaron una menor  $a_w$ , en una fase avanzada de la maduración, en quesos elaborados con coagulante vegetal respecto de los elaborados con cuajo animal.

**Tabla 3.-** Actividad de agua ( $a_w$ ) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	0,984	0,970	0,964	0,959	0,949	0,935	0,931
Lote CA2	0,981	0,971	0,965	0,961	0,950	0,964	0,934
Lote CA3	0,982	0,973	0,965	0,960	0,953	0,940	0,927
x ± sd	0,982 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,971 ± 0,001 <sup>abc</sup>	0,965 ± 0,001 <sup>abcde</sup>	0,960 ± 0,001 <sup>bcdef</sup>	0,951 ± 0,002 <sup>cdefgh</sup>	0,946 ± 0,016 <sup>efgh</sup>	0,931 ± 0,004 <sup>h</sup>
CVL							
LoteCVL1	0,978	0,968	0,961	0,949	0,940	0,958	0,939
Lote CVL2	0,977	0,970	0,960	0,950	0,941	0,945	0,935
Lote CVL3	0,978	0,968	0,959	0,948	0,937	0,926	0,917
x ± sd	0,978 ± 0,000 <sup>ab</sup>	0,968 ± 0,001 <sup>abcd</sup>	0,960 ± 0,001 <sup>bcdefg</sup>	0,949 ± 0,001 <sup>defgh</sup>	0,939 ± 0,002 <sup>gh</sup>	0,943 ± 0,016 <sup>fgh</sup>	0,930 ± 0,012 <sup>h</sup>

<sup>a-h</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 5.-** Evolución de la  $a_w$  de los quesos a lo largo de la maduración.





## Resultados y Discusión

Gómez *et al.* (1998), Carmona *et al.* (1999), Tejada (2001) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches señalan valores de actividad de agua similares a los obtenidos por nosotros, en los tres primeros meses de maduración. En esta misma variedad de queso y elaborado con coagulante vegetal liofilizado (*Cynara cardunculus*) Tejada y Fernández-Salguero (2003) señalan valores de actividad agua de 0,947 a los 90 días de maduración. En queso Manchego coagulado con cuajo animal, Poveda (2001) y Ballesteros (2002) detectaron tasas de actividad agua similares a las nuestras durante 150 y 365 días de maduración, respectivamente. Para esta misma variedad de queso, Fontecha *et al.* (1994) encontraron valores de  $a_w$  de 0,972 a los 15 días y de 0,944 a los 90 días de maduración, Poveda *et al.* (2004) valores de  $a_w$  de 0,970 y 0,918 a los 15 y 150 días de maduración, respectivamente y Corzo *et al.* (2000) y Poveda *et al.* (2003) hallaron tasas de  $a_w$  inferiores a las del presente trabajo. Marcos *et al.* (1985) detectaron valores medios de  $a_w$  de 0,945, 0,926, 0,944 y 0,919 en los quesos comerciales Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente. En queso comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero y Gómez (1997) señalan valores medios de actividad de agua de 0,931, 0,939 y 0,944, respectivamente. En queso Idiazábal Pérez-Elortondo *et al.* (1998) señalan tasas de  $a_w$  de 0,923 a los 90 días de maduración. Ferrazza *et al.* (2004) detectaron valores de actividad de agua muy similares a los nuestros en queso Zamorano madurado a 10 °C durante seis meses.

Durante los primeros estadios de la maduración la  $a_w$  va a influir de manera selectiva sobre aquellos microorganismos capaces de desarrollarse en el queso y sobre la actividad proteolítica de muchas de las enzimas que intervienen en el proceso madurativo. En el tramo final de la maduración los bajos valores de  $a_w$  alcanzados van a impedir el desarrollo de microorganismos patógenos productores de intoxicaciones e infecciones alimentarias. En el presente trabajo se ha establecido una correlación positiva estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre todos los microorganismos estudiados (aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, estafilococos, micrococos, bacterias ácido lácticas, levaduras y mohos) y la actividad de agua (Tabla 84).

#### **IV.A.1.2.2.- pH.**

En la Tabla 4 y Figura 6 se muestran el valor pH para los lotes de queso elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) durante el período de maduración considerado.

El tiempo de maduración afectó significativamente ( $p < 0,05$ ) a este parámetro mostrando una tendencia polinómica para todos los quesos estudiados. Así, se observó en todos los lotes de quesos una disminución del valor pH hasta el primer mes de maduración, para aumentar a partir del segundo mes hasta el final del período de maduración estudiado. Esta alcalinización en estadios avanzados de la maduración puede deberse a la hidrólisis de compuestos nitrogenados no proteicos. En este sentido se ha detectado en todos los quesos una correlación positiva muy significativa ( $p < 0,001$ ) entre el nitrógeno amoniacal ( $N-NH_3$ ) y el valor pH (Tabla 83). Esta evolución inicial descendente hasta los 15 ó 30 días de maduración para luego aumentar hasta el final de la maduración se ha señalado en varios tipos de quesos de oveja como de Los Pedroches (Fernández-Salguero, 1975; Fernández-Salguero y Sanjuán, 1999; Carmona *et al.*, 1999; Vioque *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2001; Tejada, 2001 y Vioque, 2002), queso Urbasa (Guindeo *et al.*, 1990), Idiazábal (Ibáñez *et al.*, 1995; Pérez-Elortondo *et al.*, 1998), Serra de Estrella (Sousa y Malcata, 1996b, 1997b), Torta del Casar (Pouillet *et al.*, 1991), La Serena (Fernández del Pozo *et al.*, 1988a; Núñez *et al.*, 1991a; Roa *et al.*, 1997) y Manchego (Fontecha *et al.*, 1994; Pavia *et al.*, 1999a).

En queso Manchego Núñez *et al.* (1986a) a los 60 días de maduración, Corzo *et al.* (2000), Ballesteros (2002) y Poveda *et al.* (2003, 2004) obtuvieron valores de pH similares a los nuestros y Poveda (2001) y García-Ruiz (1996) valores de pH ligeramente inferiores a los del presente trabajo. Pavia *et al.* (2000b) detectaron valores de pH de 5,07 y 4,80 a los 1 y 90 días de maduración, respectivamente. En queso Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, Marcos *et al.* (1985) hallaron valores medios de pH de 5,05, 5,18, 5,03 y 5,10, respectivamente. Fernández-Salguero y Gómez (1997) señalan valores medios de pH de 5,60, 5,23 y 5,36 para quesos Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra.

Carmona *et al.* (1999) en queso de Los Pedroches elaborado con coagulante vegetal detectaron una evolución y unos valores de pH similares a los nuestros, en los tres primeros meses de maduración.

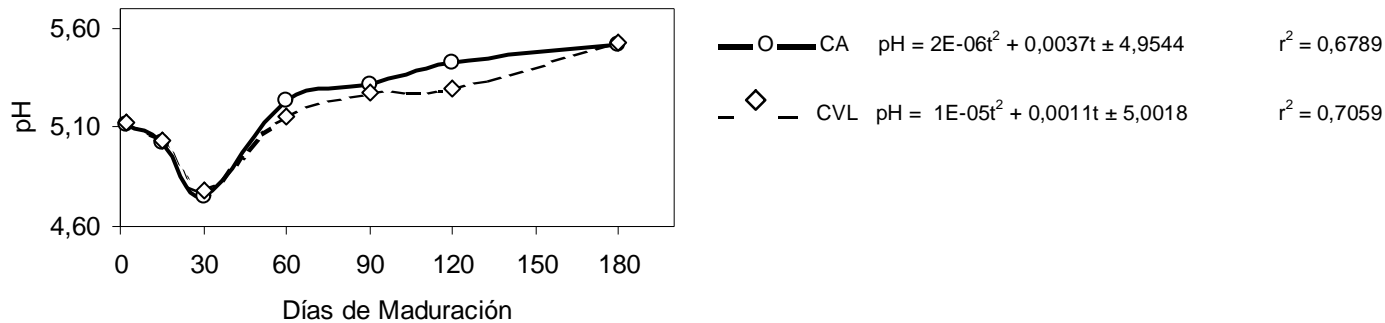
**Tabla 4.-** Valor pH de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>							
Lote CA1	5,11	4,99	4,58	5,20	5,29	5,28	5,38
Lote CA2	5,07	4,99	4,65	5,30	5,34	5,39	5,53
Lote CA3	5,18	5,09	5,05	5,22	5,33	5,61	5,66
x ± sd	5,12 ± 0,06 <sup>abcd</sup>	5,02 ± 0,06 <sup>abc</sup>	4,76 ± 0,25 <sup>a</sup>	5,24 ± 0,05 <sup>cdef</sup>	5,32 ± 0,03 <sup>cdef</sup>	5,43 ± 0,17 <sup>def</sup>	5,52 ± 0,14 <sup>ef</sup>
<b>CVL</b>							
LoteCVL1	5,11	5,05	4,65	5,20	5,24	5,30	5,40
Lote CVL2	5,17	5,02	4,69	5,26	5,29	5,21	5,73
Lote CVL3	5,11	5,05	5,00	5,01	5,30	5,38	5,46
x ± sd	5,13 ± 0,03 <sup>bcd</sup>	5,04 ± 0,02 <sup>abc</sup>	4,78 ± 0,19 <sup>ab</sup>	5,16 ± 0,13 <sup>cde</sup>	5,27 ± 0,03 <sup>cdef</sup>	5,30 ± 0,09 <sup>cdef</sup>	5,53 ± 0,18 <sup>f</sup>

<sup>a-f</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

112

**Figura 6.-** Evolución del pH a lo largo de la maduración.



Macedo *et al.* (2004) en queso Serra de Estrella y Ferrazza *et al.* (2004) en queso Zamorano hallaron valores de pH superiores a los del presente trabajo.

Los valores pH de los quesos elaborados con cuajo animal y los elaborados con coagulante vegetal liofilizado presentaron una evolución similar a lo largo del período de maduración considerado, coincidiendo con Sousa y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella, Freitas y Malcata (1996) en queso Picante y Sanjuán (1992), Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) y Gómez *et al.* (2001) en queso de Los Pedroches. Sin embargo, Núñez *et al.* (1991a) en queso de La Serena madurado 60 días a 12-14 ° C y 85-90 % de humedad relativa observaron en los quesos elaborados con coagulante vegetal valores de pH significativamente más altos ( $p < 0,05$ ) respecto de los elaborados con cuajo animal, debido a que la retención de suero en los primeros fue menor. Este hecho dio lugar a una menor concentración de lactosa, que al ser metabolizada por la flora láctica provocó un descenso menor del valor pH que en el caso de los quesos elaborados con cuajo animal.

Gaya *et al.* (1983, 1988), Medina *et al.* (1991), Carmona y Gómez (1994), Sousa y Malcata (1996b), Carmona *et al.* (1999), Fernández-García *et al.* (1999), Sánchez (1999), Poveda (2001) y Vioque (2002) en quesos de oveja elaborados con adición de cultivo iniciador han detectado valores de pH inferiores a los elaborados sin él debido fundamentalmente a la acción de la flora láctica sobre la lactosa de la leche de partida. Esta disminución del valor pH inducida por el cultivo iniciador produce una mayor inhibición de la flora contaminante y patógena, favoreciendo el desarrollo durante la maduración de otros microorganismos beneficiosos, mejorando de este modo la calidad higiénica y sanitaria de los quesos.

#### **IV.A.1.2.3.- Humedad.**

En la Tabla 5 se muestran los valores de humedad (g H<sub>2</sub>O/100 g de queso) y los resultados de la prueba test de Tukey de los lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) respecto al tiempo de maduración. En la Figura 7 se representa gráficamente la evolución de los valores medios de humedad de los quesos estudiados.

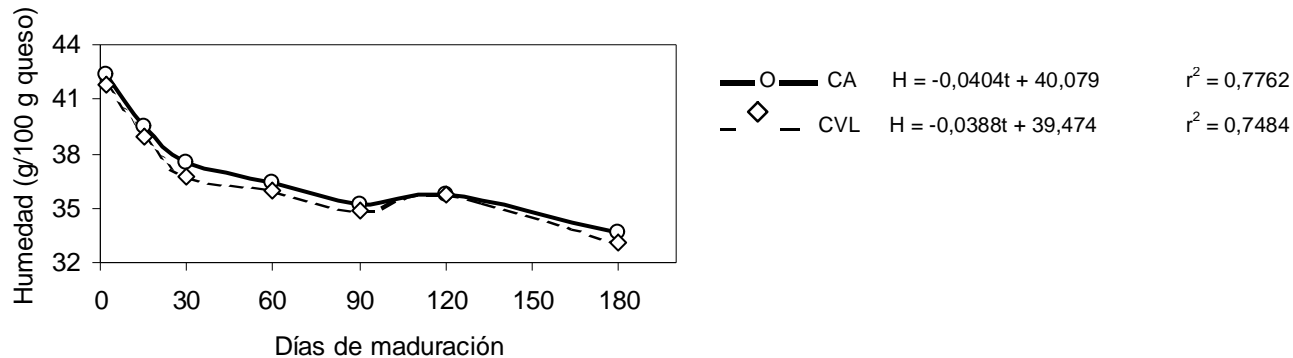
**Tabla 5.-** Contenido en humedad (g H<sub>2</sub>O/100 g de queso) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>							
Lote CA1	43,26	39,38	37,27	35,65	34,60	37,00	37,13
Lote CA2	44,35	40,27	38,16	36,52	35,34	36,80	34,32
Lote CA3	39,48	38,87	37,21	37,12	35,64	33,47	29,60
x ± sd	42,36 ± 2,56 <sup>a</sup>	39,51 ± 0,71 <sup>abc</sup>	37,55 ± 0,53 <sup>abcde</sup>	36,43 ± 0,74 <sup>bcde</sup>	35,19 ± 0,53 <sup>cde</sup>	35,76 ± 1,99 <sup>cde</sup>	33,68 ± 3,81 <sup>de</sup>
<b>CVL</b>							
LoteCVL1	43,18	39,89	36,03	35,16	34,52	37,00	35,40
Lote CVL2	43,60	39,60	36,71	35,87	35,53	36,90	34,30
Lote CVL3	38,55	37,45	37,30	36,78	34,40	33,30	29,57
x ± sd	41,78 ± 2,80 <sup>ab</sup>	38,98 ± 1,33 <sup>abcd</sup>	36,68 ± 0,64 <sup>abcde</sup>	35,94 ± 0,81 <sup>cde</sup>	34,82 ± 0,62 <sup>cde</sup>	35,73 ± 2,11 <sup>cde</sup>	33,09 ± 3,10 <sup>e</sup>

<sup>a-e</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

114

**Figura 7.-** Evolución de la humedad a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Coincidiendo con Sousa y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella y Fernández-Salguero y Sanjuán (1999), Fernández-Salguero *et al.* (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en queso de Los Pedroches no se han establecido diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes de humedad de los quesos elaborados con los dos coagulantes ensayados, si bien se observa que los contenidos medios en humedad de los lotes de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado fueron inferiores en los siete controles realizados respecto a los lotes fabricados con cuajo animal. Núñez *et al.* (1991a) en queso de La Serena, Freitas *et al.* (1997) en queso Picante y Gómez *et al.* (2001) y Sanjuán *et al.* (2002) en queso de Los Pedroches detectaron mayores porcentajes de humedad en los quesos elaborados con cuajo animal con respecto a los obtenidos con coagulante vegetal.

A lo largo de los seis meses de maduración estudiados los porcentajes de humedad disminuyeron significativamente ( $p < 0,001$ ) alrededor de un 11 %, reducción similar a la obtenida por Fontecha *et al.* (1994) para queso Manchego. En queso Idiazábal, Ibáñez *et al.* (1995) observaron una reducción del contenido de humedad del 15 %. En queso Manchego, Ballesteros (2002), Corzo *et al.* (2000) y Poveda *et al.* (2003, 2004) obtuvieron unos contenidos en humedad similares a los nuestros y García-Ruiz *et al.* (1998), Moreno *et al.* (1994a,b), Poveda (2001) y Picón *et al.* (1995) detectaron unas tasas de humedad superiores a las halladas en el presente trabajo. Para esta misma variedad de queso Pavia *et al.* (2000b) hallaron porcentajes de humedad de 47,70 % y 26,46 % a los 1 y 90 días de maduración, respectivamente. Sousa y Malcata (1997b) y Macedo *et al.* (2004) en queso Serra de Estrella madurado durante dos meses y Ferrazza *et al.* (2004) en queso Zamorano hallaron contenidos en humedad superiores e inferiores, respectivamente, a los del presente trabajo.

En queso de Los Pedroches Gómez *et al.* (1998), Carmona *et al.* (1999) en quesos elaborados con coagulante vegetal, Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) en quesos madurados a temperatura ambiente, Tejada (2001) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en quesos elaborados con cuajo animal, coagulante vegetal fresco y liofilizado, Fernández-Salguero *et al.* (2002) en quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado y Vioque (2002) en quesos coagulados con cuajo animal, *Cynara cardunculus* y *C. humilis* detectaron mayores contenidos en humedad respecto de los del presente trabajo, en los primeros 90 días de maduración.

En quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero y Gómez (1997) hallaron porcentajes medios de humedad de

29,6%, 35,1% y 36,4%, respectivamente. Marcos *et al.* (1985) detectaron contenidos medios en humedad de 37,5, 35,7, 33,2 y 29,4 g H<sub>2</sub>O/100 g de queso en quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente.

#### **IV.A.1.2.4.- Grasa.**

En la Tabla 6 y Figura 8 se muestran los valores de grasa de los lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo del período de maduración estudiado.

Según el contenido en grasa, en porcentaje de materia grasa sobre extracto seco, los quesos del presente trabajo se consideran grasos (Anónimo, 1991) al presentar unos porcentajes medios que varían entre 55,95 % a los 2 días y 54,46 % a los 180 días de maduración.

El tiempo de maduración modificó significativamente ( $p < 0,001$ ) el contenido graso de los quesos mostrando una evolución ascendente a lo largo del período madurativo considerado. Serrano (1995) en queso Manchego a los 6 meses de maduración obtuvieron contenidos de grasa del 34 % para quesos artesanales y 39 % para quesos de fabricación industrial. En queso de Los Pedroches Carmona *et al.* (1999), Fernández-Salguero (1975), Tejada (2001), Vioque (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) señalan porcentajes de grasa inferiores a los del presente estudio. Roa *et al.* (1997) en queso La Serena obtuvieron valores de grasa superiores a los obtenidos por nosotros en los tres primeros meses de maduración y González *et al.* (1991), Roa *et al.* (1999) y Marsilla *et al.* (1979) contenidos de grasa inferiores a los del presente trabajo. En queso Serra de Estrella Sousa y Malcata (1996b, 1997b) observaron porcentajes de grasa inferiores a los nuestros y Macedo *et al.* (2004) detectaron valores de grasa similares a los del presente trabajo, en los dos primeros meses de maduración. En quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero y Gómez (1997) detectaron tasas medias de grasa de 35,2, 32,8 y 31,1 g/100 g de queso, respectivamente. Marcos *et al.* (1985) observaron porcentajes medios de grasa de 33,6 %, 31,1 %, 37,8 % y 38,8 % en quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente. En queso Manchego y Roquefort, Mataix *et al.* (1995) señalan porcentajes de grasa de 32 % en ambas variedades.

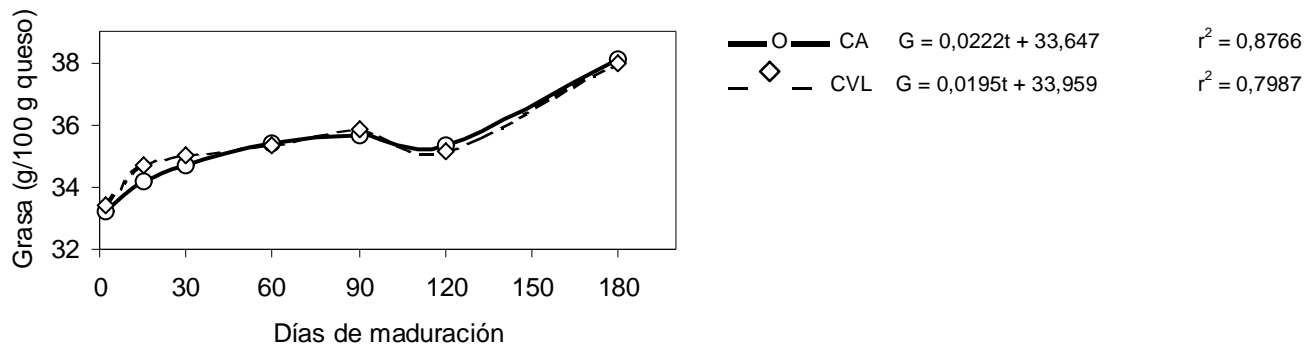
**Tabla 6.-** Contenido en grasa (g/100 g de queso) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>							
Lote CA1	33,75	34,00	34,50	35,75	34,50	35,00	38,00
Lote CA2	32,00	34,25	35,00	35,50	36,00	34,00	37,00
Lote CA3	34,00	34,25	34,50	35,00	36,50	37,00	39,25
x ± sd	33,25 ± 1,09 <sup>a</sup>	34,17 ± 0,14 <sup>abc</sup>	34,67 ± 0,29 <sup>abc</sup>	35,42 ± 0,38 <sup>abc</sup>	35,67 ± 1,04 <sup>bcd</sup>	35,33 ± 1,53 <sup>abc</sup>	38,08 ± 1,13 <sup>e</sup>
<b>CVL</b>							
Lote CVL1	33,00	35,00	35,25	35,50	36,00	35,00	38,00
Lote CVL2	33,00	34,50	35,00	35,50	36,00	34,00	38,00
Lote CVL3	34,25	34,50	34,75	35,00	35,50	36,50	38,00
x ± sd	33,42 ± 0,72 <sup>ab</sup>	34,67 ± 0,29 <sup>abc</sup>	35,00 ± 0,25 <sup>abc</sup>	35,33 ± 0,29 <sup>abc</sup>	35,83 ± 0,29 <sup>cde</sup>	35,17 ± 1,26 <sup>abc</sup>	38,00 ± 0,00 <sup>de</sup>

<sup>a-e</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

117

**Figura 8.-** Evolución de la grasa a lo largo de la maduración.





El tipo de coagulante empleado no afectó significativamente ( $p>0,05$ ) a los contenidos en grasa de los quesos estudiados aunque los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado presentaron contenidos de grasa ligeramente superiores, en varios de los siete controles considerados, a los de los quesos elaborados con cuajo animal. Sousa y Malcata (1997b) en lotes de queso Serra de Estrella, y Vioque (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en queso de Los Pedroches tampoco observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los contenidos en grasa de los lotes de queso elaborados con cuajo animal y los obtenidos mediante coagulante vegetal. No obstante Sanjuán (1992) y Sanjuán *et al.* (2002) en queso de Los Pedroches y Freitas y Malcata (1996) en queso Picante detectaron valores medios de grasa superiores en los quesos elaborados con coagulante vegetal respecto de los fabricados con cuajo animal.

#### **IV.A.1.2.5.- Proteína.**

En la Tabla 7 y Figura 9 se recogen los contenidos en proteína de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) durante los seis meses de maduración estudiados.

El tiempo de maduración afectó significativamente ( $p<0,001$ ) al contenido de proteína de los quesos, observándose una evolución ascendente durante el período madurativo. Al igual que la grasa, la proteína aumentó significativamente a lo largo de la maduración a causa de la pérdida de agua que experimenta el queso.

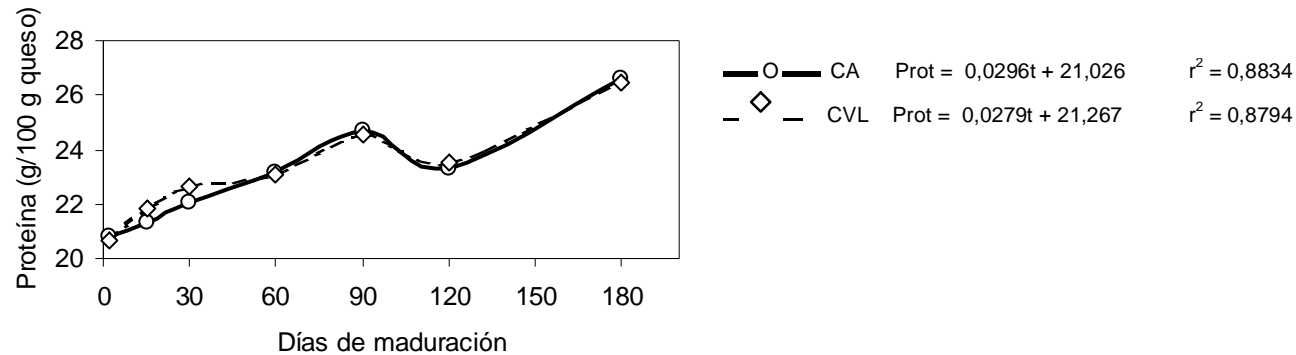
Poveda (2001), Ballesteros (2002) y Poveda *et al.* (2003, 2004) en queso Manchego, Sousa y Malcata (1996b, 1997a,b) y Macedo *et al.* (2004) en queso Serra de Estrella, Fernández-Salguero y Sanjuán, (1999) y Tejada y Fernández-Salguero *et al.* (2003) en queso de Los Pedroches y Roa *et al.* (1997, 1999) en queso de La Serena detectaron unos porcentajes de proteína similares a los del presente trabajo. Corzo *et al.* (2000) en queso Manchego hallaron unas tasas de proteína algo inferiores a las nuestras. Fernández-Salguero (1975), Gómez *et al.* (1998), Carmona *et al.* (1999) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches y Marsilla (1979), González *et al.* (1997) en queso La Serena observaron unos valores de proteína superiores a los del presente trabajo.

**Tabla 7.-** Contenido en proteína (g/100 g de queso) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración							
	2	15	30	60	90	120	180	
<b>CA</b>								
Lote CA1	21,32	21,89	22,67	23,66	25,04	21,74	26,37	
Lote CA2	20,21	20,77	21,45	22,76	24,57	23,15	26,44	
Lote CA3	20,99	21,28	21,95	23,01	24,45	25,09	26,94	
x ± sd	20,54 ± 0,57 <sup>ab</sup>	21,31 ± 0,56 <sup>abc</sup>	22,02 ± 0,62 <sup>abc</sup>	23,14 ± 0,47 <sup>bcd</sup>	24,68 ± 0,31 <sup>de</sup>	23,33 ± 1,68 <sup>cd</sup>	26,58 ± 0,31 <sup>e</sup>	
<b>CVL</b>								
Lote CVL1	20,15	22,07	22,92	23,28	25,01	22,04	26,31	
Lote CVL2	20,32	21,46	22,68	22,92	24,69	22,71	26,57	
Lote CVL3	21,42	21,97	22,35	23,02	23,85	25,83	26,61	
x ± sd	20,63 ± 0,69 <sup>a</sup>	21,83 ± 0,33 <sup>abc</sup>	22,65 ± 0,29 <sup>abcd</sup>	23,07 ± 0,19 <sup>abcd</sup>	24,52 ± 0,60 <sup>de</sup>	23,53 ± 2,02 <sup>cd</sup>	26,50 ± 0,16 <sup>e</sup>	

<sup>a-f</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 9.-** Evolución de la proteína a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Marcos *et al.* (1985) detectaron valores medios de proteína de 23,0, 26,3, 23,3 y 24,7 g/100 g de queso en quesos comerciales Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente. En quesos Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero y Gómez (1997) hallaron porcentajes medios de proteína de 28,8%, 26,3% y 28,0%, respectivamente. Mataix *et al.* (1995) en quesos Manchego y Roquefort señalan porcentajes de proteína de 32 % y 18,70 %, respectivamente.

No se han detectado diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre el porcentaje de proteína de los quesos elaborados con cuajo animal y los elaborados con coagulante vegetal. Sousa y Malcata (1997a) en queso Serra de Estrella y Vioque (2002), Sanjuán *et al.* (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en queso de Los Pedroches tampoco encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de proteína de los quesos elaborados con cuajo animal y con coagulante vegetal. Sin embargo Freitas y Malcata, (1996) detectaron en queso Picante elaborado con cuajo animal porcentajes de proteína significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) a los observados en los quesos obtenidos mediante coagulante vegetal.

### **IV.A.1.2.6.- Cenizas.**

El contenido en ceniza de los quesos, expresada como g/100 g de queso, elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo del período de estudio se muestran en la Tabla 8 y en la Figura 10.

Los contenidos de ceniza de los quesos se vieron afectados de manera significativa ( $p < 0,001$ ) por el tiempo de maduración. Este aumento en el contenido en cenizas a lo largo de la maduración es causada por la pérdida de humedad de los quesos. El contenido de cenizas de los quesos del presente trabajo presentó una evolución muy similar a la detectada para el cloruro sódico (Figuras 10 y 11). El elevado incremento detectado desde los 2 hasta los 15 días de maduración posiblemente coincida con la difusión de sal desde la superficie del queso hacia el interior de la pasta.

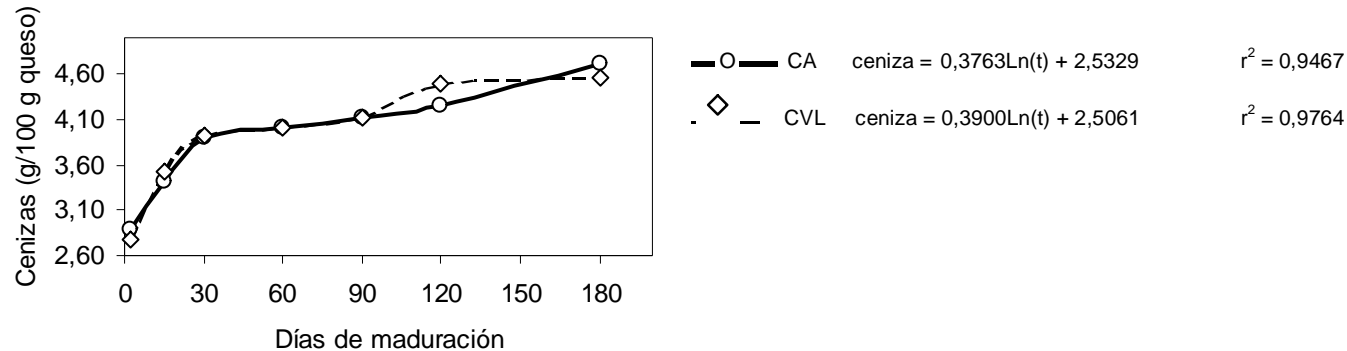
**Tabla 8.-** Contenido en cenizas (g/100 g de queso) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	2,86	3,62	3,90	3,99	4,16	4,58	4,83
Lote CA2	2,83	3,32	3,86	4,00	4,10	4,04	4,83
Lote CA3	2,97	3,29	3,94	4,01	4,07	4,17	4,50
x ± sd	2,88 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,41 ± 0,18 <sup>b</sup>	3,90 ± 0,04 <sup>cd</sup>	4,00 ± 0,01 <sup>d</sup>	4,11 ± 0,04 <sup>de</sup>	4,26 ± 0,28 <sup>def</sup>	4,72 ± 0,19 <sup>fg</sup>
CVL							
LoteCVL1	2,80	3,67	3,93	4,03	4,20	4,53	4,33
Lote CVL2	2,74	3,37	3,89	4,01	4,08	4,63	4,67
Lote CVL3	2,82	3,55	3,95	4,02	4,10	4,34	4,67
x ± sd	2,79 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,53 ± 0,15 <sup>bc</sup>	3,92 ± 0,03 <sup>cd</sup>	4,02 ± 0,01 <sup>d</sup>	4,12 ± 0,06 <sup>de</sup>	4,50 ± 0,15 <sup>efg</sup>	4,56 ± 0,19 <sup>g</sup>

<sup>a-g</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

121

**Figura 10.-** Evolución de las cenizas a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Carmona (1994), Tejada (2001) y Vioque (2002) detectaron en queso de Los Pedroches elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal, en los tres primeros meses de maduración, valores de cenizas similares a los obtenidos por nosotros mientras que Fernández-Salguero (1975), Sanjuán (1992) y Sanjuán *et al.* (2002) obtuvieron contenidos en cenizas superiores a los de la presente memoria.

Fernández-Salguero y Gómez (1997) detectaron valores medios de cenizas de 4,4, 5,0 y 4,9 g/100 g de queso en quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra, respectivamente. En quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, Marcos *et al.* (1985) observaron porcentajes medios de cenizas de 4,6 %, 4,7 %, 4,0 % y 4,8 %, respectivamente.

No se han detectado diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes de cenizas de los quesos elaborados con cuajo animal y los elaborados con coagulante vegetal liofilizado (Tabla 8) coincidiendo con Sanjuán *et al.* (2002), Vioque (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en quesos de Los Pedroches elaborados con ambos tipos de coagulante.

### **IV.A.1.2.7.- Cloruro Sódico.**

En la Tabla 9 y Figura 11 se muestran los contenidos en cloruro sódico de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

El tiempo de maduración afectó significativamente ( $p < 0,001$ ) al contenido en ClNa de los quesos del presente trabajo. El mayor incremento durante los primeros 15 días de maduración se debe a la difusión de cloruro sódico como consecuencia de la adición de sal al queso en el proceso de fabricación. Geurts *et al.* (1980) y Guinee y Fox (1993) señalan como factores que influyen en el contenido salino del queso la mayor o menor superficie del mismo, el tiempo de salado, la concentración de ClNa, la temperatura, el valor pH del queso y de la sal, el contenido en humedad inicial de la cuajada, las condiciones ambientales y la captación de sal durante la maduración.

En queso Manchego, Poveda (2001) observó unos porcentajes de ClNa que oscilaron desde los 1,42 % a los 15 días hasta los 2,02 % a los 150 días de maduración. Poveda *et al.* (2004) y Corzo *et al.* (2000), también en queso Manchego, detectaron unos contenidos en cloruro sódico superiores a los obtenidos por nosotros y Ballesteros (2002) señala valores de cloruro sódico inferiores a los nuestros.

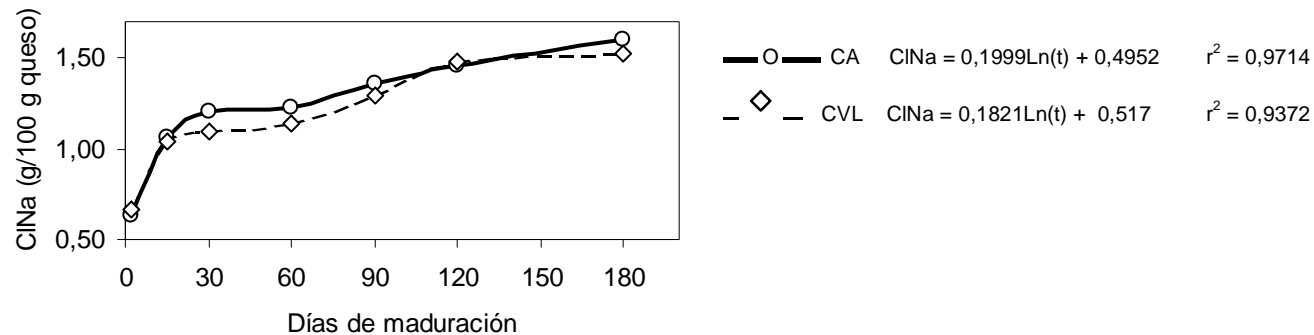
**Tabla 9.-** Contenido en cloruro sódico (g/100 g de queso) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	0,52	1,16	1,30	1,22	1,40	1,71	2,01
Lote CA2	0,55	0,95	1,22	1,20	1,32	1,31	1,38
Lote CA3	0,83	1,06	1,11	1,25	1,36	1,35	1,42
x ± sd	0,63 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,11 <sup>abcd</sup>	1,21 ± 0,10 <sup>cdef</sup>	1,22 ± 0,03 <sup>cdef</sup>	1,36 ± 0,04 <sup>cdef</sup>	1,45 ± 0,22 <sup>cdef</sup>	1,60 ± 0,35 <sup>ef</sup>
CVL							
Lote CVL1	0,77	1,02	1,09	1,21	1,46	1,63	1,53
Lote CVL2	0,61	1,04	1,09	1,01	1,22	1,48	1,55
Lote CVL3	0,63	1,06	1,11	1,20	1,19	1,34	1,49
x ± sd	0,67 ± 0,08 <sup>ab</sup>	1,04 ± 0,02 <sup>abc</sup>	1,10 ± 0,01 <sup>bcd</sup>	1,14 ± 0,11 <sup>cde</sup>	1,29 ± 0,15 <sup>cdef</sup>	1,48 ± 0,15 <sup>def</sup>	1,52 ± 0,03 <sup>f</sup>

<sup>a-f</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

123

**Figura 11.-** Evolución del cloruro sódico a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

En esta misma variedad de queso Fontecha *et al.* (1994) y Garcia-Ruíz *et al.* (1998) observaron un aumento de ClNa hasta los 60 días de maduración para luego mantenerse constante a partir de esa fecha, coincidiendo con Fernández del Pozo (1988a) en queso La Serena y Guindeo *et al.* (1990) en queso Urbasa. En queso Serra de Estrella, Macedo y Malcata (1996b, 1997a) obtuvieron valores de cloruro sódico superiores a los del presente trabajo. Núñez *et al.* (1991a) en queso de La Serena obtuvo contenidos de ClNa algo inferiores a los obtenidos por nosotros y Marsilla (1979), Fernández del Pozo *et al.* (1988a), González *et al.* (1991, 1997), Medina *et al.* (1991) y Roa *et al.* (1997, 1999), valores de ClNa superiores a los de la presente memoria.

En queso de Los Pedroches elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal Carmona (1994), Tejada (2001) y Vioque (2002) detectaron porcentajes de cloruro sódico similares a los obtenidos por nosotros mientras que Fernández-Salguero (1975), Sanjuán (1992) y Sanjuán *et al.* (2002) obtuvieron valores de ClNa superiores a los de la presente memoria. En queso Zamorano madurado durante 6 meses Ferrazza *et al.* (2004) hallaron tasas de cloruro sódico ligeramente inferiores a las nuestras.

Los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado y cuajo animal presentaron contenidos similares de cloruro sódico, no observándose diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre ellos. En este sentido Sanjuán *et al.* (2002) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches tampoco detectaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los contenidos de cloruro sódico de quesos elaborados con coagulante vegetal y los coagulados con cuajo animal.

### **IV.A.1.2.8.- Ácido Láctico.**

En la Tabla 10 y en la Figura 12 se muestran los valores de acidez, expresada en porcentaje de ácido láctico, de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL).

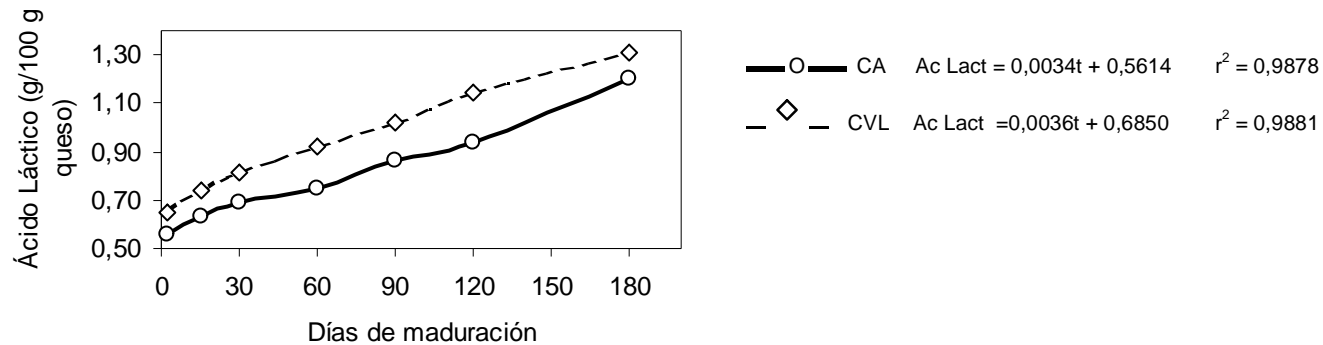
El tiempo de maduración afectó significativamente ( $p<0,05$ ) a los contenidos de ácido láctico de los quesos estudiados. Carmona *et al.* (1999) en queso de Los Pedroches madurado durante tres meses señalan valores similares a los nuestros.

**Tabla 10.-** Contenido en ácido láctico (g/100g queso) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	0,50	0,61	0,69	0,72	0,83	0,86	1,48
Lote CA2	0,57	0,60	0,68	0,79	0,80	0,81	0,84
Lote CA3	0,60	0,68	0,71	0,73	0,95	1,14	1,28
x ± sd	0,56 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,69 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,75 ± 0,04 <sup>abc</sup>	0,86 ± 0,08 <sup>abcd</sup>	0,94 ± 0,18 <sup>abcde</sup>	1,20 ± 0,33 <sup>de</sup>
CVL							
Lote CVL1	0,72	0,76	0,87	0,97	1,08	1,19	1,26
Lote CVL2	0,64	0,71	0,77	0,90	1,02	0,93	1,11
Lote CVL3	0,60	0,75	0,81	0,91	0,96	1,31	1,56
x ± sd	0,65 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,74 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,82 ± 0,05 <sup>abcd</sup>	0,93 ± 0,04 <sup>abcde</sup>	1,02 ± 0,06 <sup>bcde</sup>	1,14 ± 0,19 <sup>cde</sup>	1,31 ± 0,23 <sup>e</sup>

<sup>a-e</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

**Figura 12.-** Evolución del ácido láctico a lo largo de la maduración.





## Resultados y Discusión

En esta misma variedad de queso Sanjuán (1992), Tejada (2001), Gómez *et al.* (2001), Sanjuán *et al.* (2002) y Vioque (2002) encontraron contenidos en ácido láctico superiores a los detectados por nosotros. Marcos *et al.* (1985) observaron contenidos medios en ácido láctico de 1,4, 1,9, 1,7 y 1,6 g/100 g de queso en quesos comerciales Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente. En quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero y Gómez (1997) detectaron porcentajes de ácido láctico de 1,9 %, 1,5 % y 1,4%, respectivamente.

La acidez titulable expresada como ácido láctico presentó una evolución ascendente a lo largo de la maduración con valores más altos en los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado respecto de los elaborados con cuajo animal (Tabla 10 y Figura 12). Teniendo en cuenta que la lactosa es metabolizada y desaparece durante los primeros días de la maduración, a los 14 días en queso de Los Pedroches (Sanjuán, 1992) y a los 21 días en queso Serra de Estrella (Macedo y Malcata, 1997a), coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial de las bacterias ácido lácticas (Macedo *et al.*, 1995), el incremento de la acidez detectado en los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado debe ser atribuido a la mayor formación de compuestos de bajo peso molecular, como son aminoácidos libres, ácidos grasos libres, etc. Diversos autores han detectado mayores porcentajes de acidez en quesos elaborados con coagulante vegetal respecto de los coagulados con cuajo animal (Sanjuán, 1992; Gómez *et al.*, 2001; Vioque, 2002; Tejada y Fernández-Salguero, 2003).

### IV.A.1.3.- ANALISIS DISCRIMINANTE.

El análisis discriminante es un tipo de análisis multivariante, exploratorio y predictivo basado en clasificar a los individuos de una población en grupos según los valores de las variables analizadas. Para ello se determinan las distancias entre los grupos en el espacio multidimensional mediante el cálculo de las denominadas funciones discriminantes. Además esta técnica de clasificación permite predecir a partir de las funciones discriminantes obtenidas la pertenencia de una muestra a uno u otro grupo en función de los valores de sus variables.

## Resultados y Discusión

A la hora de llevar a cabo este análisis discriminante se empleó el método estándar con una tolerancia de 0,01. La finalidad de aplicación de este método estadístico fue triple:

- Evaluar si con relación a las variables físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales estudiadas se detectan diferencias entre quesos con diferente tiempo de maduración (2, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días) y elaborados con diferente coagulante (cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado).
- Hallar las variables con mayor capacidad para discriminar los distintos grupos de quesos estudiados, es decir, las características con las que más se diferencien los grupos.
- Obtener las funciones discriminantes que puedan utilizarse para predecir a qué grupo pertenece cada queso y la distancia establecida entre los diferentes grupos.

Para conocer en el modelo estadístico aquellas variables con mayor capacidad discriminante está el estadístico Lambda de Wilks que es el cociente entre el determinante de la matriz de variación intragrupos y el determinante de la variación total, y su distribución de probabilidad asociada, el valor F. Lambda de Wilks toma valores entre 0 y 1. Cuanto más próximo a 0 sea Lambda de Wilks, y por lo tanto mayor sea su valor F, mayor será la capacidad de discriminación de la variable.

### **IV.A.1.3.1.- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración.**

En la Tabla 11 se muestran los valores de Lambda de Wilks y los valores F de las variables estudiadas en los apartados de  $a_w$ , valor pH y composición química de los quesos del presente trabajo. El valor pH y el contenido en cenizas y grasa son las variables que más han contribuido en la diferenciación de los distintos intervalos de maduración con valores de Lambda de Wilks de 0,25, 0,43 y 0,61 y valores F de 14,21, 6,14 y 3,02, respectivamente. La  $a_w$  y el contenido en ácido láctico fueron las variables con valor de Lambda de Wilks próximo a la unidad y un valor F pequeño, es decir, con menor capacidad discriminante entre los siete intervalos de maduración considerados.

## Resultados y Discusión

**Tabla 11.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	aw	pH	humedad	grasa	proteína	ceniza	CINa	ácido láctico
Lambda de Willks	0,85	0,25	0,71	0,61	0,65	0,43	0,72	0,83
Valor F	0,80	14,21	1,91	3,02	2,54	6,14	1,81	0,93

En la Tabla 12 se pueden observar las distancias establecidas entre los diferentes intervalos de maduración considerados donde las mayores distancias se establecieron entre los quesos con 2 y 180 días de maduración.

**Tabla 12.-** Distancias entre grupos de los cuadrados de Mahalanobis.

	2	15	30	60	90	120	180
2	0	38	112	126	180	222	380
15	38	0	25	32	69	96	209
30	112	25	0	25	63	86	175
60	126	32	25	0	13	23	86
90	180	69	63	13	0	11	46
120	222	96	86	23	11	0	40
180	380	209	175	86	46	40	0

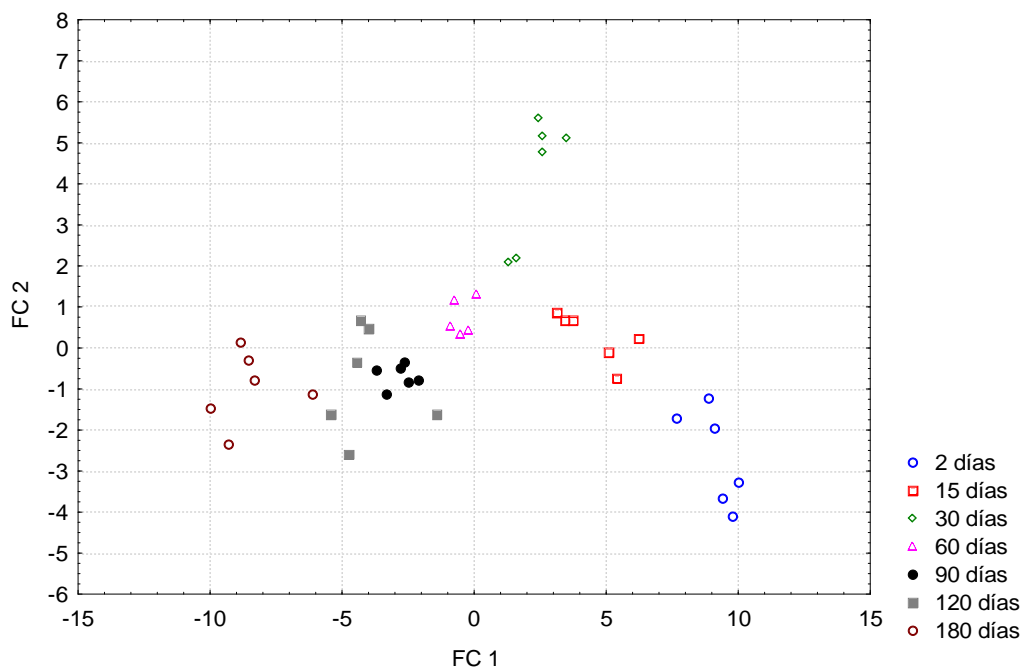
Con las variables seleccionadas en el modelo estadístico se establecen las funciones discriminantes y a partir de éstas la matriz de clasificación (Tabla 13) en la cual el 93 % de los quesos estudiados fueron clasificados correctamente siendo los quesos con 30 y 120 días de maduración los dos únicos intervalos madurativos que no clasificaron correctamente a todos sus individuos.

**Tabla 13.-** Número de muestras correctamente clasificadas mediante las funciones discriminantes.

	Correcto (%)	2	15	30	60	90	120	180
2	100	6	0	0	0	0	0	0
15	100	0	6	0	0	0	0	0
30	67	0	0	4	2	0	0	0
60	100	0	0	0	6	0	0	0
90	100	0	0	0	0	6	0	0
120	83	0	0	0	0	1	5	0
180	100	0	0	0	0	0	0	6
Total Correcto	93	6	6	4	8	7	5	6

A través de las dos primeras funciones canónicas se representan en el diagrama de dispersión (Figura 13) los quesos con 2, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días de maduración.

**Figura 13.-** Representación de los quesos mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.



#### IV.A.1.3.2.- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante.

Como se puede observar en la Tabla 14, el contenido en ácido láctico y en cloruro sódico fueron las variables que presentaron mayor capacidad discriminante de los quesos elaborados con los dos tipos de coagulantes ensayados. El resto de variables estudiadas presentaron unos valores de Lambda de Wilks próximos a la unidad y por tanto escasa capacidad discriminante entre los quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado. No obstante todas las variables fueron incluidas en el modelo estadístico al objeto de obtener el mayor porcentaje de muestras correctamente clasificadas.

**Tabla 14.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	$a_w$	pH	humedad	grasa	proteína	ceniza	CiNa	ácido láctico
Lambda de Wilks	0,99	0,93	1,00	0,98	0,98	0,97	0,83	0,73
Valor F	0,36	2,38	0,03	0,51	0,58	1,04	6,81	11,99

Con la función de clasificación se clasificaron correctamente el 83 % de los quesos estudiados, según se muestra en la Tabla 15, siendo peor clasificados los

### Resultados y Discusión

quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado, donde 4 de ellos fueron incorrectamente clasificados como quesos fabricados con cuajo animal.

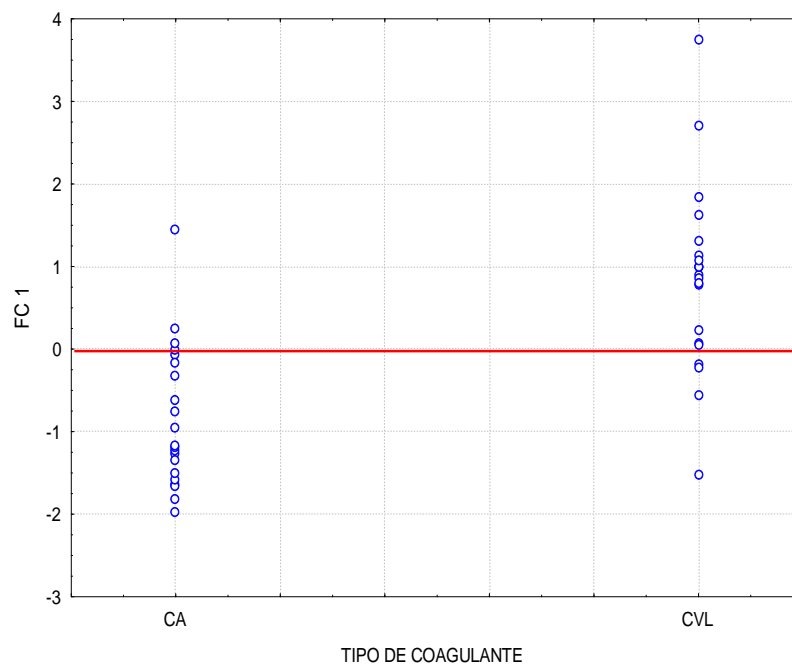
**Tabla 15.**-Numero de muestras correctamente clasificadas mediante la función discriminantes.

	Correcto (%)	CA	CVL
CA	86	18	3
CVL	81	4	17
Total Correcto	83	22	20

Mediante la función discriminante se representan en el diagrama de dispersión (Figura 14) los quesos elaborados con cuajo animal y con coagulante vegetal liofilizado.

Los quesos elaborados con cuajo animal correctamente clasificados aparecen en la parte inferior izquierda del cuadrante y los obtenidos con coagulante vegetal liofilizado en la parte superior derecha. Se observa como hay 7 quesos (3 obtenidos con cuajo animal y 4 elaborados coagulante vegetal liofilizado), con puntuaciones discriminantes próximas a cero, que no se han clasificado correctamente.

**Figura 14.**- Representación de los quesos en función del tipo de coagulante mediante la función canónica FC1.



## **IV.A.2.- COMPONENTES NITROGENADOS.**

### **IV.A.2.1.- EVOLUCIÓN DE LAS FRACCIONES NITROGENADAS ANALIZADAS.**

#### **IV.A.2.1.1.- Nitrógeno soluble (NS).**

En las Tabla 16 y Figura 15 se recogen los valores de nitrógeno soluble (NS) expresado como porcentaje del nitrógeno total (NT) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) durante las diferentes etapas del proceso de maduración considerado.

El porcentaje de nitrógeno total solubilizado (NS) presentó una evolución ascendente durante los seis meses de maduración estudiados afectándose significativamente ( $p < 0,001$ ) por el tiempo de maduración. Este parámetro tradicionalmente ha sido considerado un índice de la extensión de la maduración del queso, reflejando el alcance de los fenómenos de proteolisis en el proceso madurativo. Esta fracción nitrogenada aumentó desde valores de 5,74 % y 11,43 % a los 2 días de maduración hasta tasas de 30,68 % y 44,93 % a los 180 días de maduración en quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, respectivamente.

Ballesteros (2002) en queso Manchego artesano elaborado con cuajo animal obtuvieron unos valores de NS (en porcentaje de NS/NT) que oscilaron desde los 7,65 % a los 15 días hasta los 24,65 % a los 180 días de maduración. Fontecha *et al.* (1994) en esta misma variedad de queso elaborado con cuajo animal y con cultivo iniciador y madurado a 11 °C y 85 % de humedad relativa señalan contenidos en NS de 6,5 g/100 g NT y 23,8 g/100 g NT a los 2 y 90 días de maduración, respectivamente, muy similares a los detectados por Mora (1979), Mora y Marcos (1982) y Picón *et al.* (1996) pero algo superiores a los observados por Núñez *et al.* (1986a). García-Ruiz *et al.* (1998) en quesos tipo Manchego semindustriales coagulados con cuajo animal señalan porcentajes de NS respecto del nitrógeno total que aumentaron desde los 17,14 % a los 15 días hasta los 28,87 % a los 150 días de maduración.

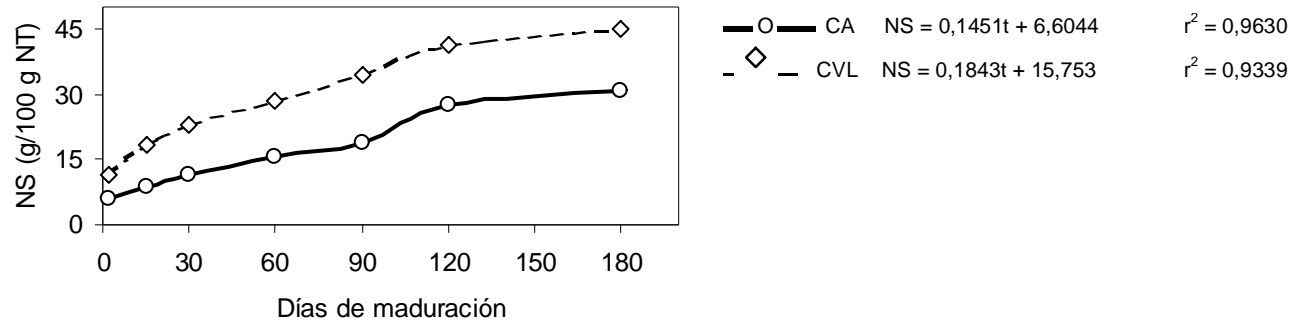
**Tabla 16.-** Contenido en nitrógeno soluble (g/100 g NT) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	6,69	8,10	11,09	15,60	19,91	29,30	33,05
Lote CA2	6,27	7,73	10,28	17,55	18,33	31,08	34,10
Lote CA3	4,25	10,48	12,64	13,25	17,97	22,55	24,89
x ± sd	5,74 ± 1,31 <sup>a</sup>	8,77 ± 1,49 <sup>ab</sup>	11,34 ± 1,20 <sup>ab</sup>	15,47 ± 2,15 <sup>abc</sup>	18,73 ± 1,03 <sup>bcd</sup>	27,64 ± 4,50 <sup>def</sup>	30,68 ± 5,04 <sup>ef</sup>
CVL							
Lote CVL1	10,40	19,71	21,85	27,98	33,48	43,67	48,60
Lote CVL2	13,37	17,53	25,20	29,07	37,40	46,30	49,50
Lote CVL3	10,52	18,45	21,78	28,35	32,21	33,57	36,70
x ± sd	11,43 ± 1,68 <sup>ab</sup>	18,56 ± 1,09 <sup>bcd</sup>	22,94 ± 1,95 <sup>cde</sup>	28,47 ± 0,55 <sup>def</sup>	34,36 ± 2,70 <sup>fg</sup>	41,18 ± 6,72 <sup>gh</sup>	44,93 ± 7,15 <sup>h</sup>

<sup>a-h</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

132

**Figura 15.-** Evolución del nitrógeno soluble a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Poveda (2001) en lotes de queso Manchego elaborados en invierno observaron contenidos de NS similares a los del presente trabajo y Poveda *et al.* (2004) valores de NS que oscilaron desde los 13,5 g/100 g NT a los 15 días hasta los 25,6 g/100 g NT a los 150 días de maduración. Uceda *et al.* (1994a) obtuvieron un porcentaje de 16,78 % de NS en queso Manchego con 60 días de maduración.

Ibáñez *et al.* (1995) en queso Idiazábal elaborado con cuajo animal obtuvieron porcentajes de NS/NT de 8,38 % y 16,84 % a los 15 y 180 días de maduración, respectivamente. En queso Urbasa coagulado con cuajo animal, Guindeo *et al.* (1990) señalan porcentajes de NS/NT del 28,6 % a los 90 días de maduración. Marcos *et al.* (1985) detectaron contenidos en nitrógeno soluble de 25,9, 44,8, 29,0 y 26,2 g/100 g NT en quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente. En quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra, Fernández-Salguero y Gómez (1997) hallaron porcentajes de NS/NT de 22,5 %, 21,0 % y 19,0 %, respectivamente. Taborda *et al.* (2003) observaron porcentajes de nitrógeno soluble respecto del nitrógeno total de 16,37 %, 22,47 %, 19,21 %, 22,38 % y 38,99 % para quesos Roncal, Manchego, Mahón, Idiazábal y Cabrales, respectivamente, con 120 días de maduración y elaborados con cuajo animal. En quesos comerciales de vena azul europeos Fernández-Salguero (2004) señala valores de NS superiores al 56 %.

Vioque (2002), Fernández-Salguero *et al.* (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en queso de Los Pedroches elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal y madurado hasta los 90 días observaron valores de nitrógeno soluble similares a los del presente trabajo. En esta misma variedad de queso, Sanjuán *et al.* (2002) señalan un aumento del NS en 100 días de maduración desde el 6,38 % y el 13,64 % NS/NT hasta el 23,11 % y el 32,62 % NS/NT para quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal fresco, respectivamente, y Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) detectaron porcentajes de NS/NT de 22,6 % y 31,6 % para quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal, respectivamente, a los 100 días de maduración.

A los 60 días de maduración en quesos miniatura (peso aproximado de 20 g) tipo Cheddar, O'Mahony *et al.* (2003) detectaron porcentajes de NS/NT de 5,77 % y 10,46 % para quesos elaborados con cuajo animal y *Cynara cardunculus*, respectivamente.

Núñez *et al.* (1991a) y Roa *et al.* (1997, 1999) en queso de La Serena elaborado con coagulante vegetal y madurado durante 60 días a 10-14 °C y 85-90 % de



## Resultados y Discusión

humedad relativa señalan valores de nitrógeno soluble superiores a los del presente trabajo. Fernández del Pozo *et al.* (1988a) en esta misma variedad de queso elaborado con *Cynara cardunculus* y madurado bajo condiciones ambientales también observaron contenidos de NS más elevados que los obtenidos por nosotros, mostrando una evolución similar a la citada con anterioridad para esta variedad de queso.

Freitas *et al.* (1997) y Freitas y Malcata (1998b) detectaron valores entre 10,9 y 25,2 g NS/100 g NT en queso Picante elaborado con cuajo animal a lo largo de seis meses de maduración. En queso Serra de Estrella elaborado con coagulante vegetal y madurado durante 68 días (Sousa y Malcata, 1997a,b), y a lo largo de 35 días de maduración (Macedo *et al.* 1996c; Macedo y Malcata, 1997e) el contenido en NS aumentó durante todo el período madurativo (realizado a temperaturas de 6-9 °C y humedades relativas de 92-95 %), habiéndose observado valores superiores de nitrógeno soluble a los de esta memoria. En esta misma variedad de queso Macedo *et al.* (2004) obtuvieron, en los dos primeros meses de maduración, valores de NS similares a los del presente trabajo.

Factores como la temperatura y la humedad relativa durante el proceso de maduración, la cantidad de coagulante añadido (sobre todo en el caso de los coagulantes vegetales frescos que no se encuentran debidamente estandarizados), la concentración de sal y el valor pH del queso van a influir sobre la proteólisis de las caseínas y en la aparición de los primeros productos de su degradación y explican estas variaciones en el contenido de NS entre los diferentes trabajos consultados.

Otro factor puede ser la adición o no de cultivo iniciador, aunque existen resultados contradictorios respecto al papel del cultivo iniciador en los contenidos en nitrógeno soluble de quesos de oveja. En este sentido Medina *et al.* (1991) en lotes de quesos de La Serena y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches elaborados con adición de cultivo iniciador detectaron porcentajes de NS/NT algo inferiores a los detectados en quesos elaborados sin adición de cultivo iniciador. La explicación de estos autores es que la adición de cultivos iniciadores provoca una disminución en la degradación de las  $\alpha_{S1}$  y  $\beta$ -caseínas durante la maduración debido al descenso de pH que hace disminuir la actividad enzimática de las proteinasas presentes en el queso. Como las enzimas coagulantes presentan un pH de actividad óptima entre 4,8 y 5,4 (Heimgartner *et al.*, 1990; Verissimo *et al.*, 1996; Roseiro *et al.*, 2003a) que está dentro de los márgenes detectados para los quesos objeto del presente trabajo y por

## Resultados y Discusión

tanto no pudieron verse afectadas. Por otra parte al presentar la plasmina y las proteasas de las bacterias lácticas su máxima actividad a pH de 7,5 y 5,5 - 6,5, respectivamente (Richardson y Elston, 1984; Lane y Fox, 1999; Thomas y Pritchard, 1987). su actividad sí pudo verse afectada. No obstante, Carmona *et al.* (1999) en queso de Los Pedroches y Sousa y Malcata (1996b) en queso Serra de Estrella observaron contenidos de NS más altos en quesos elaborados con cultivo iniciador respecto de los elaborados sin él debido a la mayor cantidad de proteasas bacterianas presentes en el queso. Por otra parte Mendia *et al.* (2000b) no detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de NS de quesos elaborados con adición de cultivo iniciador y los fabricados sin adición de cultivo estarter en queso Idiazábal.

Los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado del presente trabajo presentaron un contenido en nitrógeno soluble significativamente más alto ( $p < 0,001$ ) a los observados para cuajo animal, lo cual indica una mayor actividad proteolítica de las cipsosinas del coagulante vegetal liofilizado frente a la quimosina del cuajo animal. Tejada (2001) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) no observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los contenidos de NS de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado frente a los obtenidos mediante extractos acuosos de coagulante vegetal, lo que sugiere que el proceso de liofilización empleado no modificó de forma alguna la actividad de las enzimas proteolíticas del cardo. Según Heimgartner *et al.* (1990) y Faro *et al.* (1995), las cipsosinas sólo bajo condiciones de desnaturalización muy extremas se destruirían, soportando las condiciones a las que se exponen durante el proceso de liofilización.

Esta mayor actividad proteolítica de las cipsosinas frente a la quimosina animal desde los primeros estadios de la maduración ha sido demostrada por diversos autores (Viera de Sá y Barbosa, 1972; Núñez *et al.*, 1991a; Sanjuán, 1992; Cordeiro *et al.*, 1992; Ortiz de Apocada *et al.*, 1994; Macedo *et al.*, 1996b; Sousa y Malcata, 1998b; Fernández-Salguero y Sanjuán, 1999; Fernández-Salguero *et al.*, 2002; O'Mahony *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2003). Aunque se reconoce que la plasmina de la leche y las proteasas bacterianas pueden influir moderadamente en los contenidos de NS (Visser y Slangen, 1977; Freitas *et al.*, 1999), la acción de estas enzimas debe ser muy similar en todos los quesos puesto que la leche de partida, el cultivo iniciador y las condiciones de fabricación fueron las mismas. En este sentido Carmona *et al.* (1999), Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) y Sanjuán *et al.* (2002) en queso de

Los Pedroches, Núñez *et al.* (1991a) en queso de la Serena, Sousa y Malcata (1997a) en queso Serra de Estrella y Freitas y Malcata (1996) en queso Picante detectaron desde el principio de la maduración valores de nitrógeno soluble significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) en los quesos elaborados con coagulante vegetal con respecto a los elaborados con cuajo animal, a causa de la mayor hidrólisis producida en las caseínas. Esta mayor proteólisis ejercida por el coagulante vegetal frente al cuajo animal podría ser utilizada, de acuerdo con Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) y Fernández-Salguero *et al.* (2004) en la maduración acelerada del queso Manchego y queso tipo Manchego, respectivamente.

#### **IV.A.2.1.2.- Nitrógeno no proteico (NNP).**

En la Tabla 17 y en la Figura 16 se muestran los valores de nitrógeno no proteico (NNP) de los lotes de quesos elaborados con los dos tipos de coagulante ensayados, cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL), a los diferentes intervalos del proceso de maduración considerados.

La fracción de nitrógeno no proteico (NNP) contiene fundamentalmente pequeños péptidos de 2 a 20 restos de aminoácidos, aminoácidos libres, aminas y amoniaco, y es indicativa de la acción de peptidasas microbianas (Fox, 1989b; Lane y Fox, 1997). A lo largo de toda la maduración los contenidos de NNP aumentaron significativamente ( $p < 0,001$ ) observándose valores medios para quesos elaborados con cuajo animal y con coagulante vegetal liofilizado que oscilaron desde 3,41 % y 4,42 % hasta 23,91 % y 28,79 % NNP/NT a los 2 y 180 días de maduración, respectivamente (Tabla 17).

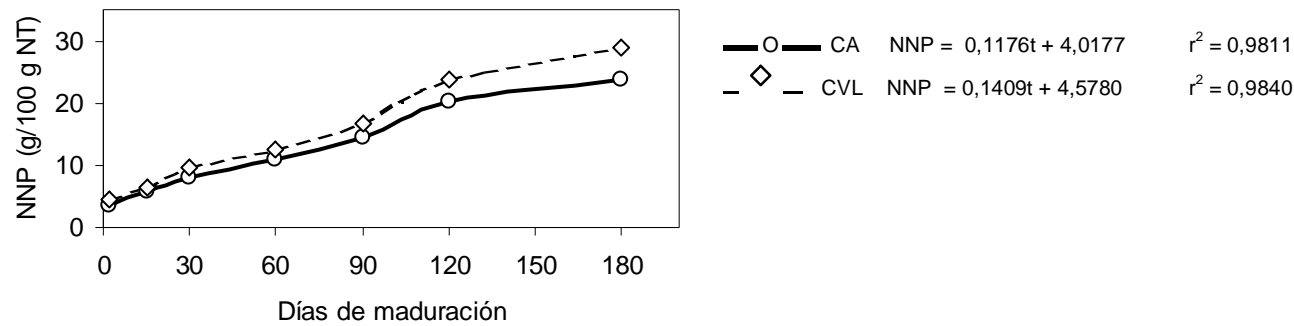
En queso Manchego coagulado con cuajo animal Fontecha *et al.* (1994) observaron a los 90 días de maduración valores de 17,5 g NNP/100 g NT, contenidos superiores a los detectados por Mora y Marcos (1982) y Picón *et al.* (1996). La adición de cipsosinas encapsuladas al queso Manchego elaborado con cuajo animal para acelerar su maduración provocó un incremento de NNP más acusado, siendo significativamente superior ( $p < 0,05$ ) al de los quesos control hasta los 30 días de maduración (Picón *et al.*, 1996, 1997). Resultados similares se han obtenido para los quesos Eddam, Serra de Estrella, Roquefort (Vieira de Sá y Barbosa, 1972), Camembert y Gùyere (Barbosa *et al.*, 1976) elaborados con coagulante vegetal.

**Tabla 17.-** Contenido en nitrógeno no proteico (g/100 g NT) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	3,69	6,34	9,40	12,84	15,81	22,17	24,09
Lote CA2	3,48	6,29	7,68	10,35	14,30	21,91	27,70
Lote CA3	3,07	4,50	6,91	9,72	13,33	16,27	19,95
x ± sd	3,41 ± 0,32 <sup>a</sup>	5,71 ± 1,05 <sup>ab</sup>	7,99 ± 1,27 <sup>abc</sup>	10,97 ± 1,65 <sup>abcd</sup>	14,48 ± 1,25 <sup>cde</sup>	20,12 ± 3,34 <sup>ef</sup>	23,91 ± 3,88 <sup>fg</sup>
CVL							
LoteCVL1	5,67	6,47	9,74	12,67	16,42	25,62	30,20
Lote CVL2	4,25	6,84	11,19	13,37	17,99	27,70	34,30
Lote CVL3	3,33	5,76	7,76	11,39	15,75	17,89	21,87
x ± sd	4,42 ± 1,18 <sup>ab</sup>	6,36 ± 0,55 <sup>abc</sup>	9,56 ± 1,72 <sup>abcd</sup>	12,48 ± 1,01 <sup>bcd</sup>	16,72 ± 1,15 <sup>def</sup>	23,74 ± 5,17 <sup>fg</sup>	28,79 ± 6,34 <sup>g</sup>

<sup>a-g</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

**Figura 16.-** Evolución del nitrógeno no proteico a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

En queso Serra de Estrella los valores de NNP determinados por diversos autores son ligeramente inferiores a los del presente trabajo, con valores que oscilaron entre 1,87 y 10,8 g NNP/100 g NT a los 0 y 68 días de maduración, respectivamente (Sousa y Malcata, 1997a,b; Macedo y Malcata, 1997e).

En queso de La Serena se detectó un incremento del nitrógeno no proteico a lo largo de la maduración, con valores ligeramente superiores a los obtenidos por nosotros en quesos elaborados con coagulante vegetal (Fernández del Pozo *et al.*, 1988a; Núñez *et al.*, 1991a; Medina *et al.*, 1991). Roa *et al.* (1997, 1999) detectaron valores de nitrógeno no proteico similares a los de la presente memoria en quesos de La Serena madurados bajo condiciones muy similares.

En queso de Los Pedroches Fernández-Salguero y Sanjuán (2002) obtuvieron valores desde 3,1 y 2,6 g NNP/100 g NT a los 2 días hasta valores de 15,0 y 14,9 g NNP/100 g NT a los 100 días de maduración, para quesos elaborados con coagulante vegetal fresco y cuajo animal, respectivamente. Carmona *et al.* (1999) en esta misma variedad de queso elaborado con coagulante vegetal y con adición de cultivo iniciador y madurado a 14 °C y 80 % de humedad relativa hallaron valores de NNP/NT algo inferiores a los del presente trabajo. Mendia *et al.* (2000a) en queso Idiazábal detectaron valores de NNP 14,16 % y 21,96 % a los 90 y 180 días de maduración. En quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero y Gómez (1997) observaron contenidos medios de 16,1, 14,5 y 10,3 g NNP/100 g NT, respectivamente. Marcos *et al.* (1985) hallaron porcentajes de nitrógeno no proteico de 14,4 %, 22,9 %, 20,2 % y 19,6 % en quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente.

Aunque es bien conocido que el proceso de acidificación influye sobre la proteólisis del queso, las tasas de NS y NNP de los quesos se correlacionan positivamente con la cantidad de ácido láctico y el valor pH (Tabla 83).

Desde el principio de la maduración los quesos elaborados con coagulante vegetal presentaron porcentajes de NNP superiores a los detectados para los quesos elaborados con cuajo animal, aunque sin llegar a establecer diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Núñez *et al.* (1991a), Freitas y Malcata (1996), Tejada y Fernández-Salguero (2003) y Vioque (2002), señalan valores de NNP superiores para quesos coagulados con coagulante vegetal con respecto a los quesos elaborados con cuajo animal, en quesos de La Serena, Picante y de Los Pedroches, respectivamente. Sin embargo Sousa y Malcata (1997a) detectaron en queso Serra de Estrella coagulado

con *Cynara cardunculus* y sin cultivo iniciador y madurado a 6 °C durante 68 días valores de NNP inferiores con respecto a los quesos elaborados con cuajo animal y Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) en queso de Los Pedroches y Chen *et al.* (2003) en queso Pecorino no hallaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en los contenidos de NNP entre los quesos elaborados con cuajo animal y los fabricados con coagulante vegetal. Aunque se reconoce que las bacterias ácido lácticas y otras enzimas son los principales agentes responsables de la producción de la fracción NNP (O'Keeffe *et al.*, 1978) la mayor actividad proteolítica de las cipsosinas en la hidrólisis de las caseínas y de los primeros productos de su degradación con respecto a las enzimas del cuajo animal sugieren que los quesos obtenidos con *Cynara cardunculus* contienen mayor cantidad de sustrato (polipéptidos) capaz de producir mayores cantidades de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, pequeños y medianos péptidos provocando, por tanto, un mayor aumento del NNP.

Vioque (2002) y Carmona *et al.* (1999) en queso de Los Pedroches y Sousa y Malcata (1996b) en queso Serra obtuvieron valores de NNP superiores en quesos elaborados con cultivo iniciador con respecto a los elaborados sin cultivo estérter.

#### **IV.A.2.1.3.- Nitrógeno aminoacídico (NAA).**

En la Tabla 18 se muestran los valores de nitrógeno aminoacídico (NAA), respecto del nitrógeno total, de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL). En la Figura 17 se representan gráficamente los valores medios de NAA de los quesos estudiados.

La fracción de nitrógeno aminoacídico (NAA) engloba el nitrógeno de los aminoácidos liberados en el queso como consecuencia de la hidrólisis de péptidos por la acción de diferentes peptidasas microbianas. Con el objetivo de observar la evolución de los aminoácidos libres numerosos autores han venido determinando el nitrógeno soluble en ácido fosfotugstico al 5 % en una solución 3,95 M de ácido sulfúrico (NAFT o NPTA en nomenclatura anglosajona) aunque Jarret *et al.* (1982) reconocen que esta fracción también incluye péptidos pequeños de 600 Da de peso molecular.

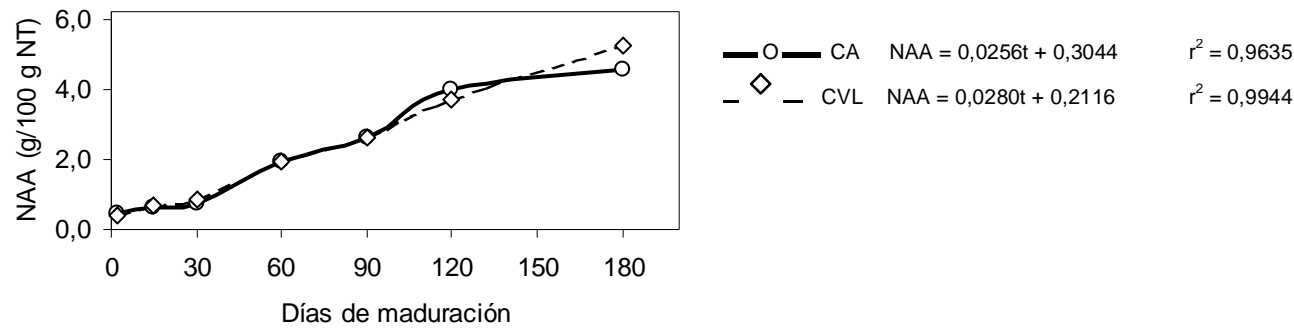
En este sentido Freitas y Malcata (1996) y Freitas *et al.* (1997) en queso Picante detectaron valores superiores de NAFT que de NAA, al comparar los resultados obtenidos mediante ambos métodos.

**Tabla 18.-** Contenido en nitrógeno aminoácido (g/100 g NT) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	0,53	0,63	0,78	1,98	2,81	4,77	5,03
Lote CA2	0,55	0,54	0,73	2,68	3,76	5,02	5,36
Lote CA3	0,24	0,67	0,78	1,11	1,28	2,13	3,26
x ± sd	0,44 ± 0,18 <sup>ab</sup>	0,61 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,76 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,92 ± 0,79 <sup>abc</sup>	2,61 ± 1,25 <sup>abcd</sup>	3,97 ± 1,60 <sup>bcd</sup>	4,55 ± 0,92 <sup>cd</sup>
CVL							
Lote CVL1	0,42	0,74	0,91	1,88	2,69	4,44	5,88
Lote CVL2	0,38	0,66	0,78	2,63	3,54	4,32	6,69
Lote CVL3	0,34	0,70	0,80	1,27	1,61	2,41	3,08
x ± sd	0,38 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,83 ± 0,07 <sup>ab</sup>	1,92 ± 0,68 <sup>abc</sup>	2,61 ± 0,93 <sup>abcd</sup>	3,72 ± 1,14 <sup>cd</sup>	5,22 ± 1,55 <sup>d</sup>

<sup>a-c</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

**Figura 17.-** Evolución del NAA a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Actualmente cada vez son más los autores que utilizan para la determinación de aminoácidos libres el método de la cadmino-nihidrina descrito por Folkertsma y Fox (1992) (apartado III.2.3.3).

Los valores de nitrógeno aminoacídico del presente trabajo aumentaron de forma significativa ( $p < 0,001$ ) a lo largo de los seis meses de maduración considerados, desde valores de 0,44 y 0,38 g NAA/100 g NT a los 2 días de maduración hasta valores de 4,55 y 5,22 g NAA/100 g NT a los 180 días de maduración para lotes de quesos coagulados con cuajo animal y con coagulante vegetal liofilizado respectivamente. En queso Manchego, Fontecha *et al.* (1994), Poveda (2001), Ballesteros (2002) y Poveda *et al.* (2004) observaron contenidos en NAA similares a los nuestros, y García-Ruíz *et al.* (1998) obtuvieron valores de NAFT/NT que oscilaron desde 1,54 % a los 15 días de maduración hasta 3,90 % a los 150 días de maduración.

En queso de Los Pedroches en los tres primeros meses de maduración Carmona *et al.* (1999), Vioque (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) obtuvieron porcentajes de NAA/NT superiores a los obtenidos por nosotros. En esta misma variedad de queso Sanjuán *et al.* (2002) hallaron valores para cuajo animal y coagulante vegetal de 0,68 y 0,84 g NAA/100 g NT a los 2 días y de 8,93 y 8,24 g NAA/100 g NT a los 100 días de maduración, respectivamente. En queso de la Serena Fernández del Pozo *et al.* (1988a), Núñez *et al.* (1991a) y Medina *et al.* (1991) señalan valores de NAFT netamente superiores a los del presente trabajo. Estas diferencias se explican porque al ser estos quesos de menor formato está casi completada la maduración al final del período de estudio, mientras que en el queso tipo Manchego del presente trabajo se puede observar en la Figura 17 que la producción de NAA sigue una tendencia ascendente a los 180 días de maduración.

Sousa y Malcata (1996b, 1997a,b) a lo largo de 68 días de maduración y Macedo y Malcata (1997e) durante 35 días de maduración señalan contenidos de nitrógeno soluble en ácido fosfotungstico (NAFT) en queso Serra que oscilaron desde 0,8 y 2,3 g/100 g NT. Estos autores han observado un descenso en los contenidos de NAFT a los 21 días de maduración, coincidiendo con la fase exponencial de crecimiento microbiano (Macedo *et al.*, 1995, 1996b). En la fase estacionaria posterior, la hidrólisis de pequeños péptidos por la acción de peptidasas bacterianas endocelulares o extracelulares procedentes de la lisis celular aumenta la concentración de aminoácidos.



## Resultados y Discusión

Aunque en la mayoría de intervalos de tiempo estudiados los contenidos en nitrógeno aminoacídico de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado fueron superiores a los de los coagulados con cuajo animal, no se han observado diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los contenidos de NAA de los quesos elaborados con ambos tipos de coagulantes ensayados. En este sentido, Vioque (2002), Carmona *et al.* (1999) y Sanjuán *et al.* (2002) en queso de Los Pedroches y Núñez *et al.* (1991a) en queso de La Serena tampoco establecieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de NAA de los quesos elaborados con coagulante vegetal y los fabricados con cuajo animal. Chen *et al.* (2003) detectaron contenidos significativamente inferiores de NAFT en queso Pecorino elaborado con coagulante vegetal con respecto a los obtenidos con cuajo animal. Por otra parte se han señalado contenidos mayores de NAA en quesos elaborados con coagulante vegetal fresco y liofilizado frente a los elaborados con cuajo animal, aunque estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ) hasta los 90 días de maduración (Tejada, 2001; Tejada y Fernández-Salguero, 2003). No resulta demasiado lógico pensar que el contenido en aminoácidos libres totales sea debido al coagulante ensayado a causa de que, durante la maduración, la actividad del coagulante se centra principalmente en la liberación de péptidos de mediano y gran tamaño a partir de las caseínas, y la liberación de aminoácidos es debida a la actividad de las endo y exopeptidasas microbianas. Probablemente la mayor actividad caseinolítica de las cipsinas libere mayor cantidad de péptidos en estos quesos, lo cual estimule la acción de las enzimas de origen microbiano que los transforman en aminoácidos libres.

Se sabe que los aminoácidos libres aumentan en el queso como consecuencia de la acción peptidolítica de las enzimas bacterianas presentes en el mismo. En este sentido, Sousa y Malcata (1996b) en queso Serra de Estrella, Carmona *et al.* (1999) y Vioque (2002), en queso de Los Pedroches y Mendia *et al.* (2000a) en queso Idiazábal observaron mayores porcentajes de NAA/NT en quesos elaborados con cultivo iniciador con respecto a los lotes elaborados sin cultivo iniciador. Sánchez (1999) en queso de Los Pedroches señala que las especies de lactobacilos y lactococos con mayor capacidad acidificante presentaron mayor capacidad proteolítica.

#### **IV.A.2.1.4.- Nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).**

Los valores de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), expresado en relación porcentual al nitrógeno total (NT), de los lotes de queso elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a los diferentes períodos de maduración considerados se recogen en la Tabla 19. La representación gráfica durante la maduración se muestra en la Figura 18.

La fracción N-NH<sub>3</sub> es indicativa de la actividad desaminasa desarrollada en el queso por las enzimas bacterianas, principalmente, sobre los aminoácidos libres a lo largo de la maduración. Se observa un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) de los valores de N-NH<sub>3</sub> durante el período de maduración estudiado. En el presente trabajo los contenidos en N-NH<sub>3</sub> oscilaron desde los 0,56 y 0,53 g/100 g NT a los 2 días hasta los 2,89 y 3,33 g/100 g NT a los 180 días de maduración, para quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, respectivamente. Fernández-Salguero y Gómez (1997) detectaron contenidos medios de 2,4, 1,4 y 0,9 g N-NH<sub>3</sub>/100 g NT en quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra, respectivamente. En quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal Marcos *et al.* (1985) hallaron porcentajes medios de N-NH<sub>3</sub>/NT de 1,1 %, 2,3 %, 2,3 % y 2,7 %, respectivamente. En queso de Los Pedroches elaborado con cuajo animal y madurado bajo condiciones ambientales Fernández-Salguero *et al.* (1978) obtuvieron valores entre 2 y 5,05 g/100 g NT, posiblemente debido a una temperatura de maduración más elevada. En esta misma variedad de queso Sanjuán *et al.* (2002) obtuvieron valores de nitrógeno amoniacal muy bajos al principio de la maduración, que aumentaron considerablemente a partir de los 30 días hasta el final del período de maduración estudiado. Sanjuán (1992) atribuía ese escaso contenido de N-NH<sub>3</sub> al principio de la maduración al bajo valor pH detectado en los quesos, inferior al pH óptimo de acción de las desaminasas.

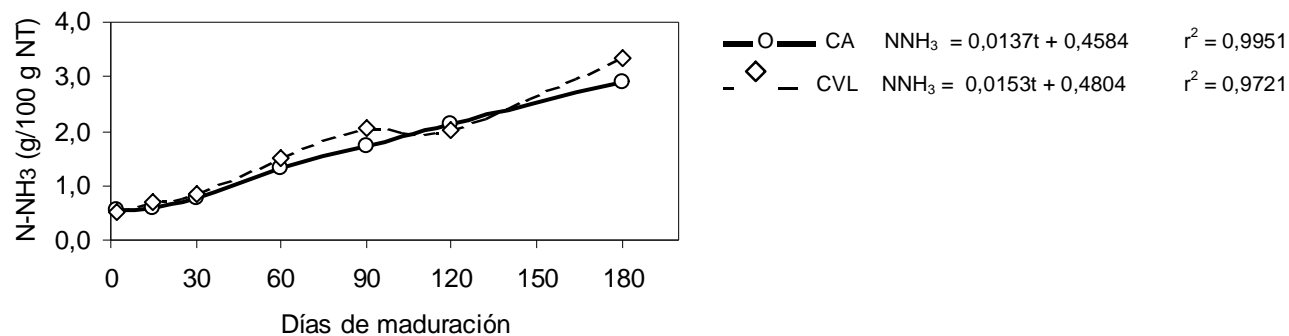
Carmona *et al.* (1999) en queso de los Pedroches elaborados sin cultivo iniciador detectaron contenidos en nitrógeno amoniacal significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) que en las partidas de quesos elaboradas con cultivo iniciador, lo cual sugiere que con la adición de cultivos estériles aumentan las enzimas bacterianas capaces de degradar aminoácidos, produciendo mayores cantidades de nitrógeno amoniacal.

**Tabla 19.-** Contenido en nitrógeno amoniacal (g/100 g NT) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	0,56	0,65	0,89	1,20	1,59	2,36	2,96
Lote CA2	0,68	0,63	0,79	1,84	2,26	2,31	3,15
Lote CA3	0,43	0,53	0,66	0,97	1,32	1,69	2,57
x ± sd	0,56 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,12 <sup>aa</sup>	1,34 ± 0,45 <sup>ab</sup>	1,72 ± 0,48 <sup>ab</sup>	2,12 ± 0,37 <sup>bcd</sup>	2,89 ± 0,30 <sup>cd</sup>
CVL							
Lote CVL1	0,47	0,56	0,78	1,74	2,81	2,23	2,86
Lote CVL2	0,64	0,83	0,94	1,55	1,97	2,02	4,27
Lote CVL3	0,48	0,75	0,79	1,19	1,44	1,80	2,85
x ± sd	0,53 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,84 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,28 <sup>ab</sup>	2,07 ± 0,69 <sup>bc</sup>	2,02 ± 0,22 <sup>bc</sup>	3,33 ± 0,82 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 18.-** Evolución del N-NH<sub>3</sub> a lo largo de la maduración.



Los valores de N-NH<sub>3</sub> de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado fueron, en varios de los siete intervalos de maduración considerados, ligeramente superiores a los de los lotes obtenidos con cuajo animal, aunque no se establecieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). En queso de Los Pedroches Fernández-Salguero y Sanjuán, (1999), Sanjuán *et al.* (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) observaron contenidos de N-NH<sub>3</sub> significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) en quesos elaborados con coagulante vegetal con respecto a los quesos coagulados con cuajo animal. Como en el caso del nitrógeno amoniacal, los quesos elaborados con coagulante vegetal presentarían una mayor cantidad de sustrato susceptible de ser atacado por las peptidasas microbianas para rendir mayores cantidades de sustancias nitrogenadas de bajo peso molecular.

#### **IV.A.2.1.5.- Grupos amino libres (N-NH<sub>2</sub>).**

El contenido en grupos amino libres (N-NH<sub>2</sub>/NT x100) a lo largo de la maduración para los lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) se muestra en la Tabla 20 y Figura 19.

Los grupos N-NH<sub>2</sub>/100 NT es otro índice de la proteólisis de los quesos a lo largo de la maduración (Polychroniadou, 1994). El N-NH<sub>2</sub> de los quesos del presente trabajo aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) desde valores de 1,53 y 1,60 g N-NH<sub>2</sub>/100 g NT a los 2 días hasta valores de 12,25 y 16,06 g N-NH<sub>2</sub>/100 g NT a los 180 días de maduración para lotes de quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, respectivamente. Ballesteros (2002) en queso Manchego elaborado con cuajo animal obtuvo resultados similares a los nuestros.

Los quesos elaborados con coagulante vegetal presentaron contenidos de N-NH<sub>2</sub> superiores respecto de los coagulados con cuajo animal, estableciéndose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) al final del periodo de maduración considerado. Como ya se ha señalado en apartados anteriores probablemente la mayor actividad caseinolítica de las cipsosinas del coagulante vegetal frente a la quimosina animal favorece la posterior acción de las peptidasas microbianas, rindiendo mayores cantidades de grupos amino libres.

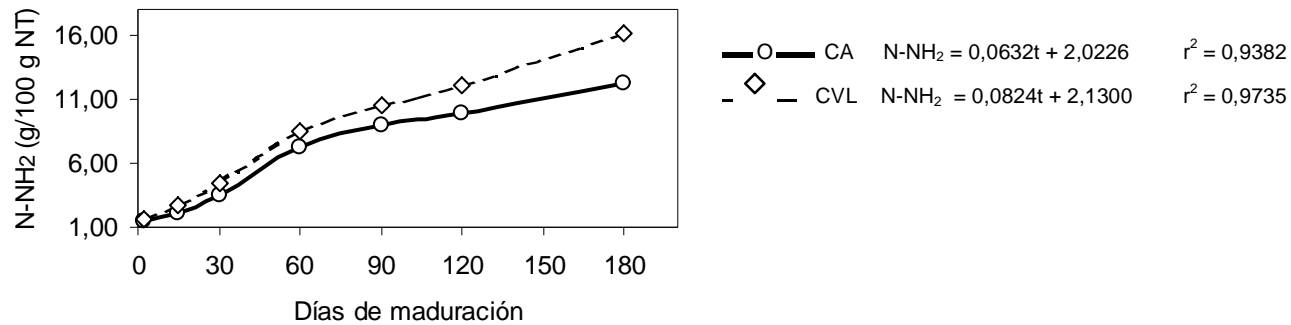
**Tabla 20.-** Grupos amino libres (g N-NH<sub>2</sub>/100 g NT) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>							
Lote CA1	2,09	2,03	3,99	8,69	9,48	9,94	9,87
Lote CA2	1,17	1,69	2,36	4,82	8,32	9,41	12,74
Lote CA3	1,33	2,66	4,31	8,36	9,13	10,13	14,15
x ± sd	1,53 ± 0,49 <sup>a</sup>	2,12 ± 0,49 <sup>a</sup>	3,55 ± 1,05 <sup>a</sup>	7,29 ± 2,14 <sup>bc</sup>	8,98 ± 0,59 <sup>cd</sup>	9,83 ± 0,38 <sup>cd</sup>	12,25 ± 2,18 <sup>d</sup>
<b>CVL</b>							
LoteCVL1	1,92	2,56	4,65	7,95	11,15	11,35	15,45
Lote CVL2	1,34	2,78	3,62	8,13	9,31	11,41	15,03
Lote CVL3	1,53	3,01	4,83	9,16	11,19	13,46	17,69
x ± sd	1,60 ± 0,30 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,23 <sup>a</sup>	4,37 ± 0,66 <sup>ab</sup>	8,41 ± 0,65 <sup>c</sup>	10,55 ± 1,07 <sup>cd</sup>	12,07 ± 1,20 <sup>d</sup>	16,06 ± 1,43 <sup>e</sup>

<sup>a-e</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

146

**Figura 19.-** Evolución de los grupos amino libres a lo largo de la maduración.



### IV.A.2.3.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.

#### IV.A.2.2.1.- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración.

Se ha empleado el análisis discriminante para determinar cuales fueron las fracciones nitrogenadas determinadas analíticamente (NS, NNP, NAA, N-NH<sub>3</sub> y N-NH<sub>2</sub>) que presentaron mayor capacidad discriminante entre los diferentes períodos de maduración. En la Tabla 21 se muestran los valores de Lambda de Wilks y de F. La actividad proteolítica (N-NH<sub>2</sub>) fue con diferencia la variable que presentó mayor capacidad discriminante entre los diferentes intervalos de maduración estudiados. El nitrógeno aminoacídico fue el parámetro con menor capacidad para discernir entre los diferentes períodos de maduración considerados.

**Tabla 21.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	NS	NNP	NAA	N-NH <sub>3</sub>	N-NH <sub>2</sub>
Lambda de Wilks	0,66	0,61	0,75	0,67	0,32
Valor F	2,69	3,31	1,72	2,60	11,07

En la Tabla 22 se recogen las distancias establecidas en función a los componentes nitrogenados entre los distintos intervalos de maduración. Las distancias máximas y mínimas se establecieron entre los quesos con 2 y 180 días de maduración y los quesos de 2 y 15 días de maduración, con valores de 299,8 y 1,1, respectivamente.

**Tabla 22.-** Distancias entre grupos de los cuadrados de Mahalanobis.

	2	15	30	60	90	120	180
2	0,0	1,1	8,2	49,3	96,8	149,0	299,8
15	1,1	0,0	3,7	38,5	81,3	128,1	272,0
30	8,2	3,7	0,0	20,4	52,8	89,5	216,5
60	49,3	38,5	20,4	0,0	8,2	30,3	109,4
90	96,8	81,3	52,8	8,2	0,0	8,8	57,8
120	149,0	128,1	89,5	30,3	8,8	0,0	30,2
180	299,8	272,0	216,5	109,4	57,8	30,2	0,0

### Resultados y Discusión

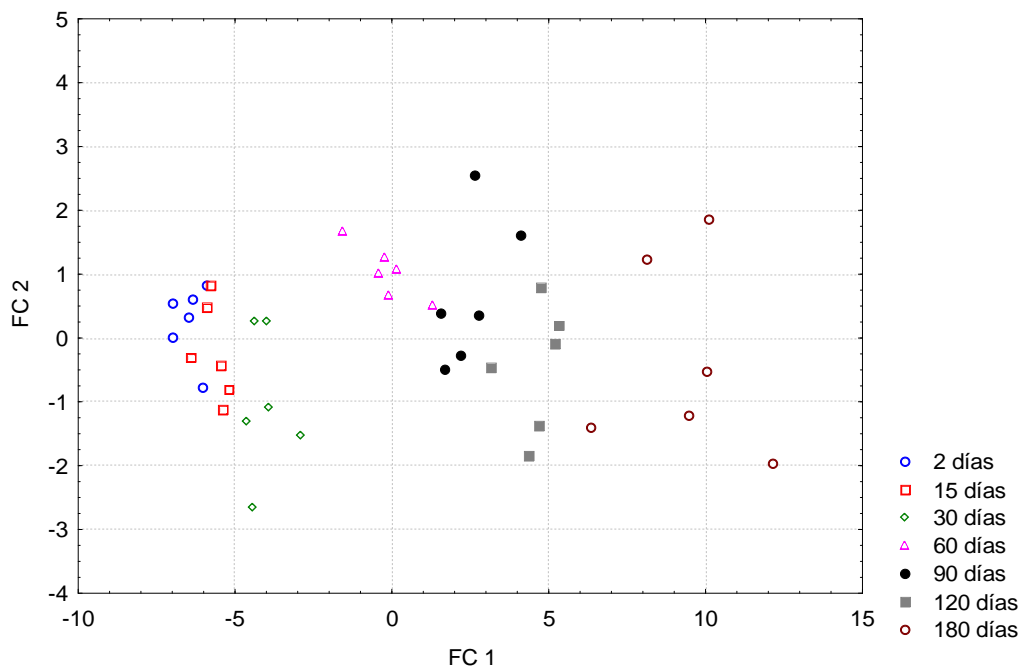
A partir de las variables seleccionadas se obtienen las funciones de clasificación y con ellas la matriz de clasificación (Tabla 23), en la cual aparecen correctamente clasificados el 90 % de los quesos estudiados.

Mediante las dos primeras funciones canónicas se representan en el diagrama de dispersión (Figura 20) los quesos con 2, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días de maduración.

**Tabla 23.-** Número de muestras correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.

	Correcto (%)	2	15	30	60	90	120	180
2	83	5	1	0	0	0	0	0
15	100	0	6	0	0	0	0	0
30	100	0	0	6	0	0	0	0
60	83	0	0	0	5	1	0	0
90	100	0	0	0	0	6	0	0
120	83	0	0	0	0	1	5	0
180	83	0	0	0	0	0	1	5
Total Correcto	90	5	7	6	5	8	6	5

**Figura 20.-** Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.



#### **IV.A.2.2.2.- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante.**

El análisis discriminante se empleó con el objetivo de determinar qué variables analíticas del conjunto de componentes nitrogenados de los quesos estudiados (NS, NNP, NAA, N-NH<sub>3</sub> y N-NH<sub>2</sub>) tienen mayor capacidad para diferenciar entre los dos tipos de coagulante ensayados.

En la Tabla 24 se muestran los valores de la Lambda de Wilks y los valores F. De todas las fracciones nitrogenadas la que más ha contribuido a la diferenciación de los dos tipos de coagulantes empleados ha sido el nitrógeno soluble con un valor F de 158,17. El N-NH<sub>3</sub> con un valor de Lambda de Wilks de 0,99 no influyó en la discriminación entre los dos grupos de coagulantes y fue excluido del modelo estadístico.

**Tabla 24.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	NS	NNP	NAA	N-NH <sub>3</sub>	N-NH <sub>2</sub>
Lambda de Wilks	0,19	0,78	0,93	0,99	0,95
Valor F	158,17	9,94	2,90	0,26	2,06

Con las funciones de clasificación obtenidas se clasificaron correctamente el 98 % de los quesos (Tabla 25), apareciendo sólo una muestra clasificada incorrectamente.

**Tabla 25.-** Número de muestras correctamente clasificadas mediante la función discriminante.

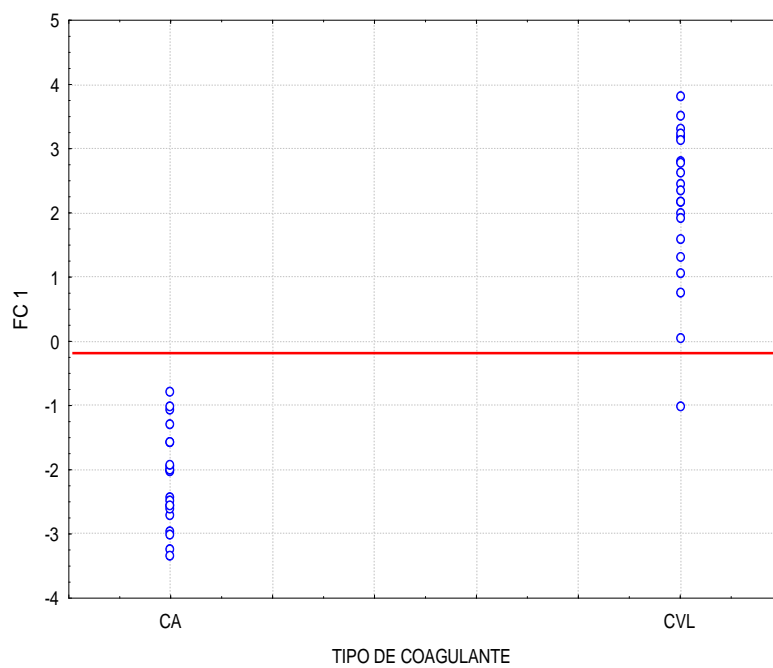
	Correcto (%)	CA	CVL
CA	100	21	0
CVL	95	1	20
Total	98	22	20



## Resultados y Discusión

Mediante la función discriminante se representan en el diagrama de dispersión (Figura 21) los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado. Se observa como hay 1 queso elaborado con coagulante vegetal liofilizado con una puntuación discriminante dentro del rango de los quesos elaborados con cuajo animal.

**Figura 21.-** Representación de los quesos en función del tipo de coagulante mediante la función canónica FC1.



#### IV.A.2.3.- DISTRIBUCIÓN DE LAS FRACCIONES NITROGENADAS CALCULADAS.

En las Tablas 26, 27, 28 y 29 y Figuras 22, 23, 24 y 25 se presenta la evolución de las fracciones nitrogenadas: Nitrógeno de las proteínas (NP), nitrógeno de las caseínas (NC), nitrógeno de las proteasas-peptonas (Npp) y nitrógeno de los péptidos (Np), respectivamente, obtenidas a partir de los componentes nitrogenados determinados analíticamente (como se describe en el apartado III.2.3.6) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de los seis meses de maduración estudiados. El tiempo de maduración afectó significativamente ( $p < 0,001$ ) a todas las fracciones nitrogenadas calculadas observándose una evolución descendente, en el caso del NC y NP, y una evolución ascendente para el Npp y Np durante los seis meses de maduración estudiados.

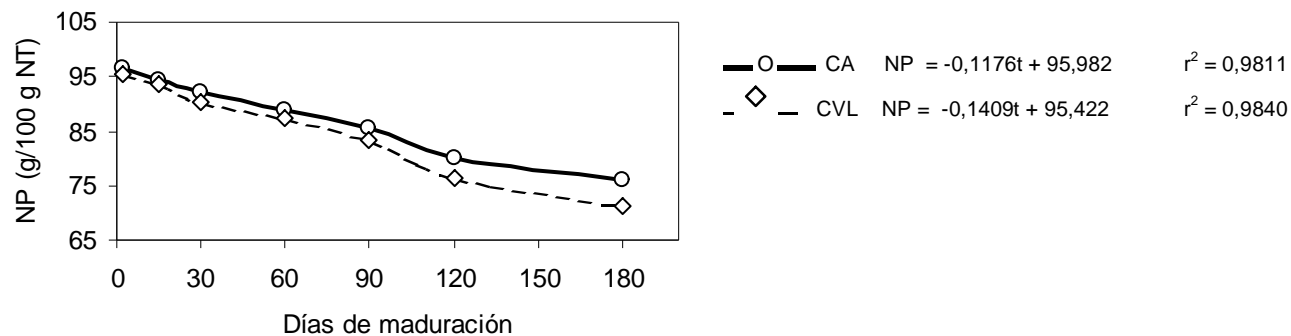
A lo largo de la maduración se producen importantes cambios en los componentes nitrogenados del queso. En este sentido, al comienzo de la misma en los quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos con coagulante vegetal liofilizado más del 95 % del nitrógeno está en forma de proteínas (Tabla 26). De esta tasa de proteínas la mayor parte son caseínas (94,27 y 88,57 %) y el resto proteasas peptonas (2,32 y 7,01 %) en los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, respectivamente. A medida que va aumentando el tiempo de maduración disminuyen los niveles de NP y NC. En los quesos elaborados con coagulante vegetal el descenso del nitrógeno de las caseínas es significativamente ( $p < 0,001$ ) más acentuado que en los quesos elaborados con cuajo animal, a partir del primer mes de maduración, debido a la mayor actividad caseinolítica de las cipsinas. En queso de Los Pedroches Fernández-Salguero y Sanjuán (1999), en quesos elaborados con coagulante vegetal fresco y cuajo animal, y Tejada (2001), en quesos elaborados con coagulante vegetal fresco, coagulante vegetal liofilizado y cuajo animal, obtuvieron resultados similares a los de la presente memoria. En el presente trabajo se hallaron en los quesos elaborados con cuajo animal contenidos en el nitrógeno de las proteínas superiores respecto de los elaborados con coagulante vegetal liofilizado, aunque sin establecer diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Respecto del nitrógeno de las proteasas-peptonas se observa un aumento paulatino a lo largo del periodo de maduración considerado.

**Tabla 26.-** Contenido en nitrógeno de las proteínas (g/100 g NT) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>							
Lote CA1	96,31	93,66	90,61	87,16	84,19	77,83	75,91
Lote CA2	96,52	93,71	92,33	89,65	85,70	78,09	72,30
Lote CA3	96,93	95,51	93,09	90,28	86,67	83,74	80,05
x ± sd	96,59 ± 0,32 <sup>a</sup>	94,29 ± 1,05 <sup>ab</sup>	92,01 ± 1,27 <sup>abc</sup>	89,03 ± 1,65 <sup>abcd</sup>	85,62 ± 1,25 <sup>cde</sup>	79,89 ± 3,34 <sup>ef</sup>	76,09 ± 3,88 <sup>fg</sup>
<b>CVL</b>							
LoteCVL1	94,33	93,53	90,26	87,33	83,58	74,38	69,80
Lote CVL2	95,75	93,16	88,81	86,63	82,01	72,30	65,70
Lote CVL3	96,67	94,25	92,25	88,62	84,25	82,12	78,14
x ± sd	95,58 ± 1,18 <sup>ab</sup>	93,65 ± 0,55 <sup>abc</sup>	90,44 ± 1,72 <sup>abcd</sup>	87,53 ± 1,01 <sup>bcde</sup>	83,28 ± 1,15 <sup>def</sup>	76,27 ± 5,17 <sup>fg</sup>	71,21 ± 6,34 <sup>g</sup>

<sup>a-g</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 22.-** Evolución del nitrógeno de las proteínas a lo largo de la maduración.



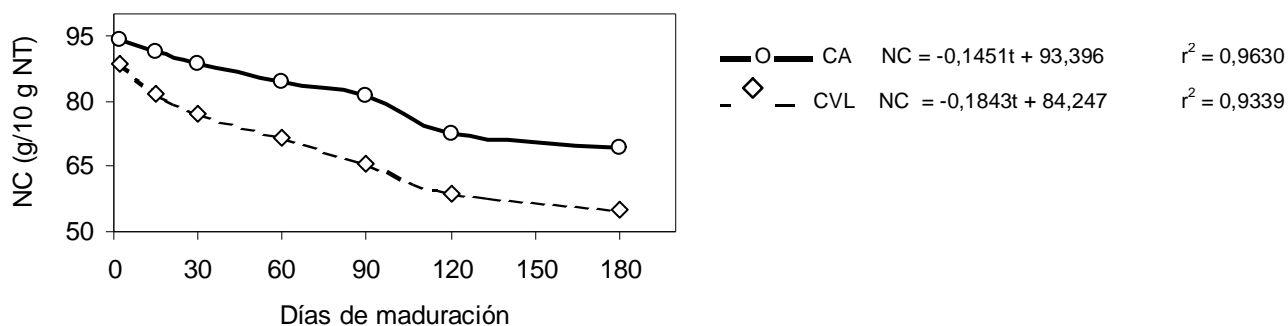
**Tabla 27.-** Contenido en nitrógeno de las caseínas (g/100 g NT) de los quesos elaborados con cuajo animaliofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
<b>CA</b>					
Lote CA1	93,31	91,90	88,91	84,40	80,10
Lote CA2	93,73	92,27	89,72	82,45	81,68
Lote CA3	95,76	89,53	87,36	86,75	82,03
x ± sd	94,27 ± 1,31 <sup>a</sup>	91,23 ± 1,49 <sup>ab</sup>	88,66 ± 1,20 <sup>ab</sup>	84,53 ± 2,15 <sup>abc</sup>	81,27 ± 1,03 <sup>bcd</sup>
<b>CVL</b>					
Lote CVL1	89,60	80,30	78,15	72,02	66,52
Lote CVL2	86,63	82,47	74,80	70,93	62,61
Lote CVL3	89,49	81,55	78,22	71,65	67,79
x ± sd	88,57 ± 1,68 <sup>ab</sup>	81,44 ± 1,09 <sup>bcd</sup>	77,06 ± 1,95 <sup>cde</sup>	71,53 ± 0,55 <sup>def</sup>	65,64 ± 2,70 <sup>fg</sup>

<sup>a-h</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

153

**Figura 23.-** Evolución del nitrógeno de las caseínas a lo largo de la maduración.



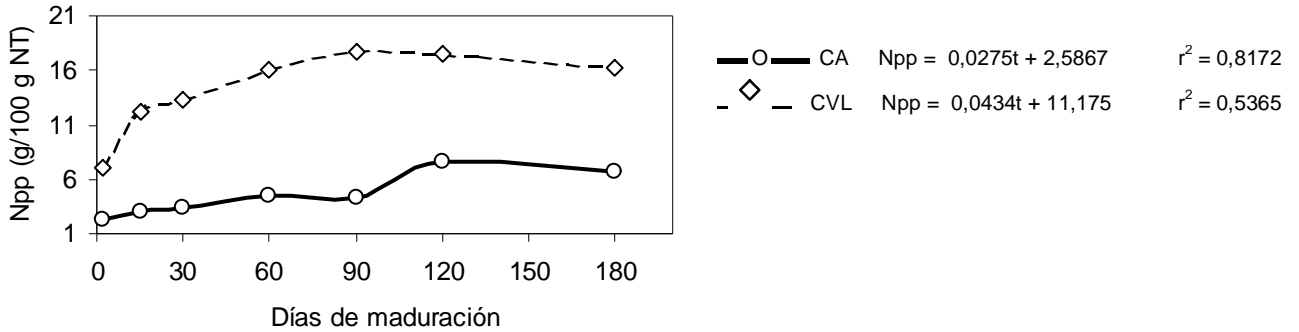
**Tabla 28.-** Contenido en nitrógeno de las proteasas-peptonas (g/100 g NT) de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
<b>CA</b>					
Lote CA1	3,00	1,76	1,70	2,76	4,10
Lote CA2	2,79	1,44	2,61	7,20	4,03
Lote CA3	1,18	5,98	5,73	3,53	4,64
x ± sd	2,32 ± 1,00 <sup>a</sup>	3,06 ± 2,53 <sup>a</sup>	3,34 ± 2,12 <sup>a</sup>	4,50 ± 2,37 <sup>a</sup>	4,25 ± 0,34 <sup>a</sup>
<b>CVL</b>					
LoteCVL1	4,73	13,24	12,11	15,31	17,06
Lote CVL2	9,12	10,69	14,01	15,70	19,41
Lote CVL3	7,19	12,70	14,03	16,97	16,46
x ± sd	7,01 ± 2,20 <sup>a</sup>	12,21 ± 1,34 <sup>bc</sup>	13,38 ± 1,10 <sup>cd</sup>	15,99 ± 0,87 <sup>cd</sup>	17,64 ± 1,56 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

154

**Figura 24.-** Evolución del nitrógeno de las proteasas-peptonas a lo largo de la maduración.



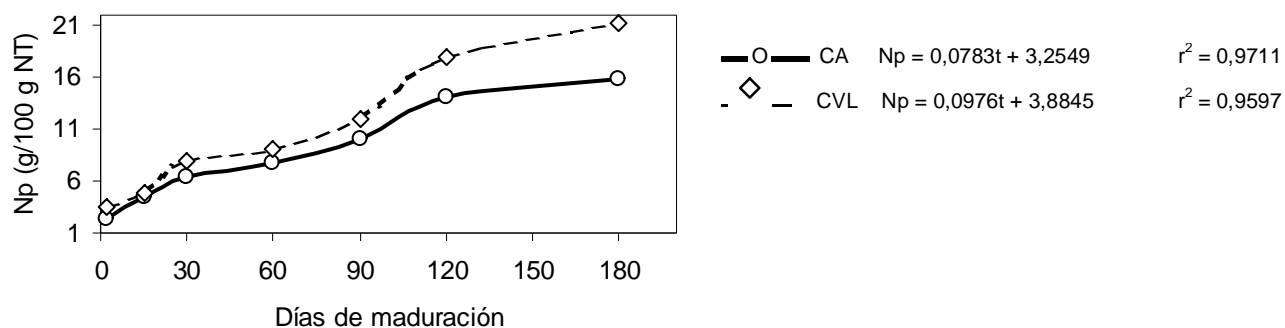
**Tabla 29.-** Contenido en nitrógeno de los péptidos (g/100 g NT) de los quesos elaborados con cuajo animaliofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	180
<b>CA</b>						
Lote CA1	2,61	5,06	7,73	9,67	11,42	14,0
Lote CA2	2,25	5,13	6,16	5,83	8,29	
Lote CA3	2,41	3,30	5,48	7,64	10,73	
x ± sd	2,42 ± 0,18 <sup>a</sup>	4,50 ± 1,04 <sup>ab</sup>	6,46 ± 1,15 <sup>abc</sup>	7,71 ± 1,92 <sup>abcd</sup>	10,14 ± 1,65 <sup>abcde</sup>	14,0
<b>CVL</b>						
LoteCVL1	4,79	5,17	8,06	9,06	10,92	
Lote CVL2	3,24	5,35	9,48	9,20	12,49	
Lote CVL3	2,51	4,31	6,17	8,93	12,70	
x ± sd	3,51 ± 1,16 <sup>abcde</sup>	4,94 ± 0,56 <sup>ab</sup>	7,90 ± 1,66 <sup>abcd</sup>	9,06 ± 0,14 <sup>abcd</sup>	12,04 ± 0,97 <sup>abcde</sup>	18,0

<sup>a-e</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

155

**Figura 25.-** Evolución del nitrógeno de los péptidos a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Los quesos elaborados con coagulante vegetal presentaron contenidos de Npp significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) a los de los quesos coagulados con cuajo animal, coincidiendo con Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches. Durante la mayor parte del proceso madurativo el contenido de Npp muestra una constancia que ya fue detectado por Fernández-Salguero (1975), en queso de Los Pedroches. La explicación de este fenómeno se basa en el equilibrio dinámico resultante de la transición compensada:



Este equilibrio dinámico es difícilmente sostenible, en términos cuantitativos, una vez alcanzado el grado de maduración de los quesos y se va a desplazar hacia un lado u otro de la tasa de proteosas-peptonas cuando las velocidades a) y b) sean asincrónicas.

Durante el proceso madurativo se aumentó la formación de péptidos con unas tasas a los seis meses de maduración de 16,47 y 20,25 g Np/100 g NT para los quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado, respectivamente, que representan el 68,88 % y el 70,33 %, respectivamente, del nitrógeno no proteico. Los quesos elaborados con coagulante vegetal presentaron valores de Np superiores a los elaborados con cuajo animal, coincidiendo con Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches. Como ya se ha comentado con anterioridad los mayores contenidos de polipéptidos en los quesos elaborados con coagulante vegetal, por la mayor actividad proteolítica de las cinasas del cardo, pueden favorecer la posterior acción de las exo y endopeptidas microbianas y con ello se puede conseguir una maduración acelerada de los quesos incluyendo el queso Manchego y tipo Manchego. Esta mayor tasas de nitrógeno de los péptidos en los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado no se traduce en un significativo sabor amargo de los quesos como se observa en el apartado de análisis sensorial (IV.A.6). Incluso en quesos tipo Manchego elaborados con doble cantidad de coagulante vegetal liofilizado no se observaron sabores significativamente ( $p > 0,05$ ) más amargos respecto de los quesos adicionados de tasas normales de coagulante vegetal liofilizado (Fernández-Salguero *et al.*, 2004). Esto hace que variando la cantidad de coagulante vegetal se pueda acelerar en mayor o menor grado el proceso madurativo.

### **IV.A.3.- MICROBIOLOGIA.**

#### **IV.A.3.1.- RECUENTOS DE GRUPOS MICROBIANOS EN LECHE, CUAJADAS Y QUESOS.**

Cabe destacar, al principio de este apartado, algunos aspectos generales observados en los géneros microbianos estudiados.

El tiempo de maduración afectó significativamente ( $p < 0,001$ ) a los ocho grupos microbianos estudiados presentando, en general, una evolución descendente durante el período madurativo de estudio.

Los quesos coagulados con cuajo animal presentaron unos recuentos microbiológicos similares a los obtenidos con coagulante vegetal liofilizado, sin llegar a establecer diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los lotes de quesos elaborados con ambos tipos de coagulante.

##### **IV.A.3.1.1.- Aerobios mesófilos.**

En la Tabla 30 y en la Figura 26 se muestran los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos de los diferentes lotes de quesos a lo largo de la maduración.

Según el R.D. 402/1996 de 1 de marzo (Anónimo, 1996b) se autoriza la fabricación de quesos y otros productos a base de leche cruda siempre que la flora total de la misma sea igual o menor de (5,70 log ufc/ml). Los recuentos de aerobios mesófilos de las leches de partida están alrededor de dicho valor o lo sobrepasan ligeramente.

En leche cruda de oveja destinada a la producción de queso con frecuencia encontramos recuentos de aerobios mesófilos superiores a 6 log ufc/ml (Fernández del Pozo, 1988b; Gaya *et al.*, 1987; Macedo *et al.*, 1996a; Sánchez *et al.*, 1998a; Freitas y Macata, 1998b; Pérez-Elortondo *et al.*, 1999a,b; Vioque *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2001), aunque Cristina y Bramley (1981) consideran que valores de viables totales superiores a 5-6 log ufc/ml en leche indicarían una falta de higiene en la producción y Pascual (1984) considere que recuentos de 6-7 log ufc/ml suelen ser indicios de alteración inmediata.

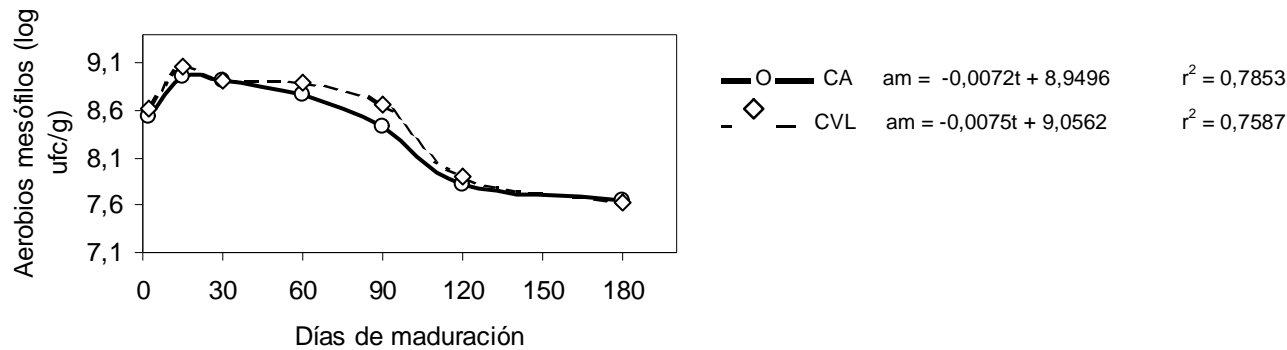


**Tabla 30.-** Recuento de aerobios mesófilos (log ufc/g) en la leche de partida, en las cuajadas y a lo largo de la maduración de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Coagulante	Leche	Cuajada	Días de Maduración						
			2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>									
Lote CA1	5,80	7,76	8,53	8,95	9,03	8,64	8,34	7,57	7,48
Lote CA2	5,46	7,41	8,73	9,15	8,76	8,57	8,41	7,66	7,35
Lote CA3	5,24	7,62	8,37	8,76	8,95	9,07	8,56	8,24	8,11
x ± sd	5,50 ± 0,28 <sup>a</sup>	7,60 ± 0,18 <sup>bcd</sup>	8,54 ± 0,18 <sup>de</sup>	8,95 ± 0,20 <sup>e</sup>	8,91 ± 0,14 <sup>e</sup>	8,76 ± 0,27 <sup>e</sup>	8,44 ± 0,11 <sup>cde</sup>	7,82 ± 0,36 <sup>bcde</sup>	7,65 ± 0,41 <sup>b</sup>
<b>CVL</b>									
LoteCVL1	5,80	7,64	8,69	9,01	8,98	8,75	8,72	7,52	6,62
Lote CVL2	5,46	7,57	8,44	9,29	8,86	8,90	8,51	7,63	8,12
Lote CVL3	5,24	7,34	8,71	8,93	8,92	9,00	8,74	8,54	8,17
x ± sd	5,50 ± 0,28 <sup>a</sup>	7,52 ± 0,16 <sup>bc</sup>	8,61 ± 0,15 <sup>e</sup>	9,07 ± 0,19 <sup>e</sup>	8,92 ± 0,06 <sup>e</sup>	8,88 ± 0,13 <sup>e</sup>	8,66 ± 0,13 <sup>e</sup>	7,90 ± 0,56 <sup>cde</sup>	7,64 ± 0,88 <sup>bc</sup>

<sup>a-e</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 26.-** Evolución de los recuentos de aerobios mesófilos en los quesos a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

En general el recuento de aerobios mesófilos es menor cuanto mayor es el grado de mecanización y modernización de la explotación. Los recuentos de viables totales de las cuajadas fueron 2,02 y 2,10 unidades logarítmicas superiores a las leches de partida, para cuajadas obtenidas mediante coagulante vegetal liofilizado y cuajo animal, respectivamente. Fernández del Pozo *et al.* (1988b) en queso de La Serena, Pouillet *et al.* (1991) en queso Torta del Casar; Sánchez *et al.* (1995), Gómez *et al.* (2001) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en queso de Los Pedroches, Pérez–Elortondo *et al.* (1999a,b) en queso Idiazábal y Sousa y Malcata (1996b) en queso Serra de Estrella observaron en cuajadas unos recuentos de viables totales entre 1,5 y 3 unidades logarítmicas mayores que los detectados en las leches de partida, considerándose normales en el proceso de fabricación del queso. Este hecho está provocado por la retención física de microorganismos en el coágulo y por los fenómenos de multiplicación que se suceden durante la fase de coagulación y desuerado en el proceso de elaboración del queso (Tatini *et al.*, 1971; Pouillet *et al.*, 1991; Rodríguez y Juárez, 1995).

Los recuentos de aerobios mesófilos obtenidos en el presente trabajo son similares a los detectados por Tejada (2001) en queso de Los Pedroches y Ortigosa *et al.* (1999) en queso Idiazábal. Sánchez (1999), Gómez *et al.* (2001) y Fernández-Salguero *et al.* (2002) en queso de Los Pedroches, Núñez *et al.* (1991a) en queso de la Serena, Sousa y Malcata (1997a) en queso Serra de Estrella y Freitas y Malcata (1996) en queso Picante señalan recuentos más elevados de viables totales en quesos obtenidos mediante coagulante vegetal fresco con respecto a los quesos elaborados mediante cuajo animal. Los elevados recuentos de viables totales detectados en el coagulante vegetal fresco, superiores a 5 log ufc/g (Barbosa, 1985; Fernández-Salguero *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2001), son la causa de este fenómeno al provocar una mayor contaminación microbiana de las cuajadas y de los quesos. El coagulante vegetal liofilizado está prácticamente exento de microorganismos y por tanto con su uso no se adiciona carga microbiana alguna (Tejada, 2001; Tejada y Fernández-Salguero, 2003).

### **IV.A.3.1.2.- Enterobacterias y Coliformes.**

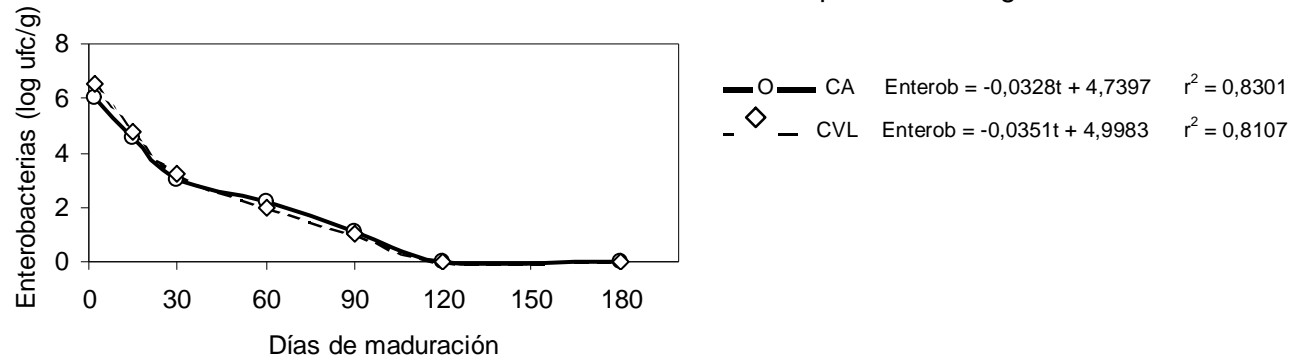
Los recuentos de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y de los coliformes se recogen en las Tablas 31 y 32 y se representan gráficamente en las Figuras 27 y 28, respectivamente.

**Tabla 31.-** Recuento de enterobacterias (log ufc/g) en la leche de partida, en las cuajadas y a lo largo de la maduración de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Coagulante	Leche	Cuajada	Días de Maduración						
			2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>									
Lote CA1	4,78	7,87	4,59	2,84	2,25	2,15	1,26	0,00	0,00
Lote CA2	4,94	7,71	6,66	5,75	3,61	1,42	0,80	0,00	0,00
Lote CA3	4,80	5,80	6,90	5,02	3,24	2,94	1,15	0,00	0,00
x ± sd	4,84 ± 0,08 <sup>de</sup>	7,13 ± 1,15 <sup>f</sup>	6,05 ± 1,27 <sup>ef</sup>	4,54 ± 1,51 <sup>de</sup>	3,03 ± 0,70 <sup>bcd</sup>	2,17 ± 0,76 <sup>abc</sup>	1,07 ± 0,24 <sup>abc</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
<b>CVL</b>									
Lote CVL1	4,78	7,71	6,18	3,82	2,18	2,15	1,15	0,00	0,00
Lote CVL2	4,94	7,92	6,67	5,45	3,66	1,77	0,90	0,00	0,00
Lote CVL3	4,80	5,83	6,70	5,14	3,90	2,00	1,00	0,00	0,00
x ± sd	4,84 ± 0,08 <sup>de</sup>	7,15 ± 1,15 <sup>f</sup>	6,52 ± 0,29 <sup>ef</sup>	4,80 ± 0,86 <sup>de</sup>	3,25 ± 0,93 <sup>cd</sup>	1,97 ± 0,19 <sup>abc</sup>	1,02 ± 0,13 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>

<sup>a-f</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

**Figura 27.-** Evolución de los recuentos de enterobacterias en los quesos a lo largo de la maduración.



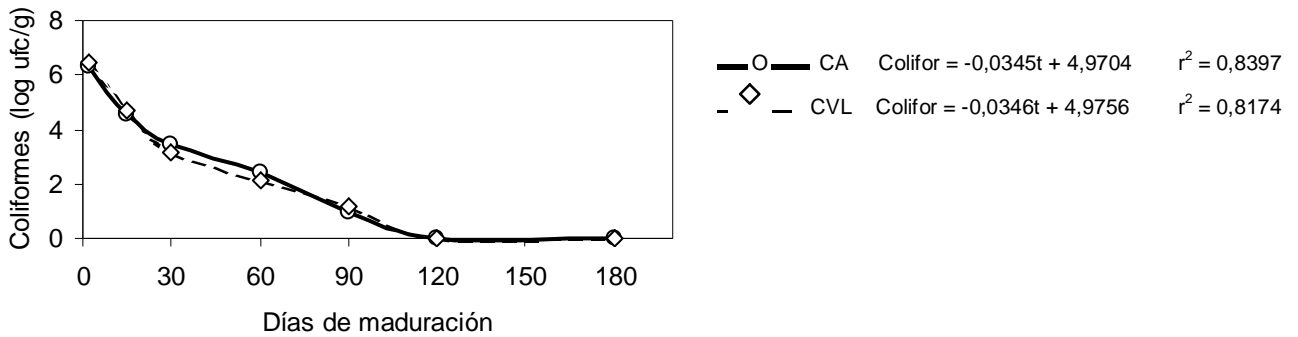
**Tabla 32.-** Recuento de coliformes (log ufc/g) en la leche de partida, en las cuajadas y a lo largo de la maduración con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Coagulante	Leche	Cuajada	Días de Maduración				
			2	15	30	60	90
<b>CA</b>							
Lote CA1	4,63	7,30	6,55	4,24	2,30	2,41	1,25
Lote CA2	4,07	7,45	6,43	4,48	4,91	2,04	1,54
Lote CA3	3,66	5,54	5,91	4,95	3,08	2,87	0,00
x ± sd	4,12 ± 0,48 <sup>de</sup>	6,76 ± 1,06 <sup>gh</sup>	6,30 ± 0,34 <sup>igh</sup>	4,56 ± 0,36 <sup>ef</sup>	3,43 ± 1,34 <sup>de</sup>	2,44 ± 0,42 <sup>bcd</sup>	0,93 ± 0,8
<b>CVL</b>							
LoteCVL1	4,63	7,79	7,08	4,78	2,60	2,21	1,77
Lote CVL2	4,07	7,36	6,65	4,30	4,44	2,15	1,68
Lote CVL3	3,66	5,65	5,75	5,02	2,48	2,01	0,00
x ± sd	4,12 ± 0,48 <sup>de</sup>	6,93 ± 1,13 <sup>h</sup>	6,49 ± 0,68 <sup>igh</sup>	4,70 ± 0,36 <sup>efg</sup>	3,17 ± 1,10 <sup>cde</sup>	2,12 ± 0,11 <sup>bcd</sup>	1,15 ± 1,0

<sup>a-h</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

161

**Figura 28.-** Evolución de los recuentos de coliformes en los quesos a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Los recuentos medios de enterobacterias y coliformes en la leche de partida fueron de 4,84 y 4,12 log ufc/g, respectivamente (Tablas 31 y 32) siendo muy similares a los resultados obtenidos por diversos autores en leche de oveja (Fernández del Pozo *et al.*, 1988b; Pouillet *et al.*, 1991; Medina *et al.*, 1991; Sousa y Malcata, 1996b, 1997a; Sánchez, 1999).

Los recuentos de enterobacterias y coliformes en las cuajadas y en los quesos estudiados a lo largo de la maduración evolucionaron de forma descendente llegando a desaparecer en los dos últimos meses del periodo madurativo de estudio. Esta evolución descendente es similar a la obtenida en diversos tipos de quesos de oveja como de Los Pedroches (Sánchez *et al.*, 1993, 1995; Gómez *et al.*, 2001), La Serena (Fernández del Pozo *et al.*, 1988b, 1989), Torta del Casar (Pouillet *et al.*, 1991), Idiazábal (Barcina *et al.*, 1988; Pérez-Elortondo *et al.*, 1993a, 1999a,b), Serra de Estrella (Macedo *et al.*, 1995, 1996a; Macedo y Malcata, 1997d) y Pecorino (Caridi *et al.*, 2003).

Pérez-Elortondo *et al.* (1993b) en queso Idiazábal, Sánchez *et al.* (1993) en queso de Los Pedroches y Gaya *et al.* (1983) han detectado en quesos elaborados con cultivo iniciador una mayor reducción de los recuentos de enterobacterias y coliformes respecto a los quesos control al producirse un mayor descenso del valor pH. En este sentido Medina *et al.* (1991) detectaron en lotes de queso de La Serena elaborados con cultivo iniciador una mayor velocidad de muerte de enterobacterias y coliformes (0,385 y 0,433 log ufc/semana, respectivamente) que en los quesos elaborados sin cultivo estárter. Según Sánchez (1999) el empleo de cultivos iniciadores en quesos de oveja artesanos tiene un efecto potenciador sobre la aceleración de la velocidad de muerte de microorganismos indeseables durante la maduración, sobre todo en lo relativo a enterobacterias y coliformes.

En el presente trabajo la velocidad de muerte de enterobacterias y coliformes fue de 0,238 y 0,248 log ufc/semana para los quesos elaborados con cuajo animal y de 0,256 y 0,255 log ufc/semana para los elaborados con coagulante vegetal liofilizado, respectivamente. Sánchez (1999) en queso de Los Pedroches y Núñez *et al.* (1991a) en queso de La Serena detectaron una mayor velocidad de muerte microbiana de enterobacterias y coliformes en quesos elaborados con cuajo animal con respecto a los elaborados con coagulante vegetal fresco. Tejada (2001) señala una velocidad de muerte de enterobacterias y coliformes similar entre los quesos

## Resultados y Discusión

elaborados con cuajo animal y los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado, coincidiendo con los resultados de la presente memoria.

Respecto al efecto del tipo de coagulante empleado, Sánchez (1999) en lotes de queso de Los Pedroches elaborados con coagulante vegetal fresco sin cultivo iniciador, con cultivo iniciador comercial y con cultivo iniciador autóctono, observó durante 90 días de maduración recuentos de enterobacterias y coliformes significativamente más altos ( $p < 0,001$ ) respecto de los lotes elaborados con cuajo animal. Fernández-Salguero *et al.* (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) describen recuentos de estos grupos microbianos inferiores en quesos elaborados con cuajo animal y con coagulante vegetal liofilizado frente a los elaborados con coagulante fresco, sin establecer diferencias significativas entre los dos primeros tipos de coagulantes ensayados, coincidiendo con el presente trabajo. Núñez *et al.* (1991a) en queso de La Serena y Sousa y Malcata (1997a) en queso Serra de Estrella señalan recuentos de enterobacterias y coliformes más elevados en quesos elaborados con coagulante vegetal fresco frente a los obtenidos mediante cuajo animal. Paradójicamente Freitas y Malcata (1996) no detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los recuentos de enterobacterias de quesos de oveja elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal fresco. Aunque Núñez *et al.* (1991a) y González de Llano *et al.* (1992) atribuyen los recuentos más elevados de enterobacterias observados en los quesos fabricados con coagulante vegetal al valor pH más alto detectado, que favorece la supervivencia de estos microorganismos, Gómez *et al.* (2001), Fernández-Salguero *et al.* (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) no detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el valor pH de los quesos obtenidos mediante cuajo animal y los elaborados con coagulante vegetal fresco y sí mayores recuentos de enterobacterias en estos últimos. Por lo tanto los recuentos más altos de enterobacterias y coliformes detectados en los quesos elaborados con coagulante vegetal fresco seguramente están provocados por la elevada contaminación de los extractos acuosos de las flores desecadas del cardo. En este sentido Fernández-Salguero *et al.* (1998, 1999) detectaron recuentos muy elevados de enterobacterias en flores desecadas de las especies de cardos *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis* (alrededor de 5 log ufc/g). La ausencia de diferencias entre los recuentos de enterobacterias y coliformes de los quesos elaborados con cuajo animal frente a los elaborados con coagulante vegetal liofilizado se debe, al igual que en el caso de los aerobios mesófilos, a la prácticamente nula presencia de estos microorganismos en el coagulante vegetal liofilizado.

#### **IV.A.3.1.3.-Estafilococos y micrococos.**

En las Tablas 33 y 34 y en las Figuras 29 y 30 se presentan los recuentos de microorganismos de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* de la leche, de las cuajadas y de los quesos a lo largo de los seis meses de maduración considerados.

Los recuentos medios de estafilococos y micrococos de la leche, 4,41 y 4,10 log ufc/ml, respectivamente, están dentro del rango de los detectados por otros autores en leche destinada a la fabricación de queso de oveja (Bautista *et al.*, 1988; Fernández del Pozo *et al.*, 1988b; Núñez *et al.*, 1991a; Pérez-Elortondo, 1993a,b, 1999a,b; Sánchez, 1999).

La evolución de los recuentos de micrococos y estafilococos es muy similar entre los quesos elaborados con cuajo animal y los elaborados con coagulante vegetal liofilizado. Los máximos recuentos de estafilococos y micrococos se alcanzan durante los 15-30 primeros días, para luego descender hasta el final del periodo de maduración considerado. Poulet *et al.* (1991) en queso Torta del Casar, Pérez Elortondo *et al.* (1993a) en queso Idiazábal, Sánchez (1999) en queso de Los Pedroches y Macedo *et al.* (2004) en queso Serra de Estrella obtuvieron unos resultados y una evolución similar a la del presente trabajo. Sánchez (1999) y Núñez *et al.* (1991a) no detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los recuentos de estafilococos y micrococos de los quesos elaborados con coagulante vegetal y los coagulados con cuajo animal, coincidiendo con la presente memoria.

Recuentos de micrococaceas más elevados han sido descritos por Sánchez *et al.* (1993) y Centeno *et al.* (1991). Según López-Díaz *et al.* (1995) las temperaturas de maduración altas de algunas variedades de quesos (17-23 °C) y concentraciones elevadas de sal favorecen el crecimiento de estos microorganismos.

Fernández del Pozo *et al.* (1988b) citan una velocidad de muerte de estafilococos en queso de La Serena fabricado en invierno de 0,253, Núñez y Martínez-Moreno (1976) en queso Manchego de 0,198 y Ordoñez *et al.*, (1980) en queso Roncal de 0,071. La velocidad de muerte de los estafilococos del presente trabajo fue superior a la de los micrococos, coincidiendo con Sánchez (1999).

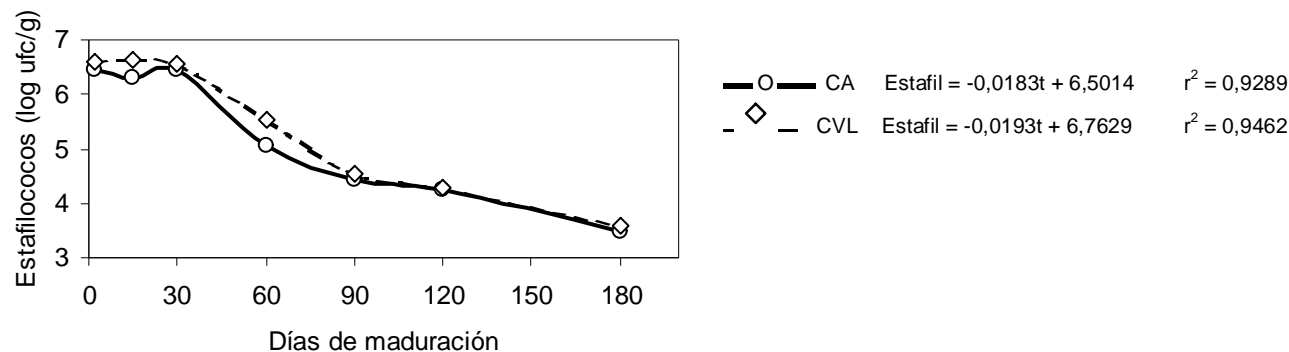
**Tabla 33.-** Recuento de estafilococos (log ufc/g) en la leche de partida, en las cuajadas y a lo largo de la maduración de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Coagulante	Leche	Cuajada	Días de Maduración						
			2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>									
Lote CA1	4,78	6,04	6,68	6,44	6,52	5,11	4,52	4,31	2,47
Lote CA2	4,22	6,84	6,17	6,38	6,58	5,02	4,22	4,40	4,09
Lote CA3	4,24	5,65	6,50	6,07	6,24	5,02	4,56	4,03	3,86
x ± sd	4,41 ± 0,32 <sup>bc</sup>	5,18 ± 0,60 <sup>ef</sup>	6,45 ± 0,26 <sup>ef</sup>	6,30 ± 0,20 <sup>ef</sup>	6,45 ± 0,18 <sup>ef</sup>	5,05 ± 0,05 <sup>cd</sup>	4,43 ± 0,19 <sup>bc</sup>	4,25 ± 0,19 <sup>abc</sup>	3,47 ± 0,88 <sup>ab</sup>
<b>CVL</b>									
LoteCVL1	4,78	6,09	6,22	6,59	6,66	5,70	4,71	4,06	3,37
Lote CVL2	4,22	6,46	6,93	6,68	6,56	5,36	4,24	4,24	3,96
Lote CVL3	4,24	5,16	6,68	6,62	6,44	5,57	4,71	4,54	3,43
x ± sd	4,41 ± 0,32 <sup>bc</sup>	5,90 ± 0,67 <sup>def</sup>	6,61 ± 0,36 <sup>f</sup>	6,63 ± 0,04 <sup>f</sup>	6,55 ± 0,11 <sup>f</sup>	5,54 ± 0,17 <sup>de</sup>	4,55 ± 0,27 <sup>bc</sup>	4,28 ± 0,24 <sup>bc</sup>	3,59 ± 0,32 <sup>a</sup>

<sup>a-f</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

165

**Figura 29.-.** Evolución de los recuentos de estafilococos en los quesos a lo largo de la maduración.



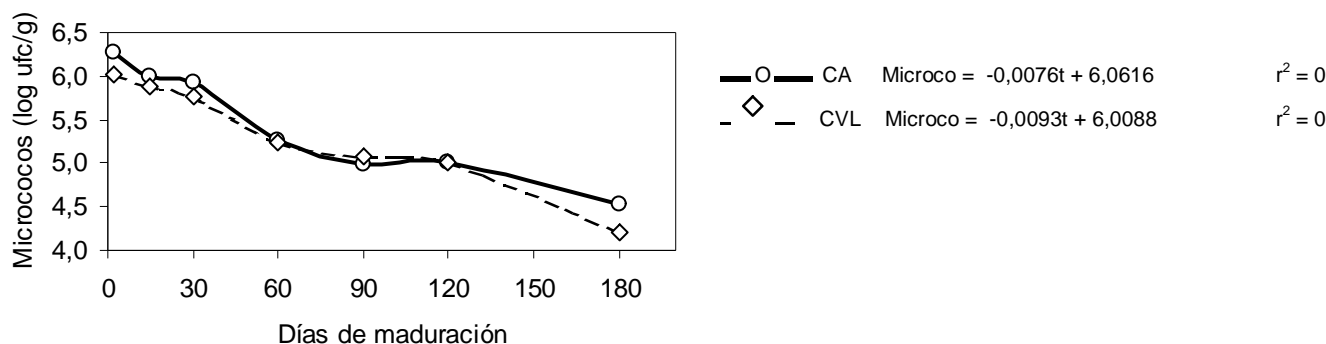


**Tabla 34.-** Recuento de micrococos (log ufc/g) en la leche de partida, en las cuajadas y a lo largo elaborados con cuajo Animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Coagulante	Leche	Cuajada	Días de Maduración				
			2	15	30	60	90
<b>CA</b>							
Lote CA1	3,80	6,48	6,81	6,14	6,16	5,69	5,15
Lote CA2	4,49	6,18	6,18	6,54	6,61	5,10	5,06
Lote CA3	4,00	5,68	5,82	5,31	5,02	4,98	4,76
x ± sd	4,10 ± 0,35 <sup>a</sup>	6,11 ± 0,40 <sup>cd</sup>	6,27 ± 0,50 <sup>d</sup>	6,00 ± 0,63 <sup>cd</sup>	5,93 ± 0,82 <sup>cd</sup>	5,26 ± 0,38 <sup>abcd</sup>	4,99 ± 0,20 <sup>a</sup>
<b>CVL</b>							
Lote CVL1	3,80	6,30	6,04	6,17	6,01	5,89	5,09
Lote CVL2	4,49	6,73	6,44	6,23	6,02	5,07	5,03
Lote CVL3	4,00	5,32	5,61	5,23	5,26	4,78	5,12
x ± sd	4,10 ± 0,35 <sup>a</sup>	6,12 ± 0,72 <sup>cd</sup>	6,03 ± 0,42 <sup>cd</sup>	5,88 ± 0,56 <sup>cd</sup>	5,76 ± 0,44 <sup>bcd</sup>	5,25 ± 0,58 <sup>abcd</sup>	5,08 ± 0,00 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

**Figura 30.-** Evolución de los recuentos de micrococos en los quesos a lo largo de la maduración.



#### **IV.A.3.1.4.- Bacterias ácido lácticas (BAL).**

Los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL), expresados como logaritmo ufc/g, en la leche de partida, en la cuajadas y en los diferentes lotes de quesos estudiados se presentan en la Tabla 35 y Figura 31.

Fernández del Pozo *et al.* (1988b) en queso de La Serena, Pérez Elortondo *et al.* (1993a, 1998, 1999a,b) en queso Idiazábal, Sousa y Malcata (1996b, 1997a), Freitas y Malcata (1998b) y Macedo *et al.* (1996a) en queso Serra de Estrella y Sánchez (1999), Vioque *et al.* (2000), Fernández-Salguero *et al.* (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en queso de Los Pedroches señalan recuentos medios de bacterias ácido lácticas en la leche de partida similares a los del presente trabajo.

Los recuentos de bacterias ácido lácticas aumentaron hasta los 15-30 días de maduración, para luego disminuir hasta el final del período de maduración estudiado con una velocidad de muerte microbiana de 0,047 y 0,042 log ufc/semana para los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, respectivamente. Freitas y Malcata (1996, 1998b) en queso Picante, Macedo *et al.* (1995) y Sousa y Malcata (1996b, 1997a) en queso Serra de Estrella, Barcina *et al.* (1988), Pérez-Elortondo *et al.* (1998, 1999a) y Ortigosa *et al.* (1999) en queso Idiazábal, Pouillet *et al.* (1991) en queso Torta del Casar, Fernández del Pozo *et al.* (1988b, 1989) en queso de La Serena y Caridi *et al.* (2003) en queso Pecorino señalan una evolución de bacterias ácido lácticas similar a la del presente trabajo.

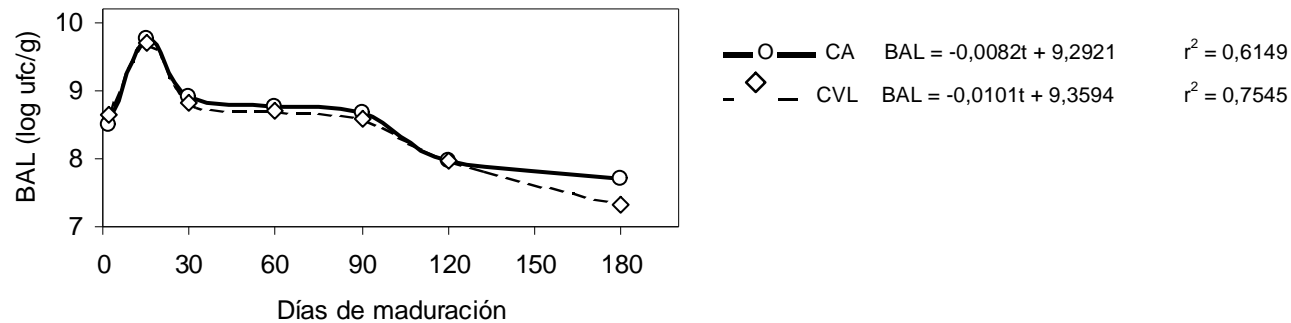
Sánchez (1999) y Gómez *et al.* (2001) en queso de Los Pedroches y Freitas y Malcata (1996) en queso Picante tampoco detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los recuentos de BAL de los quesos elaborados con cuajo animal respecto de los obtenidos con coagulante vegetal. Tejada y Fernández-Salguero (2003) no encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los lotes elaborados con cuajo animal, coagulante vegetal fresco y coagulante vegetal liofilizado.

**Tabla 35.-** Recuento de bacterias ácido lácticas (log ufc/g) en la leche de partida, en las cuajadas y a lo largo de la maduración de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Coagulante	Leche	Cuajada	Días de Maduración						
			2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>									
Lote CA1	6,53	7,56	8,84	9,89	9,07	8,93	8,63	7,83	7,74
Lote CA2	5,17	7,67	8,59	9,70	8,92	8,89	8,71	7,92	7,74
Lote CA3	5,04	7,55	8,37	9,98	9,03	8,76	8,95	8,48	7,90
x ± sd	5,58 ± 0,82 <sup>a</sup>	7,59 ± 0,07 <sup>bc</sup>	8,60 ± 0,24 <sup>cde</sup>	9,86 ± 0,14 <sup>g</sup>	9,01 ± 0,08 <sup>efg</sup>	8,86 ± 0,09 <sup>efg</sup>	8,76 ± 0,17 <sup>ef</sup>	8,08 ± 0,35 <sup>cde</sup>	7,79 ± 0,09 <sup>b</sup>
<b>CVL</b>									
LoteCVL1	6,53	7,51	8,92	9,90	8,83	8,85	8,79	7,85	7,10
Lote CVL2	5,17	7,56	8,62	9,68	9,04	8,62	8,67	7,95	7,09
Lote CVL3	5,04	7,32	8,71	9,85	8,93	8,96	8,62	8,45	8,09
x ± sd	5,58 ± 0,82 <sup>a</sup>	7,46 ± 0,13 <sup>b</sup>	8,75 ± 0,15 <sup>e</sup>	9,81 ± 0,12 <sup>fg</sup>	8,93 ± 0,11 <sup>efg</sup>	8,81 ± 0,17 <sup>efg</sup>	8,69 ± 0,09 <sup>de</sup>	8,08 ± 0,32 <sup>bcde</sup>	7,43 ± 0,57 <sup>bcd</sup>

<sup>a-g</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

**Figura 31.-** Evolución de los recuentos de BAL en los quesos a lo largo de la maduración.



No obstante Sousa y Malcata (1997a) obtuvieron al final de la maduración recuentos de bacterias ácido lácticas superiores en quesos Serra de Estrella elaborados con coagulante vegetal fresco con respecto a los fabricados con cuajo animal, aunque a los 28 días de maduración observaron el fenómeno contrario.

Entre los recuentos de BAL y algunas fracciones nitrogenadas como NNP, NAA y Np se ha establecido una correlación negativa altamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Tabla 87) lo cual parece indicar que con el avance de la maduración, la muerte de bacterias ácido lácticas causa una liberación de peptidasas al medio como consecuencia de la lisis celular. Estas enzimas favorecen la degradación de polipéptidos y péptidos de mediano y pequeño peso molecular, aumentando los contenidos de NNP, NAA y Np de los quesos. En este sentido se ha establecido una correlación positiva significativa ( $p < 0,001$ ) entre el nitrógeno de las proteínas (NP) y los recuentos de BAL de los quesos estudiados. Sin embargo, no se ha establecido una relación tan alta entre los recuentos de bacterias ácido lácticas y los contenidos de NC, posiblemente debido a que la participación de las enzimas de estos microorganismos en la degradación de las caseínas es escasa.

#### **IV.A.3.1.5.- Levaduras y mohos.**

Los recuentos de levaduras y mohos, expresada como log de ufc/g, de la leche de partida, de las cuajadas y de los quesos estudiados se presentan en las Tablas 36 y 37 y se representan gráficamente en las Figuras 32 y 33, respectivamente.

Los recuentos medios de levaduras y mohos en leche de partida fueron de 5,17 y 1,43 log ufc/ml. En queso de Los Pedroches Sánchez (1999) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) observaron recuentos medios de levaduras y mohos en las leches de partida de 3,97 y 1,96 log ufc/ml y 4,98 y 1,45 log ufc/ml respectivamente. La variabilidad en los recuentos de estos grupos microbianos en la leche de partida ha sido descrita por diferentes autores (Fernández del Pozo *et al.*, 1988b; Pérez-Elortondo *et al.*, 1993b; Macedo *et al.*, 1996; Sousa y Malcata, 1996a; Sánchez, 1997; Caridi *et al.*, 2003). En este sentido Cosentino y Palmas (1997) encontraron recuentos de levaduras y mohos en leche cruda muy bajos variando desde 0 hasta valores de 1,30 log ufc/ml.

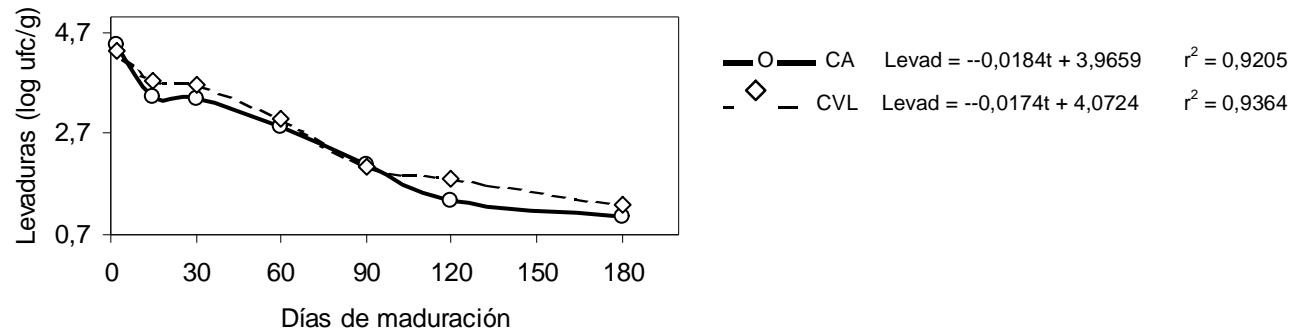
**Tabla 36.-** Recuento de levaduras (log ufc/g) en la leche de partida, en las cuajadas y a lo largo de la maduración de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Coagulante	Leche	Cuajada	Días de Maduración							
			2	15	30	60	90	120	180	
CA										
Lote CA1	4,66	3,77	4,54	3,60	2,83	3,38	2,54	2,10	1,34	
Lote CA2	5,10	3,89	4,53	2,97	4,38	3,43	3,27	2,01	1,84	
Lote CA3	5,74	3,84	4,30	3,73	2,99	1,63	0,46	0,00	0,00	
x ± sd	5,17 ± 0,54 <sup>f</sup>	3,83 ± 0,06 <sup>cdef</sup>	4,46 ± 0,14 <sup>ef</sup>	3,43 ± 0,41 <sup>bcde</sup>	3,40 ± 0,85 <sup>bcdef</sup>	2,81 ± 1,03 <sup>abcde</sup>	2,09 ± 1,46 <sup>abcd</sup>	1,37 ± 1,19 <sup>abc</sup>	1,06 ± 0,95 <sup>ab</sup>	
CVL										
LoteCVL1	4,66	3,98	4,48	4,03	3,43	3,41	1,72	2,24	1,70	
Lote CVL2	5,10	3,90	4,48	3,47	3,91	3,35	2,87	2,15	1,70	
Lote CVL3	5,74	3,63	4,08	3,75	3,61	2,20	1,50	1,00	0,50	
x ± sd	5,17 ± 0,54 <sup>f</sup>	3,84 ± 0,18 <sup>cdef</sup>	4,35 ± 0,23 <sup>def</sup>	3,75 ± 0,28 <sup>cdef</sup>	3,65 ± 0,24 <sup>cdef</sup>	2,99 ± 0,68 <sup>abcdef</sup>	2,03 ± 0,74 <sup>abc</sup>	1,80 ± 0,69 <sup>abc</sup>	1,30 ± 0,69 <sup>a</sup>	

<sup>a-f</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

170

**Figura 32.-** Evolución de los recuentos de levaduras (log ufc/g) en los quesos a lo largo de la maduración.



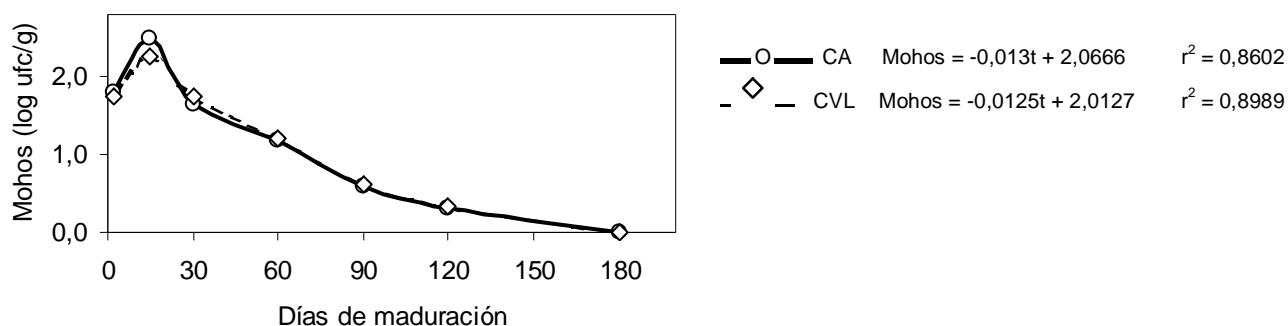
**Tabla 37.-** Recuento de mohos (log ufc/g) en la leche de partida, en las cuajadas y a lo largo de la maduración con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Coagulante	Leche	Cuajada	Días de Maduración				
			2	15	30	60	90
<b>CA</b>							
Lote CA1	1,44	1,89	1,76	2,41	1,84	1,24	0,77
Lote CA2	1,30	1,90	1,78	2,78	1,67	1,19	0,62
Lote CA3	1,56	1,73	1,84	2,29	1,40	1,08	0,39
x ± sd	1,43 ± 0,13 <sup>cd</sup>	1,84 ± 0,10 <sup>de</sup>	1,79 ± 0,04 <sup>de</sup>	2,49 ± 0,26 <sup>f</sup>	1,64 ± 0,22 <sup>cd</sup>	1,17 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,59 ± 0,19 <sup>b</sup>
<b>CVL</b>							
Lote CVL1	1,44	1,74	1,57	2,24	1,35	1,06	0,42
Lote CVL2	1,30	2,00	1,93	2,37	2,00	1,14	0,68
Lote CVL3	1,56	1,86	1,74	2,17	1,87	1,39	0,74
x ± sd	1,43 ± 0,13 <sup>cd</sup>	1,87 ± 0,13 <sup>de</sup>	1,75 ± 0,18 <sup>d</sup>	2,26 ± 0,10 <sup>ef</sup>	1,74 ± 0,34 <sup>d</sup>	1,20 ± 0,17 <sup>c</sup>	0,61 ± 0,17 <sup>b</sup>

<sup>a-f</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

171

**Figura 33.-** Evolución de los recuentos de mohos (log ufc/g) en los quesos a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Los recuentos de mohos y levaduras observados por nosotros están por debajo de los límites recomendados por el CeNAN (1982) que indican que los recuentos de levaduras y mohos en quesos madurados no deben exceder de 2 log ufc/g. Coincidiendo con la presente memoria Sánchez *et al.* (1993, 1995), Gómez *et al.* (2001), Vioque *et al.* (2000) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) observaron en queso de Los Pedroches una evolución descendente de levaduras y mohos, no obteniendo recuentos al final de la maduración,. Freitas y Malcata (1996, 1998a,b) detectaron en queso Picante recuentos de levaduras muy superiores a los nuestros, que descendieron durante la maduración no obteniéndose, en ocasiones, recuentos al final de la maduración (140-160 días) debido a la presencia de ácidos grasos libres que inhiben el crecimiento de levaduras.

Macedo *et al.* (1995, 1996a, 2004) en queso Serra de Estrella y Fernández del Pozo *et al.* (1988b) en queso de La Serena obtuvieron recuentos de mohos y levaduras superiores a los nuestros, no observándose un descenso de los mismos durante el período madurativo. Pérez-Elortondo *et al.* (1993a) en queso Idiazábal y Sousa y Malcata (1996b, 1997a) en queso Serra de Estrella detectaron recuentos de mohos y levaduras superiores a los nuestros, observándose un aumento de los mismos durante la maduración.

Coincidiendo con Sánchez (1999) y Fernández-Salguero *et al.* (2002) los recuentos de levaduras de las cuajadas fueron inferiores a los de la leche de partida, y los recuentos de mohos similares. Rodríguez *et al.* (1994) sugieren que la falta de crecimiento o la reducción de levaduras y mohos durante la formación de las cuajadas en la mayoría de variedades de quesos se debe a la temperatura de coagulación de los mismos, al carácter aeróbico de estos microorganismos y a su dificultad de crecimiento en la masa de los quesos.

Los recuentos de mohos y levaduras de los quesos elaborados con ambos tipos de coagulantes ensayados fueron similares, debido a la casi nula presencia de este tipo de microorganismos en el coagulante vegetal liofilizado. Freitas y Malcata (1996) en queso Picante y Sánchez (1999) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en queso de Los Pedroches detectaron mayores recuentos de levaduras y mohos en quesos elaborados con coagulante vegetal fresco frente a los elaborados con cuajo animal. Sin embargo, Sousa y Malcata (1997a) no observaron diferencias entre los recuentos de quesos Serra de Estrella elaborados con cuajo y con coagulante vegetal fresco. La elevada contaminación inicial de los extractos acuosos de las flores desecadas del

cardo justifica los mayores recuentos de levaduras y mohos en quesos elaborados con coagulante vegetal fresco.

Se ha establecido una correlación positiva significativa ( $p < 0,001$ ) entre la  $a_w$  y contenido de humedad y los ocho recuentos microbianos estudiados (a medida que descienden estos dos parámetros composicionales se provoca una disminución en todos los microorganismos estudiados), y una correlación negativa altamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre el contenido de cenizas y cloruro sódico y los recuentos microbianos estudiados (Tabla 84).

#### **IV.A.3.1.6.- Velocidad de muerte microbiana.**

En la Tabla 38 se presenta la velocidad de muerte microbiana detectada para los distintos grupos microbianos estudiados en los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL).

**Tabla 38.** Velocidad de muerte microbiana. Descenso medio de log ufc/semana.

	CA	CVL
aerobios mesof	0,044	0,043
enterobacterias	0,238	0,256
coliformes	0,248	0,255
estafilococos	0,103	0,130
micrococos	0,079	0,066
BAL	0,047	0,042
levaduras	0,127	0,138
mohos	0,070	0,069

En líneas generales la tasa de muerte microbiana fue muy similar entre los lotes de quesos elaborados con cuajo animal y los elaborados con coagulante vegetal liofilizado, coincidiendo con Tejada (2001). Los grupos microbianos de enterobacterias y coliformes presentaron las mayores velocidades de muerte microbiana mientras que los aerobios mesófilos y bacterias ácido lácticas presentaron la tasa de muerte microbiana más lenta a lo largo del período de maduración considerado.



#### IV.A.3.2.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.

##### IV.A.3.2.1.- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración.

En la Tabla 39 se muestran los valores de la Lambda de Wilks y los valores F de los 8 grupos microbianos estudiados. Los recuentos de mohos es la variable que más ha contribuido a la discriminación de los diferentes períodos de maduración considerados. Por otra parte los recuentos de los micrococos y de levaduras fueron las variables con menor capacidad de diferenciación de los distintos intervalos de maduración considerados, y fueron excluidas del modelo estadístico al objeto de simplificar.

**Tabla 39.** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	AM	enterob	coliform	estafiloc	microco	BAL	levadu	mohos
Lambda de Wilks	0,54	0,64	0,63	0,40	0,83	0,37	0,70	0,27
Valor F	4,03	2,60	2,78	6,86	0,93	8,03	1,97	12,84

En la Tabla 40 se muestran las distancias establecidas entre los distintos días de maduración en función de los recuentos microbianos estudiados. Las mayores distancias se establecieron entre los quesos con 15 y 180 días de maduración, con una distancia de los cuadrados de Mahalanobis de 734,8.

**Tabla 40.-** Distancias entre grupos de los cuadrados de Mahalanobis.

	2	15	30	60	90	120	180
2	0,0	78,1	56,7	150,9	312,0	481,1	614,0
15	78,1	0,0	60,3	169,6	348,2	555,3	734,8
30	56,7	60,3	0,0	49,0	168,5	306,7	443,9
60	150,9	169,6	49,0	0,0	38,1	121,6	215,1
90	312,0	348,2	168,5	38,1	0,0	26,7	85,3
120	481,1	555,3	306,7	121,6	26,7	0,0	33,8
180	614,0	734,8	443,9	215,1	85,3	33,8	0,0

A partir de las funciones discriminantes obtenemos la matriz de clasificación (Tabla 41) donde todos los quesos analizados se han clasificado correctamente.

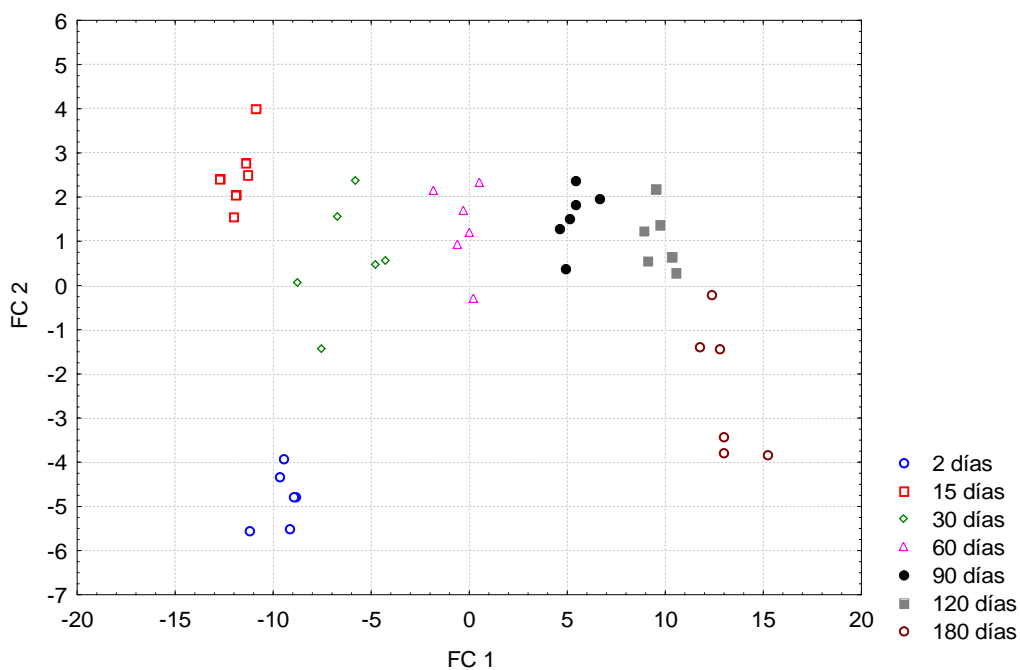
Resultados y Discusión

**Tabla 41.-** Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.

	Correcto (%)	2	15	30	60	90	120	180
2	100	6	0	0	0	0	0	0
15	100	0	6	0	0	0	0	0
30	100	0	0	6	0	0	0	0
60	100	0	0	0	6	0	0	0
90	100	0	0	0	0	6	0	0
120	100	0	0	0	0	0	6	0
180	100	0	0	0	0	0	0	6
Total	100	6	6	6	6	6	6	6
Correcto								

A partir de las dos primeras funciones canónicas se representan en el diagrama de dispersión (Figura 34) los quesos del presente trabajo.

**Figura 34.-** Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.



#### **IV.A.3.2.2.- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante.**

En la Tabla 42 se presentan los valores de Lambda de Wilks y valor F de los parámetros microbiológicos estudiados con relación al tipo de coagulante ensayado. Todos los recuentos presentaron valores de Lambda de Wilks muy próximos a la unidad, es decir, una escasa capacidad discriminante, lo cual es lógico teniendo en cuenta que no se han establecido diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos con coagulante vegetal liofilizado para ninguno de los ocho grupos microbianos estudiados.

**Tabla 42.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	AM	enterob	coliform	estafiloc	microco	BAL	levadu	mohos
Lambda de Wilks	0,97	1,00	1,00	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00
Valor F	0,94	0,06	0,04	0,13	0,17	0,39	0,11	0,15

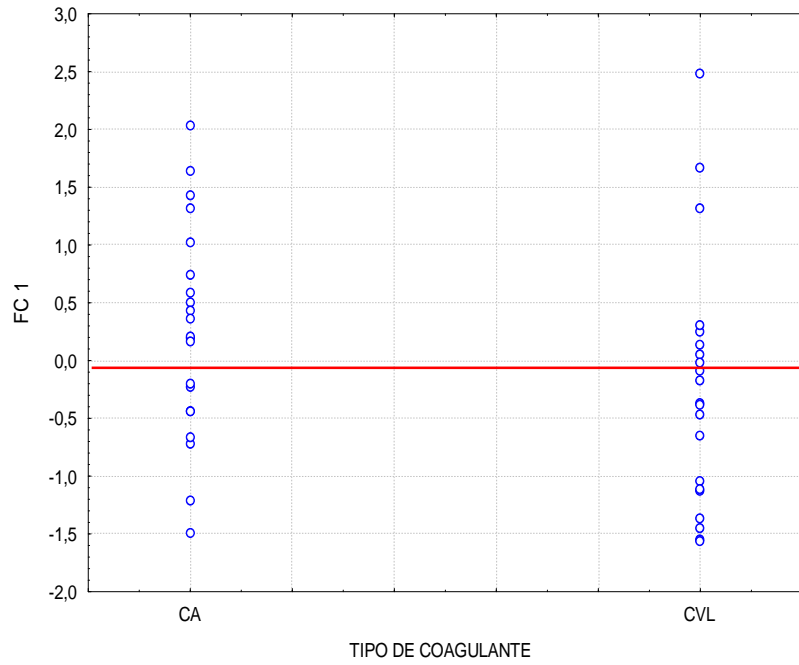
A partir de las variables microbiológicas se obtiene la función discriminante y con ella la matriz de clasificación donde sólo se clasificaron correctamente en 64 % de los quesos estudiados (Tabla 43), debido a la escasa capacidad discriminante de los recuentos microbianos considerados con respecto a los dos tipos de coagulantes ensayados.

**Tabla 43.-** Número de quesos correctamente clasificados mediante la función discriminante .

	Correcto (%)	CA	CVL
CA	62	13	8
CVL	67	7	14
Total Correcto	64	20	22

Con la función discriminante obtenemos el diagrama de dispersión donde aparecen los grupos de quesos elaborados con ambos tipos de coagulante. La función discriminante clasificó incorrectamente 8 quesos elaborados con cuajo animal y 7 quesos fabricados con coagulante vegetal liofilizado, que se muestran a ambos lados de la línea de la función discriminante (Figura 35).

**Figura 35.-** Representación de los quesos en función del tipo de coagulante utilizado mediante la función canónica FC 1.



#### **IV.A.4.- ELEMENTOS MINERALES.**

En las Tablas 44, 45, 46, 47 y 48 y Figuras 36, 37, 38, 39 y 40 se muestran las cantidades, expresadas como mg/100 g de queso de calcio, fósforo, sodio, potasio y magnesio de los lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y los fabricados con coagulante vegetal liofilizado (CVL), respectivamente.

En la Tabla 49 se recogen los valores medios, expresados en función de la materia seca, de los elementos minerales mayoritarios estudiados, respectivamente, de los lotes de quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos con coagulante vegetal liofilizado. En la Figura 41 se muestra la representación gráfica de la relación Ca/P de los quesos de la presente memoria.

Todos los elementos minerales estudiados en el presente trabajo, expresados en función del queso, se vieron afectados muy significativamente ( $p < 0,001$ , con excepción del hierro, con significación  $p < 0,05$ ) por el tiempo de maduración, observándose una evolución ascendente a lo largo del período de maduración considerado, a causa de la pérdida de humedad detectada. Por otra parte no se han establecido diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre las tasas de los elementos minerales mayoritarios, expresadas tanto en función de queso fresco como de la materia seca, de los quesos elaborados con cuajo animal y de los fabricados con coagulante vegetal liofilizado.

Tejada (2001) no estableció, en líneas generales, diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los contenidos de elementos minerales de los lotes de queso de Los Pedroches elaborados con coagulante vegetal fresco, con coagulante vegetal liofilizado y con cuajo animal. Además los contenidos de elementos minerales de los lotes elaborados con coagulante vegetal liofilizado son similares a los de los lotes obtenidos con cipsosina recombinante (apartado IV.B.2), como se verá más adelante.

#### IV.A.4.1.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE MACROMINERALES DE LOS QUESOS A LO LARGO DE LA MADURACIÓN.

##### IV.A.4.1.1.- Calcio.

Los contenidos de calcio de la presente memoria son similares a los obtenidos por otros autores en queso tipo Manchego (Moreno *et al.*, 1994b), queso de Los Pedroches (Sanjuán *et al.*, 1998; Tejada, 2001), queso Serra de Estrella (Macedo y Malcata, 1997b) y queso Serpa (Roseiro *et al.*, 2003b). En queso de Los Pedroches Sanjuán (1992) detectó contenidos en calcio de 611 y 714 mg/100 g de queso a los 2 y 100 días de maduración, respectivamente. Fernández-Salguero y Gómez (1997) hallaron valores medios de calcio de 583, 722 y 626 mg/100 g de queso en quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra, respectivamente. Marcos *et al.* (1985) detectaron valores medios de calcio, expresado como mg/100 g de queso, de 685, 1.153, 757 y 753 en quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal. Gambelli *et al.* (1999) obtuvieron en queso Mozzarella, Provolone, Emmental y Pecorino contenidos medios en calcio de 337, 800, 103 y 994 mg/100 g de queso, respectivamente. Mataix *et al.* (1995) señalan contenidos en calcio de 1.200 y 600 mg/100 g queso en quesos Manchego y Roquefort, respectivamente. En queso de Los Pedroches Fernández-Salguero *et al.*, (1977) detectaron valores de calcio superiores y Gómez *et al.*, (1998) valores inferiores a los obtenidos por nosotros, respectivamente.

Cuando el calcio se expresa en función de la materia seca (Tabla 49) se observa una disminución a lo largo del período de maduración estudiado, coincidiendo con Moreno *et al.* (1994b) en queso tipo Manchego madurado 6 meses a 10 °C, y Sanjuán *et al.* (1998) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches.

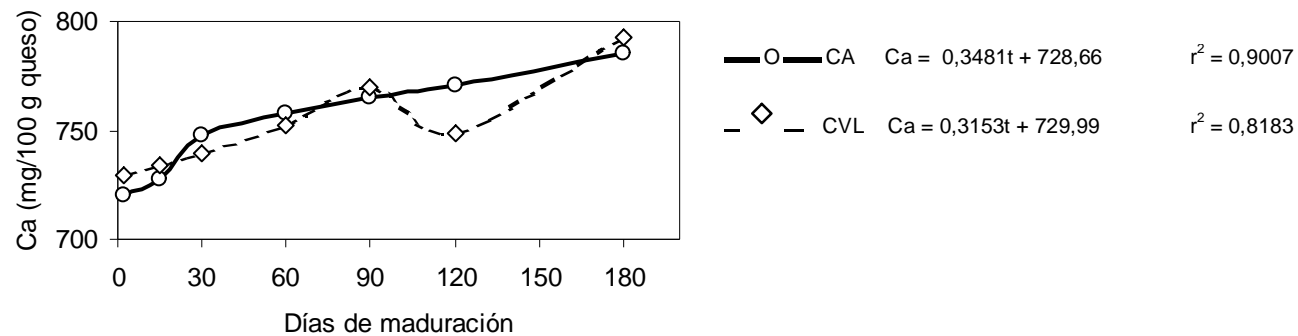
Sanjuán *et al.* (1998) y Tejada (2001) tampoco observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los contenidos de calcio, expresados como materia seca, de los quesos elaborados con cuajo animal con respecto a los elaborados con coagulante vegetal.

**Tabla 44.-** Contenido en calcio (mg/100 g de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	721	734	748	759	779	774	780
Lote CA2	709	715	738	741	754	760	779
Lote CA3	730	734	756	773	762	779	796
x ± sd	720 ± 11 <sup>a</sup>	728 ± 11 <sup>a</sup>	747 ± 9 <sup>abc</sup>	758 ± 16 <sup>abc</sup>	765 ± 13 <sup>abc</sup>	771 ± 10 <sup>abc</sup>	785 ± 10 <sup>bc</sup>
CVL							
LoteCVL1	711	721	741	754	779	740	806
Lote CVL2	762	757	739	751	758	704	770
Lote CVL3	715	724	738	753	773	803	801
x ± sd	729 ± 28 <sup>ab</sup>	734 ± 20 <sup>ab</sup>	739 ± 2 <sup>abc</sup>	753 ± 2 <sup>abc</sup>	770 ± 11 <sup>abc</sup>	749 ± 50 <sup>abc</sup>	792 ± 20 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 36.-** Evolución del calcio de los quesos a lo largo de la maduración.



#### **IV.A.4.1.2.- Fósforo.**

En queso de Los Pedroches, Sanjuán *et al.* (1998) y Tejada (2001) obtuvieron contenidos de fósforo similares y superiores, respectivamente, a los del presente trabajo. Macedo y Malcata (1997b) hallaron valores de este mineral superiores a los obtenidos por nosotros en queso Serra de Estrella madurado durante 35 días.

En quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero *et al.* (1997) detectaron contenidos medios en fósforo de 820, 547 y 605 mg/100 g de queso. Marcos *et al.* (1985) observaron valores medios de fósforo de 544, 725, 522 y 534 mg/100 g de queso en quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente.

En queso Roquefort, Mataix *et al.* (1995) señalan tasas de fósforo de 431 mg/100 g queso. El tiempo de maduración no modificó significativamente ( $p > 0,05$ ) a los valores de fósforo, cuando estos se expresaron en función de la materia seca, de los quesos estudiados, coincidiendo con Tejada (2001) en queso de Los Pedroches. En esta misma variedad de queso Sanjuán *et al.*, (1998) y Sousa y Malcata (1997a) en queso Serra de Estrella señalan un descenso de los valores de fósforo de los quesos a lo largo de la maduración, con unos valores medios que oscilaron desde 875 a 759 mg/100 g de MS, y desde 811 a 763 mg/100 g de MS, respectivamente.

A diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo Sanjuán *et al.* (1998) detectaron en quesos de Los Pedroches elaborados con coagulante vegetal unos contenidos de fósforo significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) respecto a los elaborados con cuajo animal. Estos autores sugieren que en los quesos elaborados con coagulante vegetal se produce una mayor pérdida por parte de la cuajada de calcio y fósforo debido a que se registra, generalmente, un mayor tiempo de coagulación cuando se emplea este tipo de coagulante. En este sentido Czulak *et al.* (1970) observaron en queso tipo Cheddar que un largo contacto de la cuajada con el suero ocasionaba una disminución en los contenidos de estos elementos minerales mayoritarios en el queso fabricado. Debido a que el tiempo de coagulación para el cuajo animal y el coagulante vegetal liofilizado fue muy similar este fenómeno no pudo tener lugar en el presente trabajo.



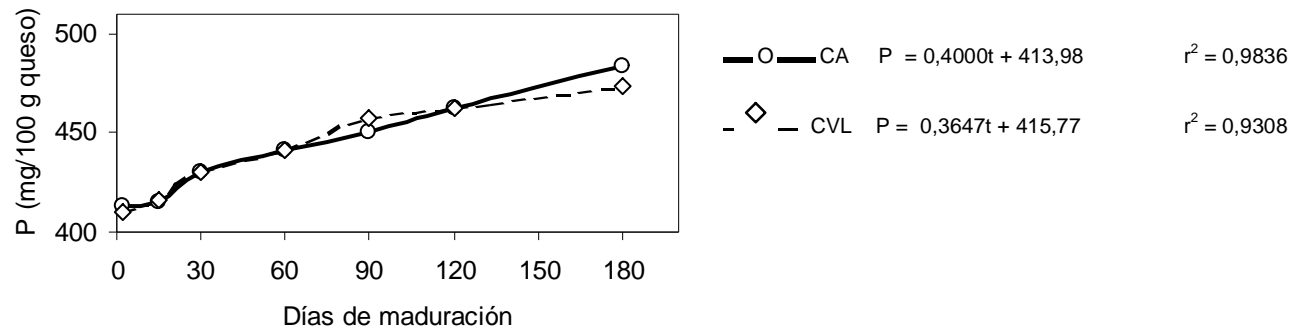
**Tabla 45.-** Contenido en fósforo (mg/100 g de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	402	420	430	443	441	466	488
Lote CA2	410	414	441	447	452	464	494
Lote CA3	427	411	420	435	457	458	470
x ± sd	413 ± 13 <sup>ab</sup>	415 ± 5 <sup>ab</sup>	430 ± 11 <sup>abc</sup>	442 ± 6 <sup>bcd</sup>	450 ± 8 <sup>cde</sup>	463 ± 4 <sup>def</sup>	484 ± 12 <sup>f</sup>
CVL							
LoteCVL1	401	425	426	430	454	457	477
Lote CVL2	406	409	437	441	473	473	459
Lote CVL3	424	415	427	452	447	457	485
x ± sd	410 ± 12 <sup>a</sup>	416 ± 8 <sup>ab</sup>	430 ± 6 <sup>abc</sup>	441 ± 11 <sup>bcd</sup>	458 ± 13 <sup>cdef</sup>	462 ± 9 <sup>def</sup>	474 ± 13 <sup>f</sup>

<sup>a-f</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

182

**Figura 37.-** Evolución del fósforo de los quesos a lo largo de la maduración.



#### **IV.A.4.1.3.- Sodio.**

Como cabría esperar la evolución de la tasa de Na de los quesos del presente trabajo fue muy similar a la de la sal con un fuerte incremento desde los 2 hasta los 15 días de maduración, mostrando posteriormente un aumento más moderado. Macedo y Malcata (1997b) constataron que en queso Serra de Estrella la difusión de sal desde el exterior hacia el interior de la pasta se produce entre los 2 y 7 días de maduración. Moreno *et al.* (1994b) en queso tipo Manchego y Sanjuán *et al.* (1998) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches también observaron ese mayor incremento en los contenidos de sodio al principio de la maduración, pero con valores superiores a los del presente trabajo. Roseiro *et al.* (2003b) detectaron contenidos en sodio superiores a los nuestros en queso Serpa madurado durante dos meses.

En quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero y Gómez (1997) señalan contenidos medios de 507, 890 y 576 mg de Na/100 g de queso, respectivamente. Marcos *et al.* (1985) hallaron valores medios de sodio de 625, 816, 443 y 658 mg /100 g de queso en quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente. Gambelli *et al.* (1999) detectaron contenidos medios en sodio ligeramente inferiores en quesos Mozzarella y Emmental y valores muy superiores en queso Pecorino, respectivamente, a los de la presente memoria. Mataix *et al.* (1995) observaron una tasa de sodio de 1.600 en queso Roquefort.

En queso de Los Pedroches Sanjuán *et al.* (1998) no detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los contenidos de sodio de los quesos elaborados con cuajo animal con respecto de los elaborados con coagulante vegetal mientras que Tejada (2001) estableció diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los contenidos de sodio de los quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos con coagulante vegetal fresco y coagulante liofilizado, aunque estas diferencias se pueden atribuir principalmente a la poca estandarización de proceso de salado en la fabricación de quesos artesanos.

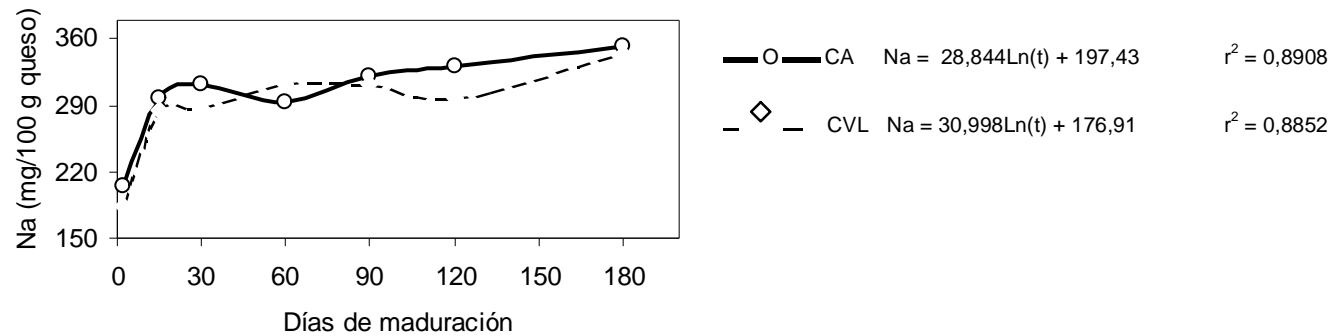
Cuando se expresó en función de la materia seca (Tabla 49) el sodio presentó una evolución ascendente a lo largo de la maduración, coincidiendo con Tejada (2001) en queso de Los Pedroches, Moreno *et al.* (1994b) en queso tipo Manchego y Roseiro *et al.* (2003b) en queso Serpa.

**Tabla 46.-** Contenido en sodio (mg/100 g de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
Coagulante	2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>							
Lote CA1	212	291	306	320	345	340	369
Lote CA2	194	290	382	307	354	373	360
Lote CA3	209	314	246	257	262	280	329
x ± sd	205 ± 10 <sup>ab</sup>	298 ± 14 <sup>abc</sup>	312 ± 68 <sup>abc</sup>	295 ± 34 <sup>abc</sup>	320 ± 50 <sup>bc</sup>	331 ± 47 <sup>bc</sup>	353 ± 21 <sup>c</sup>
<b>CVL</b>							
LoteCVL1	203	276	276	295	322	325	332
Lote CVL2	168	325	343	396	371	303	368
Lote CVL3	178	256	245	248	246	266	333
x ± sd	183 ± 18 <sup>a</sup>	286 ± 36 <sup>abc</sup>	388 ± 50 <sup>abc</sup>	313 ± 76 <sup>bc</sup>	313 ± 63 <sup>bc</sup>	298 ± 30 <sup>abc</sup>	344 ± 21 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

**Figura 38.-.** Evolución del sodio de los quesos a lo largo de la maduración



#### **IV.A.4.1.4.- Potasio.**

En queso de Los Pedroches Gómez *et al.* (1998), Sanjuán *et al.* (1998), Sánchez (1999) y Tejada (2001) obtuvieron tasas de potasio similares a los de la presente memoria. Moreno *et al.* (1994b) en queso tipo Manchego, Macedo y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella y Roseiro *et al.* (2003b) en queso Serpa señalan contenidos de potasio superiores a los obtenidos por nosotros, y Fernández-Salguero y Gómez (1997) hallaron valores medios de 79, 94 y 104 mg de K/100 g de queso en quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra, respectivamente.

En quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, Marcos *et al.* (1985) detectaron contenidos medios en potasio de 80, 96, 77 y 89 mg/100 g de queso, respectivamente. En un estudio sobre la composición mineral media de diferentes variedades de quesos italianos Gambelli *et al.* (1999) observaron valores de 8, 70, 55 y 44 mg K/100 g de queso en quesos Mozzarella, Provolone, Emmental y Pecorino, respectivamente. En queso Roquefort, Mataix *et al.* (1995) señalan tasas de potasio de 120 mg/100 g de queso.

La evolución del potasio, expresado en función de la materia seca, a lo largo del período madurativo considerado es constante, sin que se hallan detectado diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los valores de potasio de los quesos a los distintos tiempos de maduración, coincidiendo con Tejada (2001) en queso de Los Pedroches y Roseiro *et al.* (2003b) en queso Serpa. Moreno *et al.* (1994b) en queso tipo Manchego y Macedo y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella observaron una disminución estadísticamente significativa ( $p<0,05$ ) de los contenidos de potasio durante la maduración.

#### **IV.A.4.1.5.- Magnesio.**

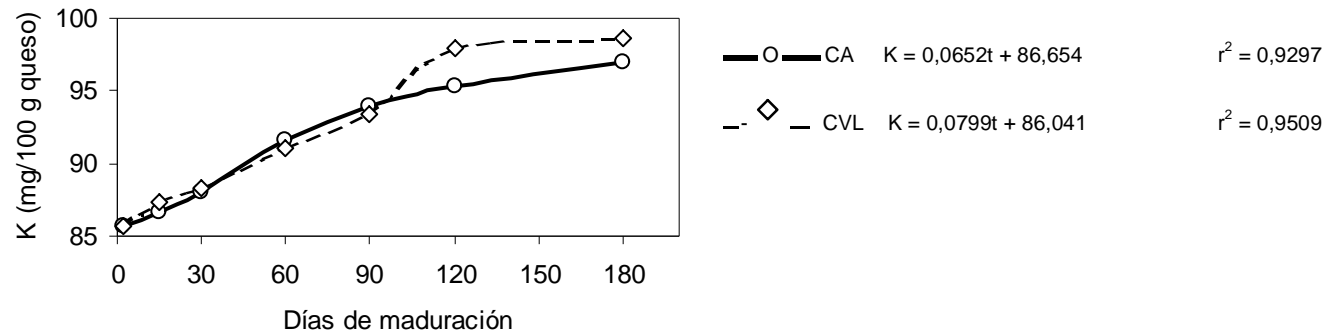
Los contenidos de Mg del presente trabajo son similares a los obtenidos por Moreno *et al.* (1994b) en queso tipo Manchego, Gómez *et al.* (1998), Sánchez (1999) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches y Roseiro *et al.* (2003b) en queso Serpa, e inferiores a las detectadas por Macedo y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella y Sanjuán *et al.* (1998) en queso de Los Pedroches. En quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra, Fernández-Salguero y Gómez (1997) hallaron contenidos medios en magnesio de 25, 31 y 33 mg/100 g de queso.

**Tabla 47.-** Contenido de potasio (mg/100 g de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
Coagulante	2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>							
Lote CA1	86	87	88	98	91	97	98
Lote CA2	83	87	90	91	91	93	96
Lote CA3	88	86	86	86	100	96	97
x ± sd	86 ± 3 <sup>a</sup>	87 ± 1 <sup>a</sup>	88 ± 2 <sup>ab</sup>	92 ± 6 <sup>abcd</sup>	94 ± 5 <sup>abcd</sup>	95 ± 2 <sup>abcd</sup>	97 ± 1 <sup>bcd</sup>
<b>CVL</b>							
LoteCVL1	88	86	88	97	97	98	101
Lote CVL2	84	89	91	88	95	97	99
Lote CVL3	85	87	86	88	88	99	96
x ± sd	86 ± 2 <sup>a</sup>	87 ± 2 <sup>ab</sup>	88 ± 3 <sup>abc</sup>	91 ± 5 <sup>abcd</sup>	93 ± 5 <sup>abcd</sup>	98 ± 1 <sup>cd</sup>	99 ± 3 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

**Figura 39.-** Evolución del potasio de los quesos a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

Marcos *et al.* (1985) observaron valores medios de 59, 46, 21 y 22 mg Mg/100 g de queso en quesos comerciales Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, respectivamente. En quesos Mozzarella, Provolone, Emmental y Pecorino Gambelli *et al.* (1999) hallaron tasas medias de magnesio de 10, 40, 30 y 45 mg/100 g de queso, respectivamente. Mataix *et al.* (1995) observaron contenidos en magnesio de 25 y 50 mg/100 g queso en quesos comerciales Manchego y Roquefort, respectivamente.

Moreno *et al.* (1994b) en queso tipo Manchego y Macedo y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella observaron un descenso en los contenidos de magnesio desde 61 a 59 mg/100 g MS y desde 123 a 100 mg/100 g MS, respectivamente.

No obstante, en el presente trabajo cuando los contenidos de Mg se expresaron en función de la materia seca ninguno de los intervalos de tiempo de maduración considerados influyó significativamente ( $p>0,05$ ) en los valores de este elemento mineral mayoritario (Tabla 49), coincidiendo con Tejada (2001) en queso de Los Pedroches y Roseiro *et al.* (2003b) en queso Serpa.

Como se observa en la Tabla 49 la relación Ca/P presentó una leve evolución descendente a lo largo de la maduración (Figura 41), sin afectarse significativamente ( $p>0,05$ ) por el tiempo de maduración. Por otra parte, el tipo de coagulante no afectó a la relación Ca/P de manera significativa ( $p>0,05$ ).

Coincidiendo con otros estudios de quesos de oveja, como el queso de La Serena (Marsilla, 1979), queso Idiazábal, Roncal y Manchego (Millán, 1981), Torta del Casar (Ruiz-Iñiguez *et al.*, 1984), de Los Pedroches (Sanjuán *et al.*, 1998; Fernández-Salguero y Gómez, 1997), Grazalema (Fernández-Salguero y Gómez, 1997) y queso Serra de Estrela (Macedo y Malcata, 1997b), la relación Ca/P siempre fue mayor a la unidad.

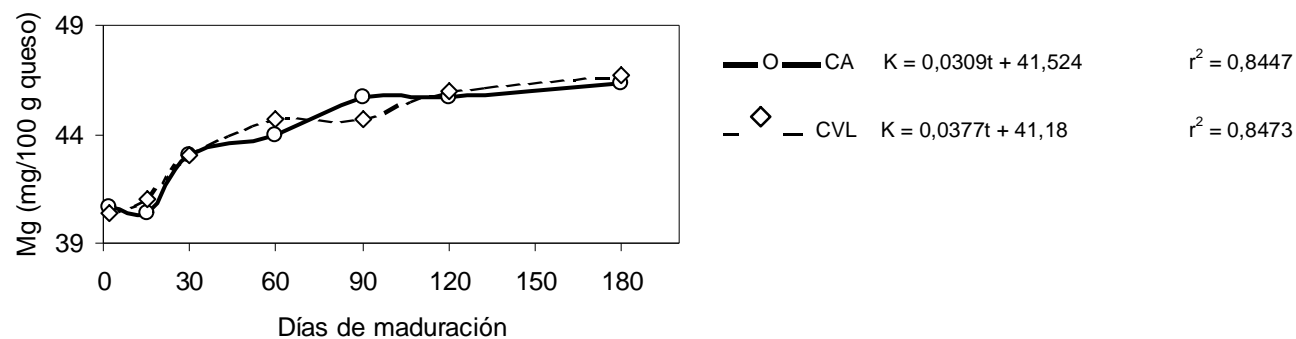
Esta relación descendió a lo largo de la maduración (Tabla 49) debido a que los contenidos de calcio disminuyen más intensamente que los de fósforo. Creamer y Olson, (1988), Kimura *et al.* (1992), Lucey y Fox (1993), Fresno *et al.* (1996) han observado también este descenso en la relación Ca/P. Dichos autores han estudiado el efecto de la acidificación sobre esta relación a lo largo de la maduración de diversos tipos de quesos detectando una correlación negativa entre los contenidos de Ca, expresado como mg/100 g MS, y el índice de acidez.

**Tabla 48.-** Contenido en magnesio (mg/100 g de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	42	40	42	44	46	46	46
Lote CA2	39	41	44	45	44	46	46
Lote CA3	41	40	43	43	47	45	47
x ± sd	41 ± 2 <sup>a</sup>	40 ± 1 <sup>a</sup>	43 ± 1 <sup>abc</sup>	44 ± 1 <sup>abc</sup>	46 ± 2 <sup>bc</sup>	46 ± 1 <sup>bc</sup>	46 ± 1 <sup>c</sup>
CVL							
Lote CVL1	39	40	43	44	47	47	47
Lote CVL2	44	42	46	45	45	46	46
Lote CVL3	38	41	40	45	42	45	47
x ± sd	40 ± 3 <sup>a</sup>	41 ± 1 <sup>ab</sup>	43 ± 3 <sup>abc</sup>	45 ± 1 <sup>abc</sup>	45 ± 3 <sup>abc</sup>	46 ± 1 <sup>c</sup>	47 ± 1 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

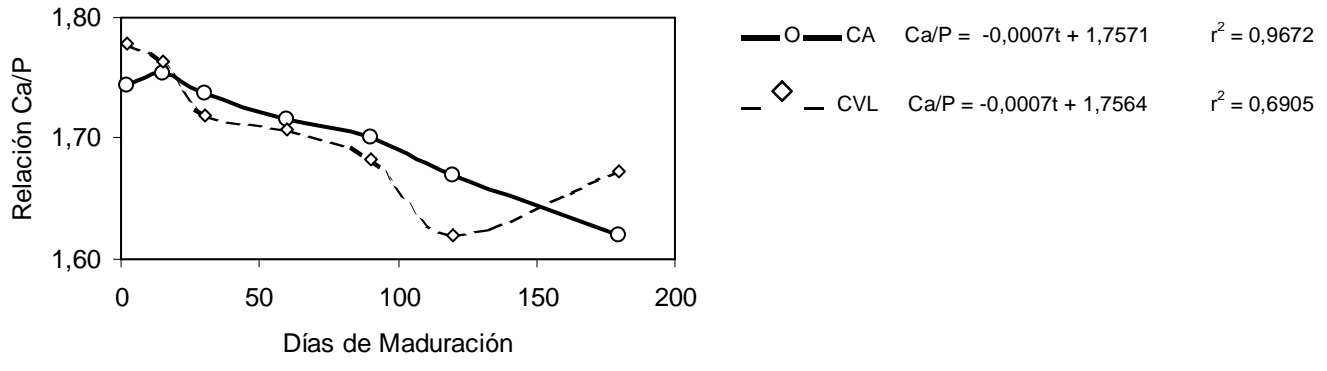
**Figura 40.-** Evolución del magnesio de los quesos a lo largo de la maduración.



**Tabla 49.-** Contenidos medios de macrominerales (mg/100 g materia seca queso) de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración

	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	
CA							
Ca	1.250 ± 38	1.203 ± 7	1.197 ± 6	1.192 ± 33	1.180 ± 13	1.201 ± 2	
P	717 ± 17	686 ± 12	689 ± 22	695 ± 8	694 ± 18	721 ± 2	
Na	356 ± 16	493 ± 18	499 ± 113	463 ± 48	494 ± 76	517 ± 8	
K	149 ± 3	143 ± 2	141 ± 4	144 ± 8	145 ± 9	148 ± 5	
Mg	71 ± 3	67 ± 2	69 ± 2	69 ± 1	70 ± 2	71 ± 3	
Ca/P	1,74 ± 0,04	1,75 ± 0,03	1,74 ± 0,06	1,72 ± 0,06	1,70 ± 0,06	1,67 ± 0,0	
CVL							
Ca	1.255 ± 94	1.203 ± 48	1.168 ± 9	1.175 ± 15	1.181 ± 7	1.165 ± 4	
P	705 ± 15	683 ± 22	679 ± 12	689 ± 26	703 ± 27	720 ± 3	
Na	315 ± 37	469 ± 65	455 ± 78	488 ± 116	481 ± 100	465 ± 6	
K	147 ± 8	143 ± 4	140 ± 4	142 ± 7	143 ± 8	153 ± 4	
Mg	69 ± 8	67 ± 2	68 ± 4	70 ± 2	69 ± 4	72 ± 4	
Ca/P	1,78 ± 0,10	1,76 ± 0,08	1,72 ± 0,03	1,71 ± 0,04	1,68 ± 0,07	1,62 ± 0,0	

**Figura 41.** Evolución de la relación Ca/P de los quesos a lo largo de la maduración.





La causa de estas mayores pérdidas de calcio en relación con el fósforo debido a la acidificación está en la estructura de la micela de caseína y las características de los enlaces establecidos en su seno por ambos elementos. El calcio micelar se encuentra casi en su totalidad en combinación única con residuos cargados de caseína, citrato y fosfato esterificado o no, mientras que casi el 40 % del fosfato está en la micela de caseína esterificado por las caseínas  $\alpha_{s-1}$ ,  $\alpha_{s-2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , no solubilizándose cuando el pH desciende (Walstra y Jenness, 1987). Por esta razón cuando el medio se acidifica, el calcio se solubiliza con mayor facilidad que el fósforo. Kindstedt y Kosikowski (1988) señalan que el tamaño molecular inferior del ión calcio con respecto al fosfato puede que también contribuya a que sus pérdidas fuesen mayores debido a su mayor movilidad. Por otra parte se ha observado que a medida que aumenta el tiempo de maduración se producen pequeñas migraciones de calcio desde el interior de la pasta hacia la superficie (Matche y Fanni, 1978; Le Graet *et al.*, 1983; Román Esteban, 1990; Moreno *et al.*, 1994b). Sin embargo Le Graet y Brulé (1988) señalaban que como este fenómeno no se daba cuando se empleaba un antifúngico al queso, esta migración sólo debía producirse en presencia de flora fúngica.

#### IV.A.4.2- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE MICROMINERALES DE LOS QUESOS A LO LARGO DE LA MADURACIÓN.

Las tasas, expresadas como  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso, y la representación gráfica de los elementos minerales minoritarios manganeso, hierro zinc y cobre se recogen en las Tablas 50, 51, 52 y 53 y Figuras 42, 43, 44 y 45, respectivamente. En la Tabla 54 y Figura 46 se muestran los valores medios, expresados en función de la materia seca, de los elementos minerales minoritarios estudiados.

Como viene siendo habitual en los quesos el cinc y el hierro fueron los elementos minerales minoritarios más abundantes en todos los lotes mientras que los contenidos de manganeso y cobre fueron los más bajos. No se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes intervalos de maduración considerados ni entre los coagulantes ensayados cuando los elementos minerales minoritarios se expresaron en función de la materia seca.

#### **IV.A.4.2.1.- Manganeso (Mn).**

En queso de Los Pedroches, Tejada (2001) observó que los contenidos de Mn, expresados en función de la materia seca, aumentaban, pero de manera irregular, a lo largo de 90 días de maduración.

Tejada (2001) en queso de Los Pedroches y Macedo y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella detectaron valores de manganeso similares y superiores, respectivamente, a los de la presente memoria. Fernández-Salguero y Gómez (1997) en quesos comerciales Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra hallaron contenidos medios en Mn de 91, 85 y 71  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso, respectivamente. Marcos *et al.* (1985) en quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal observaron valores medios de manganeso de 98, 85, 107 y 122  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso, respectivamente.

Tejada (2001) y Sánchez (1999) observaron mayores contenidos de este micromineral en quesos de oveja artesanales elaborados con coagulante vegetal con respecto a los coagulados con cuajo animal. Como la presencia de manganeso en la leche es escasa, este incremento de Mn en quesos coagulados con cinarasas puede ser debido a una alta presencia de este mineral en los extractos vegetales.

#### **IV.A.4.2.2.- Hierro (Fe).**

Los contenidos de Fe de los lotes de quesos del presente trabajo fueron similares a los obtenidos por Sánchez (1999) en quesos Idiazábal y Roncal comerciales e inferiores a los detectados por Moreno *et al.* (1992) en queso tipo Manchego y Sanjuán *et al.* (1998) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches. Fernández-Salguero y Gómez (1997) hallaron valores medios de 865, 788 y 752  $\mu\text{g Fe}/100\text{ g}$  de queso en quesos Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra, respectivamente. En quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal Marcos *et al.* (1985) señalan contenidos medios en hierro de 544, 1.508, 466 y 766  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso, respectivamente. Gambelli *et al.* (1999) señalan valores medios de 100, 200, 130 y 210  $\mu\text{g Fe}/100\text{ g}$  de queso en quesos comerciales Mozzarella, Provolone, Emmental y Pecorino, respectivamente.

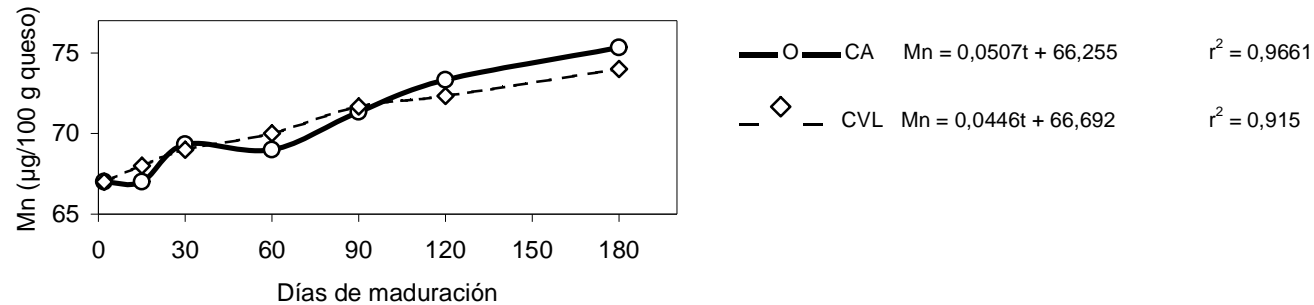
**Tabla 50.-** Contenido en manganeso ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	69	65	68	69	73	72	76
Lote CA2	63	64	68	70	71	75	77
Lote CA3	69	69	69	68	70	73	73
x $\pm$ sd	67 $\pm$ 3 <sup>ab</sup>	66 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	68 $\pm$ 1 <sup>abcd</sup>	69 $\pm$ 1 <sup>abcd</sup>	71 $\pm$ 2 <sup>abcde</sup>	73 $\pm$ 2 <sup>cde</sup>	75 $\pm$ 2 <sup>e</sup>
CVL							
Lote CVL1	67	65	69	69	70	72	75
Lote CVL2	66	69	67	73	74	72	73
Lote CVL3	68	64	68	68	71	73	74
x $\pm$ sd	67 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>	66 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	68 $\pm$ 1 <sup>abc</sup>	70 $\pm$ 3 <sup>abcde</sup>	72 $\pm$ 2 <sup>abcde</sup>	72 $\pm$ 1 <sup>bcde</sup>	74 $\pm$ 1 <sup>de</sup>

<sup>a-e</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

192

**Figura 42.-** Evolución del manganeso de los quesos a lo largo de la maduración



## Resultados y Discusión

Mataix *et al.* (1995) señalan en quesos comerciales Manchego y Roquefort tasas de hierro de 600 y 500  $\mu\text{g}/100$  g queso, respectivamente.

Sanjuán *et al.* (1998) tampoco hallaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los contenidos de hierro de lotes de queso de Los Pedroches elaborados con coagulante vegetal y cuajo animal. Sin embargo Sánchez (1999) en diferentes tipos de quesos artesanos y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches observaron contenidos de hierro significativamente superiores ( $p<0,05$ ) en lotes de quesos elaborados con coagulante vegetal con respecto a los lotes coagulados con cuajo animal. Al igual que en el caso del manganeso este fenómeno puede ser debido a la aportación de hierro en los extractos vegetales del cardo.

El tiempo de maduración no afectó significativamente ( $p>0,05$ ) a los contenidos de hierro de los quesos estudiados cuando éstos se expresaron en función de la materia seca (Tabla 54). Moreno *et al.* (1992), en queso tipo Manchego detectaron una disminución significativa ( $p<0,05$ ) del hierro a lo largo de la maduración con unos valores que oscilaron entre 204 y 158  $\mu\text{g}/100$  g de materia seca. Estos autores también observaron diferencias entre la concentración de hierro de las zonas interna, media y corteza del queso, a causa posiblemente de la contaminación superficial durante el proceso de fabricación del queso, coincidiendo con Le Graet y Brulé (1988).

### **IV.A.4.2.3.- Cinc (Zn).**

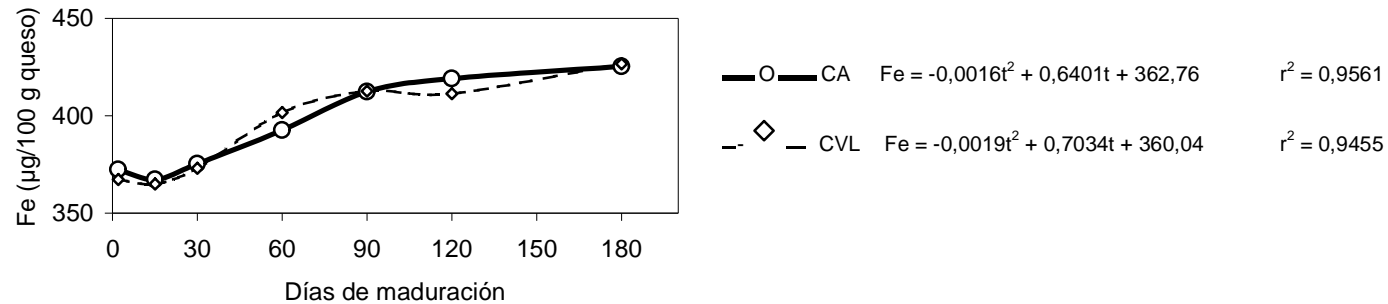
Tejada (2001) en queso de Los Pedroches y Sánchez (1999) en queso Idiazábal y Roncal observaron valores de cinc similares a los nuestros mientras que Sanjuán *et al.* (1998) en queso de Los Pedroches, Moreno *et al.* (1992) en queso tipo Manchego y Macedo y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella obtuvieron contenidos de cinc superiores e inferiores, respectivamente, a los detectados por nosotros. Fernández-Salguero y Gómez (1997) señalan valores medios de 2.005, 2.462 y 2.513  $\mu\text{g Zn}/100$  g de queso en quesos Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra, respectivamente. En quesos Manchego, Torta del Casar, Idiazábal y Roncal, Marcos *et al.* (1985) hallaron contenidos medios en cinc de 2.376, 2.007, 2.491 y 2.895  $\mu\text{g}/100$  g de queso, respectivamente. Gambelli *et al.* (1999) observaron valores medios de cinc de 2.600, 4.280, 3.910 y 3.370  $\mu\text{g}/100$  g de queso en quesos Mozzarella, Provolone, Emmental y Pecorino, respectivamente.

**Tabla 51.-** Contenido en hierro ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
Coagulante	2	15	30	60	90	120	180
<b>CA</b>							
Lote CA1	362	364	366	371	429	436	387
Lote CA2	381	357	439	423	405	409	403
Lote CA3	374	381	321	384	403	412	486
$x \pm \text{sd}$	$372 \pm 10^a$	$367 \pm 12^{ab}$	$375 \pm 60^{ab}$	$393 \pm 27^{ab}$	$412 \pm 14^{ab}$	$419 \pm 15^{ab}$	$425 \pm 53^b$
<b>CVL</b>							
LoteCVL1	361	371	401	405	417	422	484
Lote CVL2	369	364	340	384	415	416	395
Lote CVL3	372	360	378	416	406	396	401
$x \pm \text{sd}$	$367 \pm 6^a$	$365 \pm 6^{ab}$	$373 \pm 31^{ab}$	$402 \pm 16^{ab}$	$413 \pm 6^{ab}$	$411 \pm 14^{ab}$	$427 \pm 50^b$

<sup>a-b</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 43.-** Evolución del hierro de los quesos a lo largo de la maduración

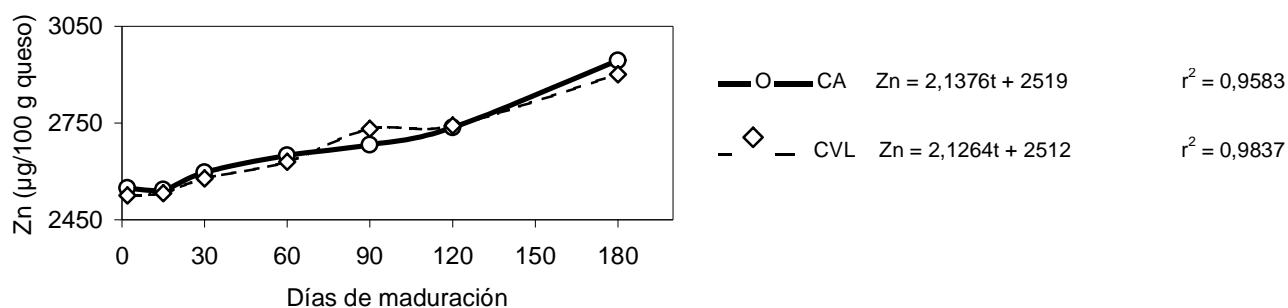


**Tabla 52.-** Contenido en cinc ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
CA						
Lote CA1	2.538	2.594	2.601	2.612	2.663	2.739
Lote CA2	2.603	2.517	2.591	2.976	2.703	2.795
Lote CA3	2.504	2.520	2.598	2.361	2.682	2.675
x $\pm$ sd	2.548 $\pm$ 50 <sup>a</sup>	2.544 $\pm$ 44 <sup>a</sup>	2.597 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	2.650 $\pm$ 309 <sup>a</sup>	2.683 $\pm$ 20 <sup>ab</sup>	2.736 $\pm$ 6
CVL						
Lote CVL1	2.519	2.485	2.592	2.673	2.783	3.201
Lote CVL2	2.540	2.518	2.579	2.605	2.719	2.422
Lote CVL3	2.518	2.594	2.564	2.611	2.693	2.604
x $\pm$ sd	2.526 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	2.532 $\pm$ 56 <sup>a</sup>	2.578 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	2.630 $\pm$ 38 <sup>a</sup>	2.732 $\pm$ 46 <sup>ab</sup>	2.742 $\pm$ 40

<sup>a-b</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 44.** Evolución del cinc de los quesos a lo largo de la maduración.



Sanjuán *et al.* (1998) detectaron mayores contenidos en cinc en los quesos elaborados con coagulante vegetal, atribuyendo este hecho a una adición por este elemento mineral de los extractos vegetales como en el caso anterior del manganeso y hierro.

En queso tipo Manchego Moreno *et al.* (1992) detectaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del cinc a lo largo de la maduración con unos valores que oscilaron entre 7.490 y 5.780  $\mu\text{g}/100$  g de materia seca. Estos autores también observaron mayores contenidos de este mineral en la corteza del queso en relación a la zona media e interna, a causa posiblemente de la contaminación superficial durante el proceso de fabricación del queso, coincidiendo con Le Graet y Brulé (1988). En queso Serra de Estrella Macedo y Malcata (1997b) señalan un descenso significativo de los valores de cinc expresados en función de la materia seca.

#### **IV.A.4.2.4.- Cobre.**

Los contenidos de cobre del presente trabajo son similares a los obtenidos por Moreno *et al.* (1992) en queso tipo Manchego, e inferiores y superiores a los obtenidos por Macedo y Malcata (1997b) en queso Serra y Sanjuán *et al.* (1998) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches, respectivamente. En quesos Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra Fernández-Salguero y Gómez (1997) detectaron valores medios de 133, 84 y 71  $\mu\text{g Cu}/100$  de queso. Marcos *et al.* (1985) hallaron contenidos medios en cobre de 102, 77 y 84  $\mu\text{g}/100$  de queso en quesos Manchego, Torta del Casar e Idiazábal, respectivamente.

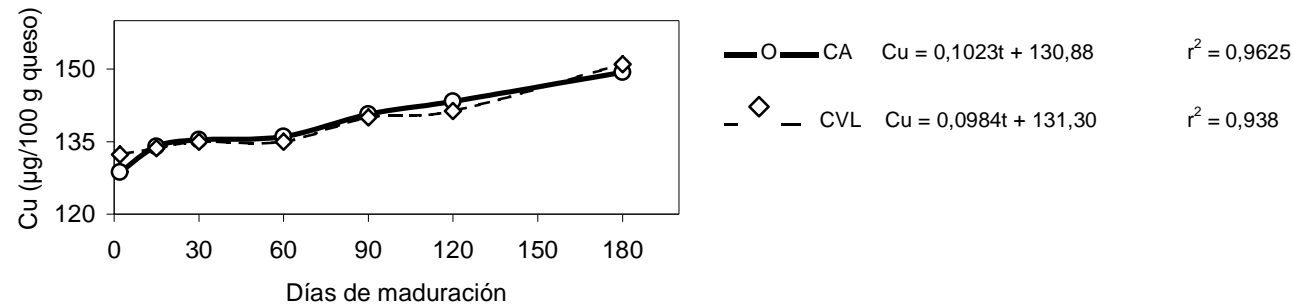
No se han establecido diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los contenidos en cinc, expresados como  $\mu\text{g}/100$  g de materia seca, entre los siete intervalos de maduración estudiados. Macedo y Malcata (1997b) en queso Serra de Estrella y Moreno *et al.* (1992) en queso Manchego observaron un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) de los valores de cobre cuando estos se expresaron en función de la materia seca.

**Tabla 53.-** Contenido en cobre ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
CA							
Lote CA1	136	131	139	136	147	143	150
Lote CA2	115	140	130	129	139	142	148
Lote CA3	135	131	137	143	136	145	150
$x \pm \text{sd}$	$129 \pm 12^a$	$134 \pm 5^{abc}$	$135 \pm 5^{abc}$	$136 \pm 7^{abc}$	$141 \pm 6^{abc}$	$143 \pm 2^{abc}$	$149 \pm 1^{bc}$
CVL							
Lote CVL1	132	127	132	141	137	138	157
Lote CVL2	137	131	140	134	146	142	149
Lote CVL3	128	143	133	130	137	144	147
$x \pm \text{sd}$	$132 \pm 5^{ab}$	$134 \pm 8^{abc}$	$135 \pm 4^{abc}$	$135 \pm 6^{abc}$	$140 \pm 5^{abc}$	$141 \pm 3^{abc}$	$151 \pm 5^c$

<sup>a-c</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 45.-** Evolución del cobre de los quesos a lo largo de la maduración



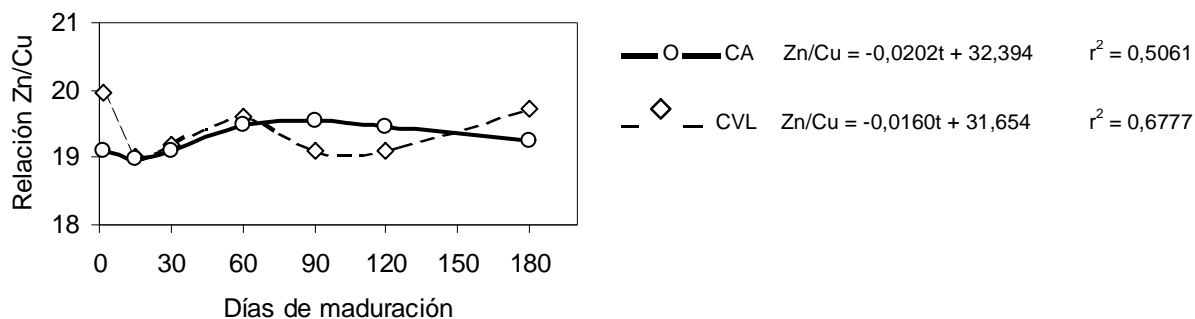


**Tabla 54.** Contenidos medios de micominerales ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  materia seca queso) de quesos elaborados con durante la maduración.

	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
CA						
Mn	$116 \pm 5$	$111 \pm 3$	$111 \pm 3$	$109 \pm 2$	$110 \pm 1$	$114 \pm 4$
Fe	$647 \pm 34$	$607 \pm 14$	$602 \pm 101$	$618 \pm 45$	$636 \pm 17$	$653 \pm 3$
Zn	$4.429 \pm 273$	$4.205 \pm 79$	$4.158 \pm 28$	$4.167 \pm 476$	$4.140 \pm 59$	$4.264 \pm 2$
Cu	$223 \pm 17$	$222 \pm 11$	$217 \pm 6$	$214 \pm 12$	$217 \pm 7$	$223 \pm 5$
Zn/Cu	$19,95 \pm 2,33$	$19,01 \pm 0,93$	$19,20 \pm 0,64$	$19,60 \pm 3,30$	$19,09 \pm 0,86$	$19,10 \pm 0,0$
CVL						
Mn	$115 \pm 4$	$111 \pm 3$	$109 \pm 4$	$109 \pm 4$	$110 \pm 4$	$113 \pm 3$
Fe	$632 \pm 25$	$598 \pm 21$	$589 \pm 46$	$627 \pm 30$	$633 \pm 13$	$641 \pm 4$
Zn	$4.345 \pm 217$	$4.150 \pm 18$	$4.072 \pm 19$	$4.105 \pm 37$	$4.191 \pm 76$	$4.274 \pm 6$
Cu	$228 \pm 18$	$219 \pm 9$	$213 \pm 7$	$211 \pm 6$	$215 \pm 10$	$220 \pm 5$
Zn/Cu	$19,10 \pm 0,57$	$18,98 \pm 0,74$	$19,11 \pm 0,62$	$19,49 \pm 0,57$	$19,53 \pm 0,85$	$19,45 \pm 3,$

198

**Figura 46.-** Evolución de la relación Zn/Cu de los quesos a lo largo de la maduración.



## Resultados y Discusión

La relación Zn/Cu presenta unos valores muy similares a lo largo de todo el período madurativo considerado. Ni el tiempo de maduración ni el tipo de coagulante ensayado modificaron significativamente ( $p>0,05$ ) la relación Zn/Cu. Sanjuán *et al.* (1998) y Tejada (2001) obtuvieron valores de la relación Zn/Cu superiores a los nuestros en queso de Los Pedroches.

Se han establecido correlaciones positivas altamente significativas ( $p<0,001$ ) entre los elementos minerales, expresados en relación al queso total, y la mayoría de parámetros composicionales que aumentaron durante los seis meses de maduración (proteína, grasa, ceniza, cloruro sódico y ácido láctico) y correlaciones negativas con la  $a_w$  y el contenido de humedad, variables que disminuyeron durante el período madurativo de estudio (Tabla 82).

#### IV.A.4.3.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.

##### IV.A.4.3.1.- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración.

Mediante esta técnica estadística se han determinado los elementos minerales con mayor capacidad discriminante entre los siete períodos de maduración considerados. En la Tabla 55 se recogen los valores de Lambda de Wilks y valores F de las variables de contenido mineral de los quesos del presente trabajo. Los contenidos en P y Na fueron las variables con mayor capacidad discriminante entre los diferentes intervalos de maduración y los contenidos en Fe, K y Mn fueron las variables con menor capacidad de diferenciación de los quesos en función del tiempo de maduración.

**Tabla 55.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
Lambda de Wilks	0,75	0,51	0,53	0,87	0,73	0,83	0,95	0,72	0,72
Valor F	1,46	4,36	4,05	0,66	1,63	0,92	0,25	1,77	1,71

En la Tabla 56 se recogen las distancias entre grupos, observándose que las máximas distancias se establecieron entre los quesos con 2 y 180 días de maduración.

**Tabla 56.-** Distancias entre grupos de los cuadrados de Mahalanobis.

	2	15	30	60	90	120	180
2	0,0	12,0	17,5	33,8	65,4	84,2	171,4
15	12,0	0,0	8,0	23,1	50,9	73,1	145,1
30	17,5	8,0	0,0	5,2	22,2	37,9	97,5
60	33,8	23,1	5,2	0,0	7,0	17,4	64,0
90	65,4	50,9	22,2	7,0	0,0	3,6	29,4
120	84,2	73,1	37,9	17,4	3,6	0,0	21,0
180	171,4	145,1	97,5	64,0	29,4	21,0	0,0

Mediante las funciones canónicas se obtiene la matriz de clasificación (Tabla 57) en la que aparecen correctamente clasificados el 88 % de los quesos estudiados. Los grupos de quesos con 60 y 90 días de maduración fueron los grupos con las muestras peor clasificados en el modelo estadístico.

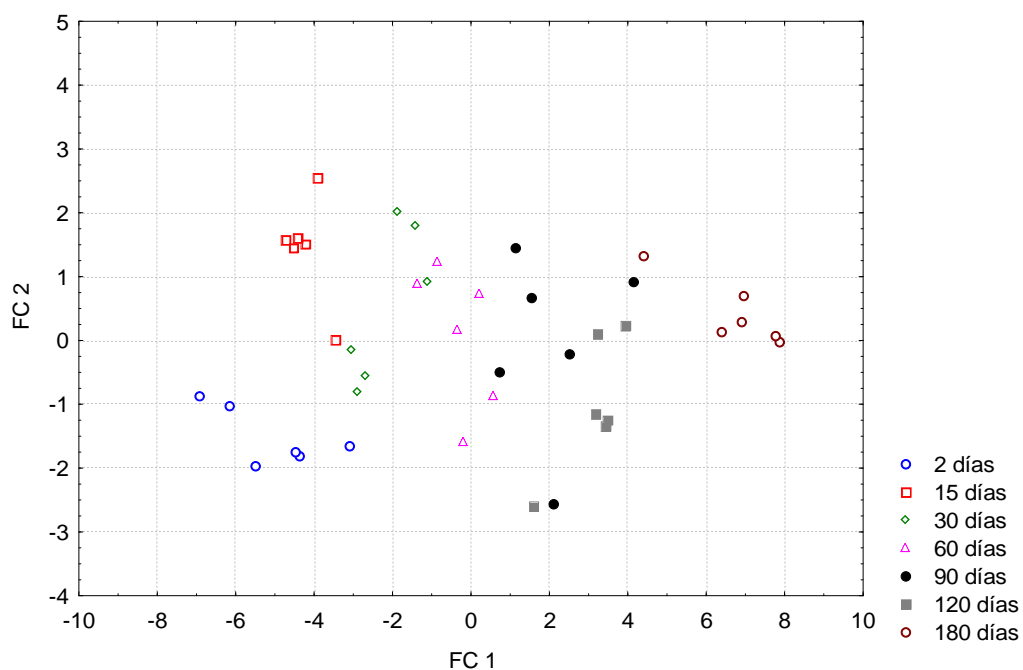
Resultados y Discusión

**Tabla 57.-** Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.

	Correcto (%)	2	15	30	60	90	120	180
2	100	6	0	0	0	0	0	0
15	100	0	6	0	0	0	0	0
30	83	0	0	5	1	0	0	0
60	67	0	0	2	4	0	0	0
90	67	0	0	0	0	4	2	0
120	100	0	0	0	0	0	6	0
180	100	0	0	0	0	0	0	6
Total correcto	88	6	6	7	5	4	8	6

Mediante las dos primeras funciones discriminantes se representan en el diagrama de dispersión (Figura 47) los quesos con 2, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días de maduración.

**Figura 47.-** Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.



#### **IV.A.4.3.2.- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante.**

Ninguno de los elementos minerales estudiados se vió influido significativamente ( $p>0,05$ ) por el tipo de coagulante ensayado. Por tanto los elementos minerales determinados presentaron una escasa capacidad discriminante entre los dos tipos de coagulantes ensayados (Tabla 58).

**Tabla 58.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
Lambda de Wilks	1,00	1,00	0,97	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Valor F	0,10	0,08	0,86	0,37	0,14	0,13	0,02	0,05	0,01

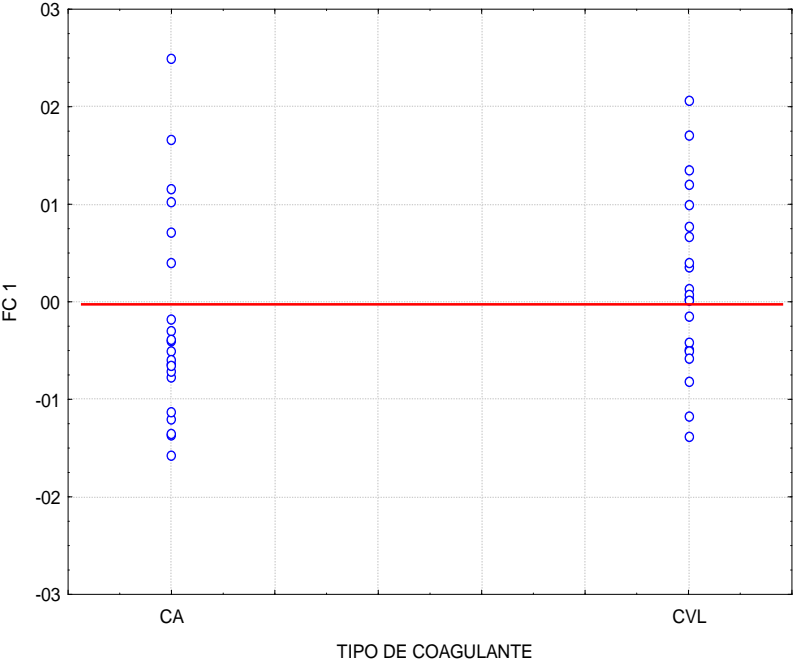
En la Tabla 59 vemos la matriz de clasificación donde sólo aparecen correctamente clasificados el 67 % de los quesos del presente trabajo; 6 quesos elaborados con cuajo animal y 8 obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado fueron clasificados incorrectamente.

**Tabla 59.-** Número de muestras correctamente clasificadas mediante la función de clasificación.

	Correcto (%)	CA	CVL
CA	71	15	6
CVL	62	8	13
Total correcto	67	23	19

Mediante la función discriminante obtenida en el modelo estadístico se representan en el diagrama de dispersión (Figura 48) los quesos elaborados con ambos tipos de coagulantes ensayados, donde en la parte inferior izquierda se observan los quesos coagulados con cuajo animal y en la parte superior derecha los quesos obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado clasificados correctamente.

**Figura 48.-** Representación de los quesos en función del tipo de coagulante utilizado mediante la función canónica FC 1.



## **IV.A.5.- ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.**

### **IV.A.5.1.- EVOLUCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS DURANTE LA MADURACIÓN.**

Los porcentajes relativos de ácidos grasos esterificados (AGE) detectados mediante la técnica analítica de cromatografía gaseosa en los tres lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y los tres lotes obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo de los seis meses de maduración estudiados se presentan en las Tabla 60, 61, 62, 63, 64 y 65.

Se han detectado 13 ácidos grasos esterificados con unos porcentajes superiores al 1 %, que se pueden considerar como principales (Renner, 1983). Fernández-Salguero *et al.* (1986b,c) detectaron alrededor de 14 AGE en concentraciones superiores al 1 % en diferentes variedades de quesos madurados.

En las Tablas 66 y 67 se presentan los valores medios y desviaciones estándar de los porcentajes de los 13 ácidos grasos esterificados principales de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo del tiempo de maduración considerado. Además se muestran los valores correspondientes a los tres grupos de ácidos grasos de cadena corta, media y larga:

- Cadena corta:  $C_{4:0} + C_{6:} + C_{8:0}$
- Cadena media:  $C_{10:0} + C_{12:0} + C_{14:0}$
- Cadena larga:  $C_{15:0} + C_{16:0} + C_{16:1} + C_{18:0} + C_{18:1} + C_{18:2} + C_{18:3}$

Al igual que Sanjuán *et al.* (1995) en queso de Los Pedroches no se han detectado diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes relativos de ácidos grasos esterificados en los lotes de quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos con coagulante vegetal. Como se verá más adelante los porcentajes de AGE de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado son muy similares a los de los obtenidos mediante cipsosina recombinante. Tejada (2001) tampoco observó diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) respecto de la mayoría de los ácidos grasos esterificados considerados entre los lotes de quesos fabricados con coagulante vegetal fresco y los elaborados con coagulante vegetal liofilizado. Como se verá más adelante, los quesos coagulados con coagulante vegetal liofilizado

### Resultados y Discusión

presentaron una composición en AGE similar a los obtenidos mediante cipsosina recombinante.

Coincidiendo con Sanjuán (1992) en queso Los Pedroches, Guindeo *et al.* (1990) en queso Urbasa y Poveda (2001) en queso Manchego, el tiempo de maduración no afectó significativamente ( $p>0,05$ ) a los contenidos de los ácidos grasos esterificados. En líneas generales, los ácidos grasos esterificados del queso no sufren importantes modificaciones durante la maduración.

**Tabla 60.-** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con cuajo animal (CA1) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0	2,39	2,61	2,22	2,21	3,14	2,66	2,17
C6:0	1,74	1,19	1,11	1,32	1,65	1,32	2,02
C8:0	1,16	1,54	1,44	1,64	1,39	2,04	1,93
C10:1	0,33	0,20	0,37	0,32	0,31	0,36	0,22
C10:0	5,34	5,64	5,50	5,84	5,24	6,18	6,07
C12:0	3,24	3,88	3,33	3,93	3,71	3,67	3,98
C13:0	0,12	0,11	0,14	0,12	0,18	0,15	0,10
C14:0i	0,17	0,12	0,15	0,17	0,18	0,22	0,12
C14:1	0,24	0,30	0,32	0,27	0,26	0,29	0,22
C14:0	11,29	10,60	11,64	11,84	11,62	10,82	10,65
C15:0i	0,32	0,33	0,32	0,34	0,45	0,42	0,30
C15:1	0,52	0,52	0,55	0,55	0,61	0,53	0,52
C15:0	1,02	1,02	1,03	1,07	0,97	1,05	1,01
C16:0i	0,31	0,30	0,28	0,31	0,25	0,27	0,29
C16:1	1,17	1,35	1,22	1,19	1,13	1,16	1,29
C16:0	30,42	30,38	30,35	30,03	30,07	31,33	29,82
C17:0i	0,36	0,40	0,41	0,36	0,38	0,36	0,39
C17:1	0,47	0,52	0,53	0,48	0,45	0,45	0,50
C17:0	0,53	0,59	0,55	0,54	0,59	0,58	0,58
C18:2	2,72	2,65	2,88	2,55	2,40	2,35	2,65
C18:1	21,09	20,67	20,50	19,94	20,05	19,58	19,95
C18:3	3,60	3,55	3,56	3,60	3,34	3,25	3,81
C18:0	10,54	10,51	10,67	10,52	10,82	10,07	10,46
C19:0	0,61	0,69	0,64	0,61	0,52	0,65	0,66
C20:1	0,08	0,12	0,12	0,09	0,15	0,10	0,12
C20:0	0,07	0,10	0,11	0,07	0,15	0,09	0,09
C21:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C21:0	0,16	0,11	0,09	0,10	0,00	0,05	0,08



Resultados y Discusión

**Tabla 61..-** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con cuajo animal (CA2) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0	4,01	4,16	3,42	4,04	4,15	3,61	3,20
C6:0	3,32	3,44	2,75	3,31	3,06	2,98	3,12
C8:0	3,09	3,13	2,63	3,04	3,71	2,74	2,96
C10:1	0,28	0,30	0,29	0,29	0,38	0,27	0,30
C10:0	8,49	8,64	8,50	8,22	9,89	7,73	8,34
C12:0	4,71	4,72	4,45	4,59	5,31	4,42	4,88
C13:0	0,13	0,15	0,16	0,11	0,21	0,19	0,14
C14:0i	0,15	0,17	0,23	0,14	0,24	0,22	0,19
C14:1	0,24	0,22	0,24	0,23	0,28	0,23	0,23
C14:0	10,27	10,50	10,01	10,63	11,20	10,01	11,15
C15:0i	0,28	0,28	0,28	0,29	0,28	0,26	0,26
C15:1	0,51	0,49	0,45	0,42	0,48	0,54	0,49
C15:0	0,95	0,89	0,91	0,90	0,90	0,95	0,95
C16:0i	0,38	0,29	0,30	0,25	0,24	0,42	0,77
C16:1	1,01	1,11	1,12	1,09	0,97	1,17	0,95
C16:0	25,85	26,53	26,19	27,37	25,38	25,52	26,25
C17:0i	0,56	0,37	0,36	0,40	0,26	0,61	0,32
C17:1	0,65	0,42	0,46	0,47	0,38	0,45	0,40
C17:0	0,66	0,53	0,61	0,50	0,41	0,95	0,49
C18:2	2,53	2,08	2,47	2,15	2,08	2,98	2,35
C18:1	17,25	16,65	17,84	17,13	16,56	17,68	17,48
C18:3	3,69	3,71	3,76	3,34	2,97	3,51	3,37
C18:0	10,26	10,00	10,74	10,21	9,61	10,54	10,03
C19:0	0,55	0,53	0,75	0,57	0,52	0,50	0,66
C20:1	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,19	0,12
C20:0	0,00	0,27	0,19	0,06	0,00	0,34	0,12
C21:1	0,16	0,40	0,67	0,22	0,22	0,71	0,21
C21:0	0,00	0,00	0,04	0,03	0,29	0,27	0,26

Resultados y Discusión

**Tabla 62.-** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con cuajo animal (CA3) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0	3,96	4,04	3,48	4,25	3,88	3,64	3,79
C6:0	3,23	3,23	3,64	3,74	3,10	3,42	3,16
C8:0	3,07	2,92	3,32	3,52	2,93	4,26	3,15
C10:1	0,25	0,21	0,24	0,25	0,21	0,32	0,22
C10:0	8,58	7,91	9,00	9,60	8,34	8,99	8,76
C12:0	4,54	4,28	4,58	4,94	4,54	4,39	4,67
C13:0	0,09	0,08	0,14	0,11	0,10	0,13	0,10
C14:0i	0,24	0,24	0,28	0,15	0,14	0,21	0,11
C14:1	0,14	0,13	0,11	0,15	0,14	0,20	0,13
C14:0	10,04	9,60	10,09	10,41	10,46	10,84	10,46
C15:0i	0,22	0,20	0,21	0,21	0,21	0,30	0,21
C15:1	0,42	0,41	0,44	0,42	0,44	0,42	0,48
C15:0	0,87	0,81	0,83	0,82	0,88	0,95	0,88
C16:0i	0,29	0,30	0,31	0,23	0,25	0,37	0,21
C16:1	0,54	0,62	0,61	0,59	0,63	0,91	0,63
C16:0	24,18	24,49	23,78	22,64	25,26	24,75	24,85
C17:0i	0,33	0,27	0,27	0,38	0,27	0,39	0,29
C17:1	0,39	0,42	0,40	0,25	0,41	0,47	0,44
C17:0	0,53	0,55	0,54	0,68	0,53	0,56	0,53
C18:2	3,63	3,71	3,53	3,85	3,09	3,36	3,12
C18:1	16,84	17,77	16,70	17,85	16,86	15,99	16,85
C18:3	4,27	3,65	4,17	3,62	4,04	3,77	4,18
C18:0	11,81	12,57	11,79	10,46	11,86	10,25	11,84
C19:0	0,78	0,74	0,69	0,56	0,66	0,65	0,70
C20:1	0,10	0,08	0,07	0,04	0,07	0,10	0,00
C20:0	0,06	0,06	0,06	0,04	0,06	0,09	0,00
C21:1	0,25	0,24	0,23	0,16	0,20	0,28	0,22
C21:0	0,34	0,45	0,48	0,11	0,41	0,00	0,00

*Resultados y Discusión*

**Tabla 63.** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado (CVL1) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0	2,48	2,97	2,19	3,04	2,38	2,63	2,85
C6:0	2,16	1,92	1,80	2,20	1,91	1,84	2,18
C8:0	2,15	2,82	3,18	2,99	2,84	2,47	2,91
C10:1	0,25	0,23	0,27	0,22	0,22	0,28	0,31
C10:0	6,56	5,98	6,74	6,01	5,96	6,23	5,89
C12:0	4,12	3,92	4,84	3,87	4,02	4,24	3,46
C13:0	0,10	0,11	0,11	0,10	0,11	0,10	0,14
C14:0i	0,13	0,13	0,17	0,12	0,13	0,14	0,16
C14:1	0,26	0,24	0,26	0,22	0,24	0,24	0,23
C14:0	10,75	10,37	11,17	10,36	10,80	11,68	10,72
C15:0i	0,31	0,30	0,36	0,30	0,33	0,39	0,31
C15:1	0,51	0,50	0,58	0,49	0,52	0,52	0,57
C15:0	1,00	0,99	1,04	0,99	1,02	1,01	1,03
C16:0i	0,27	0,26	0,33	0,28	0,29	0,31	0,27
C16:1	1,28	1,28	1,12	1,24	1,33	1,36	1,19
C16:0	29,51	29,09	29,32	28,78	29,68	29,41	29,65
C17:0i	0,37	0,38	0,32	0,36	0,39	0,35	0,39
C17:1	0,49	0,51	0,59	0,49	0,49	0,42	0,53
C17:0	0,56	0,57	0,53	0,57	0,57	0,46	0,59
C18:2	2,59	2,63	2,36	2,51	2,51	2,09	2,52
C18:1	19,49	19,62	18,73	19,28	19,16	19,36	18,77
C18:3	3,29	3,42	3,10	3,43	3,26	2,99	3,57
C18:0	10,61	10,82	9,66	10,94	10,68	10,63	10,73
C19:0	0,63	0,64	0,68	0,65	0,65	0,69	0,68
C20:1	0,00	0,11	0,00	0,11	0,11	0,00	0,11
C20:0	0,00	0,00	0,20	0,11	0,09	0,00	0,12
C21:1	0,13	0,19	0,19	0,17	0,19	0,15	0,11
C21:0	0,00	0,00	0,16	0,15	0,09	0,00	0,00

Resultados y Discusión

**Tabla 64.-** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado (CVL2) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0	3,60	3,26	3,42	4,01	3,99	4,16	3,69
C6:0	4,01	3,25	3,22	3,58	3,58	3,77	3,81
C8:0	3,61	3,54	3,11	3,19	3,40	3,04	3,83
C10:1	0,38	0,30	0,30	0,33	0,36	0,30	0,39
C10:0	9,72	8,01	8,08	8,60	9,22	8,43	8,69
C12:0	5,24	4,43	4,82	4,77	5,02	4,37	4,81
C13:0	0,11	0,16	0,20	0,12	0,15	0,09	0,10
C14:0i	0,16	0,16	0,25	0,15	0,12	0,16	0,22
C14:1	0,24	0,21	0,24	0,28	0,30	0,34	0,34
C14:0	11,13	10,26	10,82	10,59	10,99	10,16	9,68
C15:0i	0,22	0,27	0,26	0,26	0,27	0,28	0,31
C15:1	0,56	0,58	0,39	0,44	0,56	0,53	0,50
C15:0	1,03	0,95	0,86	0,92	0,89	1,02	1,00
C16:0i	0,28	0,37	0,43	0,37	0,31	0,29	0,38
C16:1	1,04	1,21	0,88	0,89	0,96	1,03	1,02
C16:0	25,54	26,94	26,94	26,46	25,22	27,53	26,06
C17:0i	0,30	0,31	0,38	0,35	0,28	0,55	0,43
C17:1	0,39	0,43	0,32	0,42	0,44	0,50	0,51
C17:0	0,42	0,61	0,41	0,51	0,49	0,64	0,61
C18:2	2,01	2,39	2,81	2,54	2,02	2,16	2,40
C18:1	16,76	17,60	17,10	17,10	17,23	16,77	17,21
C18:3	3,03	3,30	2,87	3,31	3,03	3,03	3,14
C18:0	9,77	10,27	10,53	10,01	10,00	10,25	10,32
C19:0	0,45	0,58	0,54	0,55	0,60	0,48	0,55
C20:1	0,00	0,14	0,00	0,00	0,14	0,11	0,00
C20:0	0,00	0,00	0,27	0,00	0,28	0,00	0,00
C21:1	0,00	0,14	0,55	0,23	0,13	0,00	0,00
C21:0	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*Resultados y Discusión*

**Tabla 65.-** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado (CVL3) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0	4,28	4,64	4,41	3,97	3,98	3,93	3,50
C6:0	3,62	3,75	3,92	3,53	3,52	3,48	3,60
C8:0	3,46	3,48	3,72	3,08	3,03	3,65	3,39
C10:1	0,34	0,28	0,34	0,26	0,24	0,25	0,26
C10:0	9,49	9,36	9,80	8,46	8,74	9,08	9,26
C12:0	4,85	4,82	5,18	4,58	4,63	4,69	4,84
C13:0	0,12	0,16	0,14	0,12	0,11	0,11	0,11
C14:0i	0,23	0,17	0,23	0,22	0,19	0,24	0,15
C14:1	0,18	0,16	0,14	0,14	0,13	0,16	0,14
C14:0	10,62	10,61	10,85	10,28	10,28	10,26	10,99
C15:0i	0,27	0,23	0,25	0,32	0,29	0,30	0,27
C15:1	0,48	0,48	0,45	0,56	0,45	0,49	0,49
C15:0	0,89	1,10	0,85	0,88	1,04	0,88	0,93
C16:0i	0,27	0,25	0,33	0,28	0,31	0,29	0,27
C16:1	0,65	0,67	0,76	0,65	0,57	0,33	0,68
C16:0	24,55	24,66	23,07	26,75	24,24	24,70	25,54
C17:0i	0,28	0,33	0,32	0,27	0,29	0,23	0,33
C17:1	0,41	0,48	0,35	0,48	0,44	0,46	0,40
C17:0	0,58	0,55	0,54	0,54	0,54	0,52	0,53
C18:2	3,25	2,91	2,86	3,01	3,34	2,87	2,91
C18:1	15,50	15,40	17,46	15,46	16,26	16,48	16,34
C18:3	3,84	3,73	3,46	4,30	4,29	3,78	3,55
C18:0	10,77	10,62	9,78	10,56	11,60	11,51	10,54
C19:0	0,65	0,58	0,59	0,69	0,96	0,89	0,59
C20:1	0,13	0,15	0,00	0,21	0,00	0,08	0,00
C20:0	0,11	0,10	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
C21:1	0,17	0,20	0,19	0,09	0,20	0,35	0,30
C21:0	0,00	0,14	0,00	0,22	0,33	0,00	0,09

**Tabla 66.-** Composición de ácidos grasos esterificados principales (% del total) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración. Valores medios y desviaciones estándar.

	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0	3,43 ± 0,90	3,60 ± 0,86	3,04 ± 0,71	3,50 ± 1,12	3,72 ± 0,52	3,30 ± 0,56	3,05 ± 0,82
C6:0	2,74 ± 0,87	2,62 ± 1,24	2,50 ± 1,28	2,79 ± 1,29	2,60 ± 0,83	2,58 ± 1,11	2,77 ± 0,65
C8:0	2,42 ± 1,09	2,53 ± 0,86	2,46 ± 0,95	2,73 ± 0,98	2,68 ± 1,18	3,01 ± 1,13	2,68 ± 0,66
C10:0	7,41 ± 1,79	7,40 ± 1,56	7,66 ± 1,89	7,88 ± 1,90	7,82 ± 2,37	7,63 ± 1,40	7,72 ± 1,45
C12:0	4,13 ± 0,79	4,29 ± 0,42	4,12 ± 0,69	4,49 ± 0,52	4,52 ± 0,80	4,16 ± 0,42	4,51 ± 0,47
C14:0	10,47 ± 0,75	10,23 ± 0,55	10,58 ± 0,92	10,96 ± 0,77	11,09 ± 0,59	10,56 ± 0,47	10,75 ± 0,36
C15:0	0,94 ± 0,08	0,91 ± 0,10	0,92 ± 0,10	0,93 ± 0,13	0,92 ± 0,04	0,98 ± 0,06	0,95 ± 0,06
C16:1	0,90 ± 0,33	1,02 ± 0,37	0,98 ± 0,33	0,96 ± 0,32	0,91 ± 0,26	1,08 ± 0,15	0,95 ± 0,33
C16:0	26,65 ± 3,43	27,13 ± 2,99	26,78 ± 3,32	26,68 ± 3,74	26,90 ± 2,74	27,20 ± 3,60	26,97 ± 2,56
C18:2	2,94 ± 0,55	2,82 ± 0,83	2,96 ± 0,53	2,85 ± 0,89	2,52 ± 0,51	2,90 ± 0,51	2,71 ± 0,39
C18:1	18,28 ± 2,46	18,36 ± 2,07	18,35 ± 1,95	18,30 ± 1,46	17,83 ± 1,94	17,75 ± 1,80	18,09 ± 1,64
C18:3	3,82 ± 0,31	3,64 ± 0,08	3,83 ± 0,31	3,52 ± 0,15	3,45 ± 0,54	3,51 ± 0,26	3,79 ± 0,40
C18:0	10,79 ± 0,69	11,03 ± 1,36	11,06 ± 0,63	10,39 ± 0,16	10,76 ± 1,13	10,28 ± 0,24	10,78 ± 0,94
Cadena corta	8,59 ± 2,86	8,75 ± 2,96	8,00 ± 2,92	9,03 ± 3,38	9,00 ± 2,50	8,89 ± 2,68	8,50 ± 2,10
Cadena Media	22,01 ± 1,89	21,92 ± 1,88	22,37 ± 1,68	23,33 ± 1,67	23,44 ± 2,92	22,35 ± 1,78	22,98 ± 2,00
Cadena Larga	64,33 ± 5,40	64,91 ± 4,70	64,88 ± 4,68	63,63 ± 4,71	63,30 ± 5,18	63,70 ± 4,56	64,23 ± 4,14

**Tabla 67.-** Composición de ácidos grasos esterificados principales (% del total) de quesos elaborados con leche (CVL) a lo largo de la maduración. Valores medios y desviaciones estándar.

	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0	3,46 ± 0,74	3,62 ± 0,73	3,34 ± 0,91	3,67 ± 0,45	3,45 ± 0,76	3,57 ± 0,74
C6:0	3,26 ± 0,80	2,97 ± 0,77	2,98 ± 0,88	3,11 ± 0,64	3,00 ± 0,77	3,03 ± 0,77
C8:0	3,08 ± 0,66	3,28 ± 0,33	3,34 ± 0,27	3,09 ± 0,08	3,09 ± 0,23	3,05 ± 0,23
C10:0	8,59 ± 1,44	7,78 ± 1,39	8,21 ± 1,25	7,69 ± 1,19	7,98 ± 1,44	7,91 ± 1,44
C12:0	4,74 ± 0,47	4,39 ± 0,37	4,95 ± 0,16	4,40 ± 0,39	4,56 ± 0,41	4,43 ± 0,41
C14:0	10,83 ± 0,22	10,41 ± 0,14	10,95 ± 0,16	10,41 ± 0,13	10,69 ± 0,30	10,70 ± 0,30
C15:0	0,97 ± 0,06	1,01 ± 0,07	0,92 ± 0,09	0,93 ± 0,05	0,98 ± 0,07	0,97 ± 0,07
C16:1	0,99 ± 0,26	1,05 ± 0,27	0,92 ± 0,15	0,93 ± 0,24	0,96 ± 0,31	0,91 ± 0,31
C16:0	26,53 ± 2,14	26,90 ± 1,81	26,44 ± 2,57	27,33 ± 1,03	26,38 ± 2,37	27,21 ± 2,37
C18:2	2,62 ± 0,50	2,64 ± 0,21	2,68 ± 0,23	2,69 ± 0,23	2,62 ± 0,55	2,38 ± 0,55
C18:1	12,08 ± 1,67	12,41 ± 1,72	11,95 ± 0,72	12,12 ± 1,56	12,13 ± 1,21	12,04 ± 1,21
C18:3	3,39 ± 0,34	3,48 ± 0,18	3,14 ± 0,24	3,68 ± 0,44	3,53 ± 0,55	3,26 ± 0,55
C18:0	10,38 ± 0,44	10,57 ± 0,23	9,99 ± 0,39	10,50 ± 0,38	10,76 ± 0,66	10,80 ± 0,66
Cadena corta	9,79 ± 2,13	9,87 ± 1,70	9,66 ± 1,99	9,87 ± 1,16	9,54 ± 1,72	9,66 ± 1,72
Cadena Media	24,16 ± 1,99	22,59 ± 1,84	24,10 ± 1,29	22,50 ± 1,62	23,22 ± 1,84	23,05 ± 1,84
Cadena Larga	62,13 ± 3,99	63,20 ± 3,60	61,85 ± 2,89	63,34 ± 2,71	62,78 ± 3,53	63,06 ± 3,53

## Resultados y Discusión

Sin embargo, diversos autores (Furtado y Chandan, 1985; González de llano *et al.*, 1990; Juárez *et al.*, 1983; Fernández-Salguero *et al.*, 1986b; Alonso *et al.*, 1989) han observado en quesos madurados por mohos, donde se desarrolla una intensa lipólisis, que los fenómenos de reesterificación y degradación oxidativa, que sufren fundamentalmente los ácidos grasos de cadena corta, pueden provocar la variación de los mismos durante la maduración.

El hecho de que los porcentajes de ácidos grasos relativos obtenidos estén dentro de los márgenes considerados como normales para leche de oveja (García-Olmedo y Coll Hellin, 1976; Martínez-Castro *et al.*, 1979) confirma la ausencia de cambios importantes en los ácidos grasos combinados del queso con respecto a la leche de partida. Por otra parte Tejada (2001) en queso de Los Pedroches detectó diferencias en los porcentajes de algunos ácidos grasos esterificados entre los lotes de quesos estudiados debido probablemente a factores como el origen de la leche, período de lactación y la alimentación.

Poveda *et al.* (1999b), Beltrán (1985) y Poveda (2001) en queso Manchego, Gómez *et al.* (1987) en queso Roncal y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches obtuvieron porcentajes de ácidos grasos similares a los de la presente memoria. También en queso de Los Pedroches Sanjuán *et al.* (1995) señalan resultados similares a los obtenidos por nosotros, aunque obtuvieron porcentajes de C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:2</sub> y C<sub>18:3</sub> inferiores y de C<sub>10:0</sub>, C<sub>16:1</sub> y C<sub>18:1</sub> superiores a los del presente trabajo, respectivamente. Fernández-Salguero y Gómez (1997) observaron porcentajes medios de ácidos grasos esterificados en quesos Montes de San Benito, Grazalema y Calahorra similares a los de la presente memoria. Marcos *et al.* (1985) analizaron la composición de ácidos grasos esterificados en determinadas variedades comerciales de quesos de oveja como Manchego, Torta del Casar e Idiazábal obteniendo unos resultados muy similares a los del presente trabajo. También Sanjuán (1992) en queso de Los Pedroches observó valores de AGE similares a los de la presente memoria, Fernández-Salguero *et al.* (1986c) detectaron valores de ácidos grasos de cadena corta más bajos que los nuestros y porcentajes muy similares de ácidos grasos de cadena media y larga en quesos Idiazábal y Roncal.



#### IV.A.5.2.- RELACIONES ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.

Tradicionalmente se han propuesto numerosas relaciones entre ácidos grasos esterificados para la identificación de adulteraciones por mezclas de diferentes leches o posibles adiciones a la grasa de la leche o al queso de otras grasas animales o vegetales (apartado I.3.2.1). En la Tabla 68 y 69 se muestran los valores medios de 24 de estas relaciones para los tres lotes de quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, respectivamente. Ni el tipo de coagulante ensayado ni el tiempo de maduración afectaron significativamente ( $p > 0,05$ ) a las relaciones entre ácidos grasos esterificados consideradas. Las relaciones de AGE de los quesos elaborados con coagulante vegetal son muy similares a las obtenidas en los quesos coagulados con cipsosina recombinante. En queso de Los Pedroches Sanjuán (1992) y Tejada (2001) tampoco detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las relaciones de AGE de los quesos elaborados con cuajo animal y los elaborados con coagulante vegetal. Además este último autor tampoco observó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en las relaciones entre AGE de lotes de quesos elaborados con coagulante vegetal fresco y los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado. En líneas generales las relaciones entre AGE consideradas están dentro de los márgenes típicos detectados en quesos de oveja, con excepción de las relaciones  $C_{10:0}/C_{10:1}$  y  $C_{16:0}/C_{8:0}$ , que fueron algo superiores.

Diversos autores afirman que cuando la relación  $C_{4:0}/C_{6:0} + C_{8:0}$  es inferior a 0,60 en quesos elaborados con leche de oveja hay que sospechar de la posible mezcla con leche de cabra. Coincidiendo con Sanjuán *et al.* (1995) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches, Fernández-Salguero y Gómez (1997) en quesos Montes de San Benito y Grazalema y Fernández-Salguero *et al.* (1986c) en queso Torta del Casar esta relación siempre fue superior a 0,60 en los quesos del presente estudio. No obstante, en quesos Calahorra (Fernández-Salguero y Gómez, 1997) y Roncal (Gómez *et al.*, 1987) esta relación fue inferior a 0,60.

Resultados y Discusión

**Tabla 68.**- Valor medio de la relación entre ácidos grasos esterificados de los lotes de queso elaborados con cuajo animal (CA) durante la maduración.

Relaciones ácidos grasos	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0 + C6:0 + C8:0 + C10:0 + C12:0 + (C14:0/C16:0)	20,53	20,82	20,18	21,81	21,76	21,08	21,13
C4:0/C6:0	1,25	1,37	1,22	1,25	1,43	1,28	1,10
C4:0/C6:0 + C8:0	3,67	3,90	3,68	3,99	4,11	4,30	3,78
C4:0 + C10:0/C6:0 + C8:0	8,55	8,95	8,57	9,06	9,41	9,28	8,52
C6:0/C8:0	1,13	1,04	1,02	1,02	0,97	0,85	1,03
C10:0/C6:0	2,70	2,82	3,06	2,82	3,01	2,96	2,79
C10:0/C8:0	3,06	2,92	3,11	2,88	2,92	2,53	2,88
C10:0/C10:1	25,98	31,21	25,62	27,44	25,93	24,24	31,04
C10:0 + C14:0/C6:0+ C8:0	13,65	13,83	14,36	14,55	14,76	14,75	14,28
C12:0/C8:0	1,71	1,70	1,67	1,64	1,69	1,38	1,68
C12:0/C10:0	0,56	0,58	0,54	0,57	0,58	0,55	0,58
C14:0/C8:0	4,33	4,05	4,30	4,01	4,15	3,50	4,01
C14:0/C10:0	1,41	1,38	1,38	1,39	1,42	1,38	1,39
C14:0/C12:0	2,53	2,38	2,57	2,44	2,45	2,54	2,38
C15:0/C14:1	4,58	4,28	4,16	4,34	3,98	4,04	4,86
C16:0/C8:0	11,02	10,73	10,88	9,75	10,06	9,02	10,07
C16:0/C10:0	3,60	3,67	3,49	3,38	3,44	3,56	3,49
C16:0/C14:0	2,55	2,65	2,53	2,43	2,43	2,58	2,51
C18:0/C8:0	4,46	4,36	4,49	3,80	4,02	3,41	4,02
C18:0/C16:0	0,40	0,41	0,41	0,39	0,40	0,38	0,40
C18:1/C16:0	0,69	0,68	0,69	0,69	0,66	0,65	0,67
C18:1/C18:0	1,69	1,67	1,66	1,76	1,66	1,73	1,68
C18:3/C18:2	1,30	1,29	1,29	1,23	1,37	1,21	1,40
INSATURADOS	27,61	27,50	28,01	27,16	26,38	27,21	27,15
SATURADOS	71,07	71,84	71,30	72,26	73,05	72,19	72,18
INSAT/SATUR.	0,39	0,38	0,39	0,38	0,36	0,38	0,38

Resultados y Discusión

**Tabla 69.**- Valores medios de la relación entre ácidos grasos esterificados de los lotes de queso elaborados con coagulante vegetal liofilizado (CVL) durante la maduración.

Relaciones ácidos grasos	Días de Maduración						
	2	15	30	60	90	120	180
C4:0 + C6:0 + C8:0 + C10:0 + C12:0 + (C14:0/C16:0)	23,53	22,44	23,22	22,34	22,48	22,40	22,63
C4:0/C6:0	1,06	1,22	1,12	1,18	1,15	1,18	1,05
C4:0/C6:0 + C8:0	4,13	4,50	4,46	4,27	4,24	4,23	4,42
C4:0 + C10:0/C6:0 + C8:0	9,16	9,52	9,44	9,24	9,19	9,24	9,21
C6:0/C8:0	1,06	0,90	0,89	1,01	0,97	0,99	0,95
C10:0/C6:0	2,63	2,62	2,76	2,48	2,65	2,61	2,48
C10:0/C8:0	2,79	2,37	2,46	2,49	2,58	2,59	2,35
C10:0/C10:1	26,85	28,81	26,85	28,51	29,25	28,22	25,02
C10:0 + C14:0/C6:0+ C8:0	14,99	14,57	15,22	14,13	14,62	14,50	14,59
C12:0/C8:0	1,54	1,34	1,48	1,43	1,47	1,45	1,29
C12:0/C10:0	0,55	0,56	0,60	0,57	0,57	0,56	0,55
C14:0/C8:0	3,52	3,17	3,28	3,37	3,46	3,50	3,10
C14:0/C10:0	1,26	1,34	1,33	1,35	1,34	1,35	1,32
C14:0/C12:0	2,29	2,37	2,21	2,36	2,35	2,41	2,39
C15:0/C14:1	4,31	5,05	4,33	4,35	4,37	3,91	4,17
C16:0/C8:0	8,63	8,19	7,92	8,85	8,54	8,91	8,02
C16:0/C10:0	3,09	3,46	3,22	3,55	3,31	3,44	3,41
C16:0/C14:0	2,45	2,58	2,42	2,63	2,47	2,54	2,59
C18:0/C8:0	3,38	3,22	2,99	3,40	3,48	3,54	3,12
C18:0/C16:0	0,39	0,39	0,38	0,38	0,41	0,40	0,39
C18:1/C16:0	0,46	0,46	0,45	0,44	0,46	0,44	0,44
C18:1/C18:0	1,16	1,17	1,20	1,15	1,13	1,12	1,14
C18:3/C18:2	1,29	1,32	1,17	1,37	1,35	1,37	1,31
INSATURADOS	20,72	21,36	20,41	21,14	20,96	20,32	20,72
SATURADOS	73,54	72,91	73,17	73,08	72,88	73,50	73,23
INSAT/SATUR.	0,28	0,29	0,28	0,29	0,29	0,28	0,28

## Resultados y Discusión

Respecto de la relación  $C_{12:0}/C_{10:0}$ , esta osciló entre 0,54 y 0,60, siendo muy similar a la obtenida por Fernández-Salguero y Gómez (1997) y Tejada (2001) y superior a los valores señalados por Sanjuán (1992) en queso de Los Pedroches. Iverson y Sheppard (1989) detectaron valores de esta relación de 0,615 para leche de oveja y de 0,48 para leche de cabra. Fernández-Salguero y Gómez. (1997) en queso Montes de San Benito y Grazalema, Fernández-Salguero *et al.* (1986c) en queso Torta del Casar e Idiazábal, Gómez *et al.* (1987) en queso Roncal y Beltrán (1985) en queso Manchego señalan unos valores medios de la relación  $C_{12:0}/C_{10:0}$  de 0,55, 0,53, 0,57, 0,60, 0,50 y 0,57 respectivamente. En queso Calahorra se obtuvo un valor de la relación  $C_{12:0}/C_{10:0}$  de 0,48 lo que hace sospechar del empleo de leche de cabra mezclada con leche de oveja en las muestras analizadas de este tipo de queso (Fernández-Salguero y Gómez, 1997).

La relación  $C_{10:0}/C_{6:0}$  se emplea, entre otras, para diferenciar quesos de vaca, oveja y cabra (Fernández-Salguero, 1986c). García-Olmedo *et al.* (1979) consideran a esta la relación con mayor interés para la detección de leche de cabra en queso de oveja. En el presente trabajo esta relación presentó unos valores medios a lo largo del período de maduración considerado de 2,88 y 2,60 para los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, respectivamente. En queso de los Pedroches Sanjuán *et al.* (1995), Fernández-Salguero y Gómez (1997) y Tejada (2001) obtuvieron valores de la relación  $C_{10:0}/C_{6:0}$  de 2,39, 2,78 y 2,80, respectivamente. Fernández-Salguero y Gómez (1997) en quesos Calahorra, Grazalema y Montes de San Benito, y Gómez *et al.* (1987) en queso Roncal obtuvieron cocientes de 3,15, 2,68, 2,76 y 2,61, respectivamente.

Las relaciones  $C_{10:0}/C_{10:1}$  (Ramos *et al.*, 1977) y  $C_{14:0}/C_{8:0}$  (García-Olmedo *et al.*, 1979) se ha utilizado para detectar fraudes por adición de leche de vaca en la fabricación de quesos Manchego, cuya denominación de origen solo permite el empleo de leche procedente de ovejas de la raza Manchega.

La relación de ácidos grasos combinados insaturados/saturados osciló entre 0,28 y 0,39, valores similares a los detectados por Gómez *et al.* (1987) en queso Roncal y inferiores a los detectados por Sanjuán *et al.* (1995) y Tejada (2001) en queso de Los Pedroches.

## **IV.A.6.- ANÁLISIS SENSORIAL.**

### **IV.A.6.1.- EVOLUCIÓN DE LOS ATRIBUTOS SENSORIALES EN LOS QUESOS CON 60, 90, 120 Y 180 DÍAS DE MADURACIÓN.**

Se han empleado una serie de descriptores, agrupados según el tipo de percepción sensorial, que se recogen en la Tabla 68. En líneas generales todos los atributos sensoriales analizados en el presente trabajo aumentaron en intensidad desde los 2 hasta los 6 meses de maduración. Al final de este apartado, en la Tabla 73 se presentan los valores medios y las desviaciones estándar de los atributos sensoriales estudiados, en las Figuras 49 y 50 se recogen los perfiles sensoriales de los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal y en las Figuras 51, 52, 53 y 54 se muestran los perfiles sensoriales de los quesos con 60, 90, 120 y 180 días de maduración, respectivamente. En estos diagramas denominados “telaraña”, el centro de la figura representa la intensidad cero de todos los atributos representados por radios, incrementándose la intensidad de cada atributo hacia el extremo opuesto.

**Tabla 70.-** Descriptores utilizados en el presente trabajo.

Percepciones Olfativas: intensidad olor, olor ácido, olor picante.	Percepciones visuales (apariencia de la pasta): intensidad de color, número de ojos, tamaño de ojos, distribución de ojos.
Percepciones hápticas: dureza, firmeza, cremosidad.	Percepciones gustativas: intensidad sabor, sabor picante, sabor ácido, sabor salado, sabor amargo.

#### **IV.A.6.1.1.- Percepciones olfativas.**

En la Tabla 71 se recogen las puntuaciones otorgadas por los catadores para los atributos de percepción olfativa en los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a los 60, 90, 120 y 180 días de maduración.

Ballesteros (2002) también señalan una intensificación de la percepción olfativa desde los 2 hasta los 12 meses de maduración en queso Manchego, obteniendo mayores puntuaciones para los lotes de quesos elaborado de manera artesanal con respecto a los lotes fabricados industrialmente.

Resultados y Discusión

**Tabla 71.-** Evolución de los atributos sensoriales relacionados con la percepción olfativa de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) en los 4 últimos meses de maduración estudiados.

		Días de Maduración				
Coagulante		60	90	120	180	
Intensidad Olor	CA1	5,61	5,12	6,17	6,78	
	CA2	4,73	5,98	5,19	6,16	
	CA3	4,39	4,57	4,57	5,63	
	CVL1	5,36	5,43	5,86	5,38	
	CVL2	5,49	5,66	5,62	7,92	
	CVL3	5,37	5,42	5,42	6,55	
	Olor ácido	CA1	4,13	5,77	5,52	5,26
		CA2	3,80	4,63	4,71	5,76
		CA3	4,23	4,33	5,12	5,38
CVL1		4,74	5,79	5,08	4,94	
CVL2		4,55	5,24	5,18	6,79	
CVL3		4,56	4,61	5,47	6,63	
Olor picante		CA1	4,00	3,07	4,75	4,62
		CA2	2,31	3,06	3,63	4,44
		CA3	2,14	3,04	3,71	4,64
	CVL1	3,76	3,28	3,91	4,12	
	CVL2	2,77	3,06	4,43	5,67	
	CVL3	2,75	3,26	4,52	5,26	

En queso Zamorano, Fernández-García *et al.* (2004) detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las puntuaciones de olor según la estación del año de elaboración, obteniendo las mayores puntuaciones de olor para los quesos fabricados en primavera e invierno respecto de los producidos en otoño y verano.

Los lotes de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado presentaron mayores puntuaciones para los atributos de intensidad olor, olor ácido y olor picante que los lotes de queso coagulados con cuajo animal (Tabla 75), aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Este fenómeno se atribuye a la mayor actividad proteolítica de las cipsosinas del cardo. Así, Sanjuán (1992), Tejada (2001), Carmona *et al.* (1999) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches y Chen *et al.* (2003) en queso Pecorino observaron una mayor intensidad del olor de los quesos elaborados con coagulante vegetal con respecto a los fabricados con cuajo animal. Tejada (2001) no detectó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los atributos olfativos de los quesos elaborados con coagulante vegetal fresco con respecto de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado. Se ha establecido una relación directa entre la intensidad de olor y algunas fracciones nitrogenadas (Figuras 57, 58, 60 y 61) debido a que a medida que avanza el proceso madurativo se producen un aumento de los productos de degradación proteolítica, fundamentalmente compuestos volátiles originados a partir de aminoácidos que actúan como precursores del aroma de los quesos (Fox, 1989b; Garde *et al.*, 1997; Oumer *et al.*, 1999).

#### **IV.A.6.1.2.- Percepciones visuales: Apariencia de la pasta.**

Las puntuaciones medias otorgadas por los catadores para los atributos de percepción visual en los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) durante los últimos 4 meses del período de maduración estudiado se muestran en la Tabla 72.

Carmona (1994), Tejada (2001) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches, desde los dos hasta los tres meses de maduración, Pompei *et al.* (1991) en queso Provolone, Mukherjee y Hutkins (1994) en queso Mozzarella, Rohm y Jaros (1997a,b) en queso Emmental, Frau (1998, 1999) en queso Mahón, Kilic *et al.* (1997) en queso Cheddar y Pinho *et al.* (2004) en queso Terrincho también observaron un aumento de la intensidad del color.

Resultados y Discusión

**Tabla 72.-** Evolución de los atributos sensoriales relacionados con la percepción visual de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) en los 4 últimos meses de maduración.

		Días de Maduración				
Coagulante		60	90	120	180	
Color	CA1	5,49	4,80	5,81	5,97	
	CA2	4,82	5,52	6,12	6,00	
	CA3	4,39	5,06	5,39	6,44	
	CVL1	5,69	5,87	6,42	5,84	
	CVL2	4,88	5,91	6,03	7,35	
	CVL3	5,15	5,70	6,13	7,11	
	Número ojos	CA1	6,16	5,14	4,86	4,82
		CA2	5,27	5,40	5,25	4,44
		CA3	5,42	4,99	4,39	4,24
CVL1		5,38	4,84	3,07	5,02	
CVL2		5,47	5,60	6,05	3,59	
CVL3		6,65	6,12	5,12	4,24	
Tamaño ojos		CA1	3,75	3,97	3,17	3,63
		CA2	3,81	3,25	4,14	3,50
		CA3	3,94	4,45	3,81	3,54
	CVL1	3,59	3,17	3,92	3,62	
	CVL2	4,02	3,70	3,45	3,79	
	CVL3	4,15	3,95	3,51	3,02	
	Distribución ojos	CA1	5,62	4,31	5,73	3,88
		CA2	4,71	5,65	3,66	4,89
		CA3	5,07	5,10	5,30	5,94
CVL1		4,89	3,65	5,20	4,66	
CVL2		5,59	5,73	4,32	5,39	
CVL3		4,41	4,27	3,82	4,78	



## Resultados y Discusión

Los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado obtuvieron puntuaciones superiores para el atributo de intensidad de color con respecto a los obtenidos con cuajo animal. En este sentido Rohm y Jaros (1997b) y Tejada (2001) encontraron una relación directa entre el color y la proteólisis, lo cual podría explicar la coloración más intensa detectada en los lotes de queso elaborados con coagulante vegetal, dada la mayor actividad proteolítica de la cipsosina del cardo frente a la quimosina animal.

En la presente memoria se observa cómo la intensidad de color se correlaciona negativamente con la  $a_w$  y de manera positiva con las fracciones nitrogenadas y pH (Figuras 57 y 60) coincidiendo con Carmona (1994), Tejada (2001) y Vioque (2002).

Durante el avance de la maduración se observa una disminución en el número y tamaño de los ojos, coincidiendo con Tejada (2001) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches. La formación de los ojos sucede durante los primeros estadios de la maduración por la liberación de gases como consecuencia de la acción fermentativa bacteriana. Con el desarrollo de la maduración se modifica la textura del queso, de forma que la estructura o paredes que conforman los ojos se destruye al tiempo que disminuye el tamaño de los ojos o incluso desaparecen.

No se han detectado diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) en los atributos de número, tamaño y distribución de ojos entre los lotes de quesos coagulados con cuajo animal y los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado. Tejada (2001) no detectó diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en estos atributos entre lotes de queso de Los Pedroches elaborados con cuajo animal, coagulante vegetal fresco y coagulante vegetal liofilizado. Para esta misma variedad de queso Vioque (2002) observó unas puntuaciones para los atributos de apariencia de la pasta del queso similar para los lotes de quesos elaborados con cuajo animal, *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*, sin llegar a establecer diferencias significativas entre ellos.

### **IV.A.6.1.3.-Percepciones hápticas.**

En la Tabla 73 se presentan las puntuaciones medias otorgadas por los jueces para los atributos de dureza, firmeza y cremosidad en los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL).

Resultados y Discusión

**Tabla 73.-** Puntuaciones de los atributos sensoriales relacionados con la percepción háptica de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) en los 4 últimos meses del período de maduración estudiado.

		Días de Maduración				
Coagulante		60	90	120	180	
Dureza	CA1	4,69	5,51	5,55	7,62	
	CA2	5,64	6,45	6,03	6,32	
	CA3	5,59	6,05	7,36	8,08	
	CVL1	3,47	3,59	5,02	4,71	
	CVL2	3,78	6,14	5,11	4,55	
	CVL3	3,27	3,58	3,73	4,02	
	Firmeza	CA1	5,67	5,62	6,28	6,83
		CA2	4,51	5,53	6,26	6,17
		CA3	5,18	5,84	6,36	7,33
CVL1		3,61	3,85	4,50	4,36	
CVL2		4,33	4,18	4,38	4,88	
CVL3		3,45	3,47	3,32	3,97	
Cremosidad		CA1	3,45	3,03	4,12	4,86
		CA2	3,71	3,66	5,06	4,91
		CA3	3,15	3,83	4,36	4,51
	CVL1	6,90	6,70	6,49	7,12	
	CVL2	5,99	6,44	6,77	7,82	
	CVL3	6,06	6,43	7,10	7,76	

## Resultados y Discusión

Coincidiendo con Amantea *et al.* (1986) en queso Cheddar, Luyten *et al.* (1987) en queso Gouda, Pompei *et al.* (1991) en queso Provolone, Ortigosa *et al.* (1999) y Bárcenas *et al.* (2003) en queso Idiazábal y Carmona, (1994), Tejada (2001) y Vioque (2002), en queso de Los Pedroches y Ballesteros (2002) en queso Manchego, se observa en el presente trabajo un incremento de la dureza durante el período madurativo considerado, detectándose una relación indirecta con respecto a la humedad. El descenso del contenido de agua determina una concentración de caseínas y un aumento del número de enlaces entre ellas, aumentando la dureza del queso. Además, un alto porcentaje de humedad diluye las caseínas y reduce los enlaces, determinando una mayor libertad de las caseínas y una menor dureza (Luyten *et al.*, 1987).

Las puntuaciones de dureza de los quesos elaborados con cuajo animal fueron superiores a las de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado. Freitas y Malcata (1996) en queso Picante, Chen *et al.* (2003) en queso Pecorino y Tejada (2001) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches también observaron que los quesos elaborados con coagulante vegetal fueron más blandos que los coagulados con cuajo animal. Se ha establecido una relación indirecta entre el atributo de dureza y el grado de proteólisis (Figuras 57 y 60), coincidiendo con Fernández del Pozo *et al.* (1988a), Rohm *et al.* (1992), Yun *et al.* (1993), Uceda *et al.* (1994a,b), Ustunol *et al.* (1995) y Chen *et al.* (2003), de ahí que el menor grado de dureza detectado en los quesos elaborados con coagulante vegetal pueda ser atribuido a la mayor actividad proteolítica de la cipsosina del cardo.

En el presente trabajo la dureza se correlaciona negativamente con atributos como pH,  $a_w$ , humedad y cremosidad, y positivamente con la intensidad de sabor. Visser (1991), Rohm *et al.* (1992) y Carmona (1994) describen una relación directa entre el contenido de cloruro sódico y la dureza en quesos Gouda, Emmental y de Los Pedroches, respectivamente.

El atributo de firmeza es identificado como una importante característica de los alimentos por los consumidores. Creamer y Olson (1982) y Jack *et al.* (1993) lo reconocen como uno de los principales atributos en la identificación del tipo de queso y de su calidad. Coincidiendo con Hort *et al.* (1997a,b) en queso Cheddar y Tejada (2001) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches observaron un aumento de la firmeza a lo largo de la maduración, detectándose en los quesos elaborados con cuajo animal unas puntuaciones del atributo firmeza significativamente superiores

( $p < 0,05$ ) con respecto a los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado. Tejada (2001) obtuvo puntuaciones de firmeza más altas para lotes de queso elaborados con cuajo animal con respecto a los lotes obtenidos con coagulante vegetal liofilizado y coagulante vegetal fresco, sin llegar a establecer diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ambos tipos de coagulantes vegetales.

Se observa un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la cremosidad desde los 60 hasta los 180 días de maduración. Hort *et al.* (1997a,b) en queso Cheddar, Chen *et al.* (2003) en queso Pecorino y Carmona (1994), Tejada (2001) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches también detectaron un aumento de la cremosidad a lo largo de la maduración. Los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado presentaron unas puntuaciones de cremosidad significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a las de los quesos elaborados con cuajo animal. En este sentido Hort *et al.* (1997a,b) y Tejada (2001) observaron una relación directa entre la proteólisis y la cremosidad, debido a que la desintegración de la red caseínica da lugar a una estructura más homogénea que causa el incremento de la cremosidad (Green y Grandison, 1987). Por este motivo la mayor cremosidad detectada en los lotes de quesos elaborados con coagulante vegetal puede atribuirse a la mayor actividad proteolítica observada en estos quesos. Sanjuán (1992) atribuía la mayor cremosidad de los quesos obtenidos con coagulante vegetal a los mayores contenidos en grasa detectados en los mismos, y la mayor hidrólisis de las caseínas, con respecto a los elaborados con cuajo animal. En la presente memoria las cuajadas obtenidas con coagulante vegetal liofilizado presentaron un contenido graso algo superior respecto de las elaboradas con cuajo animal.

#### **IV.A.6.1.4.- Percepciones gustativas.**

Las puntuaciones para los atributos gustativos de los lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) se recogen en la Tabla 74.

Fernández del Pozo (1988a) en queso de La Serena, Ortigosa *et al.* (1999), Bárcenas *et al.* (2003) y Virto *et al.* (2003) en queso Idiazábal, Carmona (1994), Tejada (2001) y Vioque (2002) en queso de Los Pedroches y Ballesteros (2002) en queso Manchego también detectaron un incremento en las puntuaciones de los atributos gustativos durante la maduración.

Resultados y Discusión

**Tabla 74.-** Evolución de los atributos sensoriales relacionados con la percepción gustativa de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y Coagulante Vegetal Liofilizado (CVL) en los 4 últimos meses de maduración.

	Coagulante	Días de Maduración				
		60	90	120	180	
Intensidad sabor	CA1	4,30	5,76	6,19	7,02	
	CA2	4,98	5,90	6,36	6,38	
	CA3	4,71	5,50	5,01	6,73	
	CVL1	5,38	6,33	6,10	6,71	
	CVL2	4,94	5,59	6,75	8,81	
	CVL3	5,35	6,15	6,43	6,88	
	Sabor picante	CA1	3,27	4,36	5,96	5,77
		CA2	2,37	4,07	5,07	5,39
		CA3	2,40	3,09	4,11	5,08
CVL1		3,35	4,47	5,07	5,64	
CVL2		3,81	4,14	5,60	5,82	
CVL3		3,09	3,98	4,88	5,97	
Sabor ácido		CA1	4,07	4,38	5,71	5,23
		CA2	4,81	5,56	4,46	5,12
		CA3	4,22	4,81	5,76	5,93
	CVL1	4,96	4,55	5,34	6,45	
	CVL2	4,17	4,90	5,87	7,44	
	CVL3	4,70	5,60	6,39	6,83	
	Sabor salado	CA1	4,52	4,86	5,09	5,55
		CA2	3,98	4,72	5,86	5,69
		CA3	3,40	3,54	4,56	4,56
CVL1		3,90	4,16	4,69	4,69	
CVL2		4,07	4,90	4,56	6,40	
CVL3		4,47	4,24	4,35	4,69	
Sabor amargo		CA1	2,05	2,33	4,01	4,23
		CA2	2,04	2,63	3,27	3,30
		CA3	2,66	2,94	3,81	3,85
	CVL1	3,12	3,25	4,72	4,65	
	CVL2	3,62	3,65	4,67	4,57	
	CVL3	3,29	3,18	4,29	4,50	

## Resultados y Discusión

Este fenómeno se debe a un aumento de los compuestos responsables del sabor como consecuencia de las transformaciones químicas que se producen en la pasta del queso.

El tipo de coagulante no influyó significativamente ( $p > 0,05$ ) en las puntuaciones de los parámetros sabor picante y sabor salado de los quesos estudiados. No obstante, los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado obtuvieron puntuaciones superiores respecto de los quesos elaborados con cuajo animal para los atributos intensidad de sabor, sabor ácido y sabor amargo, aunque no se establecieron diferencias significativas en todos los casos.

En la Tabla 75 se observa que con el empleo del coagulante vegetal liofilizado se alcanza en un período de maduración más corto las características sensoriales típicas de los quesos, por una aceleración de la proteólisis. Sanjuán (1992), Vioque (2002) y Tejada y Fernández-Salguero (2003) en queso de Los Pedroches, Núñez *et al.*, (1991b) en queso de La Serena, Picón *et al.* (1996, 1997) en queso Manchego y Freitas y Malcata (1998b) en queso Picante también detectaron una mayor intensidad de sabor en los quesos elaborados con coagulante vegetal con respecto a los elaborados con cuajo animal.

Tejada (2001) observó además mayores puntuaciones para los atributos sabor ácido y sabor salado de lotes de quesos elaborados con coagulante vegetal fresco y liofilizado con respecto a los obtenidos con cuajo animal, sin establecer diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ambos tipos de presentaciones del coagulante vegetal ensayado.

En queso de Los Pedroches, Tejada (2001) observó puntuaciones respecto al atributo sabor amargo ligeramente superiores en quesos elaborados con coagulante vegetal fresco y liofilizado con respecto a los elaborados con cuajo animal. Por otra parte Sanjuán (1992) en queso de Los Pedroches, Picón *et al.* (1996) en queso Manchego y Chen *et al.* (2003) en queso Pecorino no detectaron diferencias entre el sabor amargo de los quesos elaborados con cuajo animal con respecto a los obtenidos con coagulante vegetal.

Tradicionalmente se admite que los quesos de leche de oveja elaborados con coagulante vegetal no desarrollan sabores muy amargos, al contrario que en los quesos de leche de vaca. Se han detectado sabores amargos en diversos tipos de quesos elaborados con leche de vaca (Barbosa *et al.*, 1976; Barbosa *et al.*, 1981; Banks *et al.*, 1998).

## Resultados y Discusión

Este fenómeno posiblemente sea debido a que las caseínas de leche de oveja son más resistentes que las caseínas bovinas a la formación de péptidos amargos por la acción de proteasas (Pelissier y Manchón, 1976). En este sentido Carrera *et al.* (1999) detectaron un nivel de péptidos hidrofóbicos (componentes relacionados con el sabor amargo) en queso hispánico elaborado con leche de vaca y *Cynara cardunculus* tras 24 horas de maduración 71,5 veces superior al detectado en el mismo queso elaborado con cuajo animal. No obstante Gaya *et al.* (1999) no hallaron diferencias en la concentración de péptidos hidrofóbicos en queso Manchego elaborado con cuajo animal y coagulante vegetal. En la presente memoria se ha detectado una correlación positiva entre el sabor amargo y varios componentes nitrogenados (Figuras 57y 60).

Resultados y Discusión

**Tabla 75.-** Puntuaciones medias y desviaciones estándar obtenidas para los atributos sensoriales estudiados en quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal liofilizado (CVL) a lo largo del tiempo de maduración considerado.

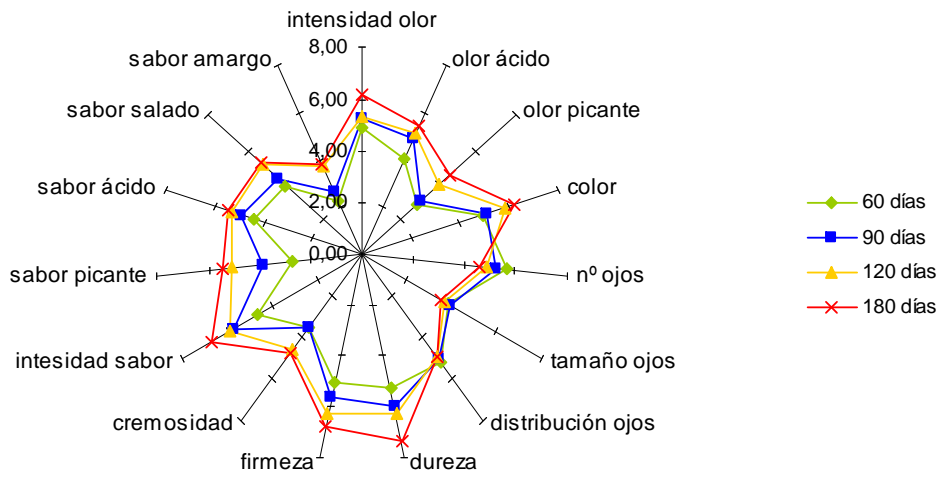
		Días de Maduración			
Coagulante		60	90	120	180
Intensidad olor	CA	4,91 ± 0,63 <sup>a</sup>	5,22 ± 0,71 <sup>ab</sup>	5,31 ± 0,81 <sup>ab</sup>	6,19 ± 0,58 <sup>b</sup>
	CVL	5,41 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,50 ± 0,14 <sup>ab</sup>	5,63 ± 0,22 <sup>ab</sup>	6,62 ± 1,27 <sup>b</sup>
Olor Ácido	CA	4,05 ± 0,22 <sup>a</sup>	4,91 ± 0,76 <sup>ab</sup>	5,12 ± 0,41 <sup>ab</sup>	5,47 ± 0,26 <sup>ab</sup>
	CVL	4,62 ± 0,11 <sup>ab</sup>	5,21 ± 0,59 <sup>ab</sup>	5,24 ± 0,20 <sup>ab</sup>	6,12 ± 1,02 <sup>b</sup>
Olor Picante	CA	2,82 ± 1,03 <sup>a</sup>	3,06 ± 0,02 <sup>ab</sup>	4,03 ± 0,63 <sup>abc</sup>	4,56 ± 0,11 <sup>bc</sup>
	CVL	3,09 ± 0,58 <sup>ab</sup>	3,20 ± 0,12 <sup>ab</sup>	4,29 ± 0,33 <sup>abc</sup>	5,02 ± 0,81 <sup>c</sup>
Intensidad Color	CA	4,90 ± 0,55 <sup>a</sup>	5,13 ± 0,36 <sup>ab</sup>	5,77 ± 0,37 <sup>abc</sup>	6,14 ± 0,26 <sup>bc</sup>
	CVL	5,24 ± 0,41 <sup>ab</sup>	5,83 ± 0,11 <sup>abc</sup>	6,19 ± 0,20 <sup>bc</sup>	6,77 ± 0,81 <sup>c</sup>
Número Ojos	CA	5,62 ± 0,48 <sup>a</sup>	5,18 ± 0,20 <sup>ab</sup>	4,83 ± 0,43 <sup>ab</sup>	4,50 ± 0,30 <sup>b</sup>
	CVL	5,83 ± 0,71 <sup>a</sup>	5,52 ± 0,64 <sup>ab</sup>	4,75 ± 1,52 <sup>ab</sup>	4,28 ± 0,72 <sup>b</sup>
Tamaño Ojos	CA	3,83 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,89 ± 0,60 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,49 <sup>a</sup>	3,56 ± 0,07 <sup>a</sup>
	CVL	3,92 ± 0,29 <sup>a</sup>	3,61 ± 0,40 <sup>a</sup>	3,63 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,40 <sup>a</sup>
Distribución Ojos	CA	5,14 ± 0,46 <sup>a</sup>	5,02 ± 0,67 <sup>a</sup>	4,90 ± 1,09 <sup>a</sup>	4,90 ± 1,03 <sup>a</sup>
	CVL	4,96 ± 0,59 <sup>a</sup>	4,55 ± 1,07 <sup>a</sup>	4,45 ± 0,70 <sup>a</sup>	4,94 ± 0,39 <sup>a</sup>
Dureza	CA	5,31 ± 0,53 <sup>abc</sup>	6,00 ± 0,47 <sup>bc</sup>	6,31 ± 0,94 <sup>bc</sup>	7,34 ± 0,91 <sup>c</sup>
	CVL	3,51 ± 0,26 <sup>a</sup>	4,44 ± 1,48 <sup>ab</sup>	4,62 ± 0,77 <sup>ab</sup>	4,43 ± 0,36 <sup>ab</sup>
Firmeza	CA	5,12 ± 0,58 <sup>bcd</sup>	5,66 ± 0,16 <sup>cde</sup>	6,30 ± 0,05 <sup>de</sup>	6,78 ± 0,58 <sup>e</sup>
	CVL	3,80 ± 0,47 <sup>a</sup>	3,83 ± 0,36 <sup>ab</sup>	4,07 ± 0,65 <sup>ab</sup>	4,40 ± 0,46 <sup>abc</sup>
Cremosidad	CA	3,44 ± 0,28 <sup>a</sup>	3,51 ± 0,42 <sup>ab</sup>	4,52 ± 0,49 <sup>ab</sup>	4,76 ± 0,22 <sup>c</sup>
	CVL	6,32 ± 0,51 <sup>d</sup>	6,52 ± 0,15 <sup>d</sup>	6,79 ± 0,30 <sup>de</sup>	7,57 ± 0,39 <sup>e</sup>
Intensidad Sabor	CA	4,66 ± 0,34 <sup>a</sup>	5,72 ± 0,20 <sup>ab</sup>	5,85 ± 0,73 <sup>ab</sup>	6,71 ± 0,32 <sup>bc</sup>
	CVL	5,22 ± 0,25 <sup>ab</sup>	6,02 ± 0,39 <sup>abc</sup>	6,42 ± 0,33 <sup>bc</sup>	7,47 ± 1,17 <sup>c</sup>
Sabor Picante	CA	2,68 ± 0,51 <sup>a</sup>	3,84 ± 0,67 <sup>abc</sup>	5,05 ± 0,92 <sup>cde</sup>	5,41 ± 0,35 <sup>de</sup>
	CVL	3,42 ± 0,37 <sup>ab</sup>	4,20 ± 0,25 <sup>bcd</sup>	5,18 ± 0,37 <sup>cde</sup>	5,81 ± 0,17 <sup>e</sup>
Sabor Ácido	CA	4,37 ± 0,39 <sup>a</sup>	4,91 ± 0,60 <sup>ab</sup>	5,31 ± 0,74 <sup>ab</sup>	5,43 ± 0,44 <sup>abc</sup>
	CVL	4,61 ± 0,40 <sup>ab</sup>	5,02 ± 0,53 <sup>ab</sup>	5,87 ± 0,53 <sup>bc</sup>	6,90 ± 0,50 <sup>c</sup>
Sabor Salado	CA	3,97 ± 0,56 <sup>a</sup>	4,37 ± 0,72 <sup>ab</sup>	5,17 ± 0,65 <sup>ab</sup>	5,27 ± 0,62 <sup>b</sup>
	CVL	4,15 ± 0,29 <sup>a</sup>	4,43 ± 0,41 <sup>ab</sup>	4,53 ± 0,17 <sup>ab</sup>	5,26 ± 0,99 <sup>b</sup>
Sabor amargo	CA	2,25 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,31 <sup>ab</sup>	3,70 ± 0,38 <sup>cd</sup>	3,79 ± 0,47 <sup>cd</sup>
	CVL	3,34 ± 0,25 <sup>bc</sup>	3,36 ± 0,25 <sup>bc</sup>	4,56 ± 0,24 <sup>d</sup>	4,57 ± 0,08 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05)

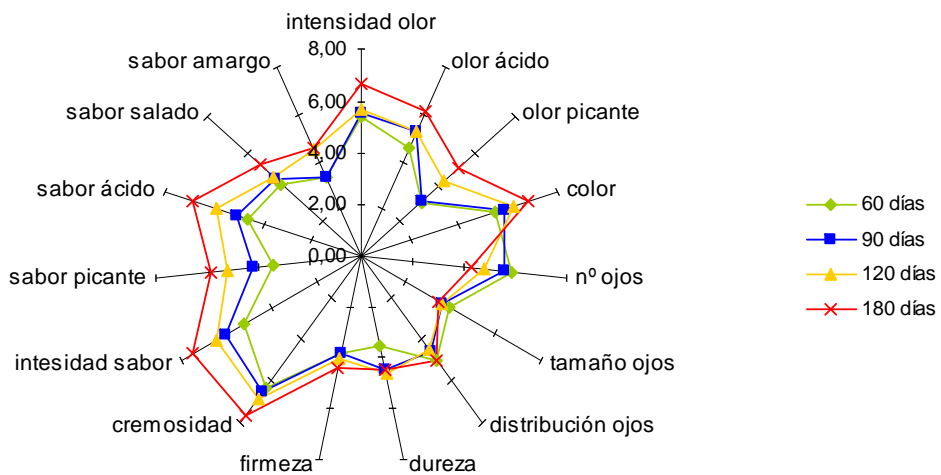


Resultados y Discusión

**Figura 49.** Perfil sensorial de los quesos elaborados con cuajo animal a los distintos tiempos de maduración considerados.

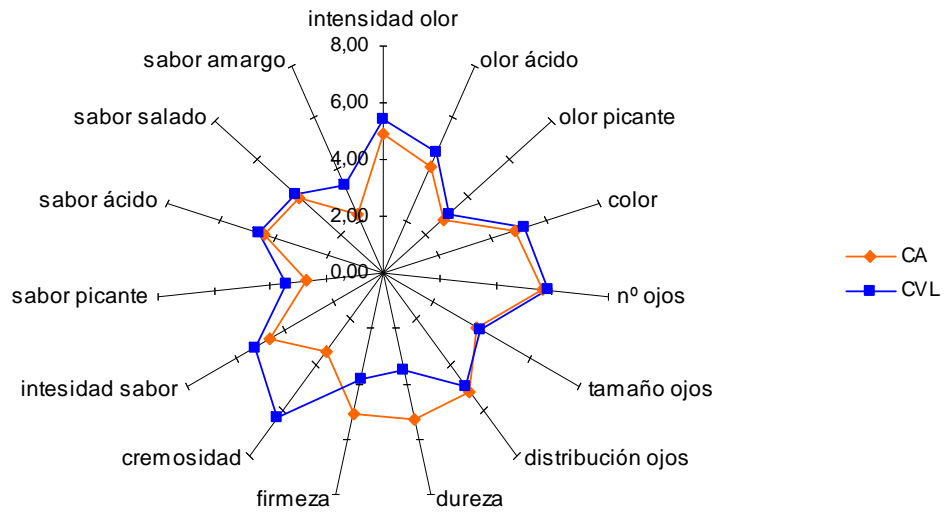


**Figura 50.** Perfil sensorial de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado a los distintos tiempos de maduración considerados.

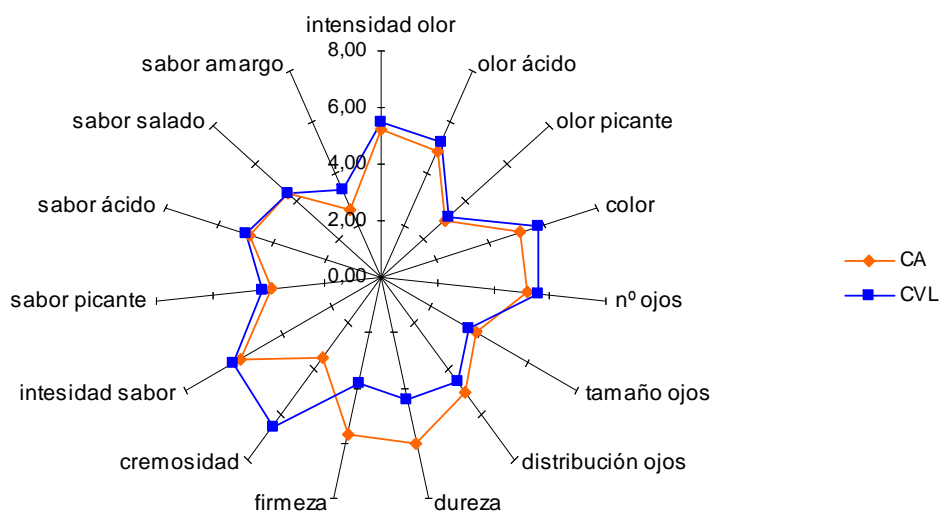


Resultados y Discusión

**Figura 51.-** Perfil sensorial de los quesos a los 60 días de maduración elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado

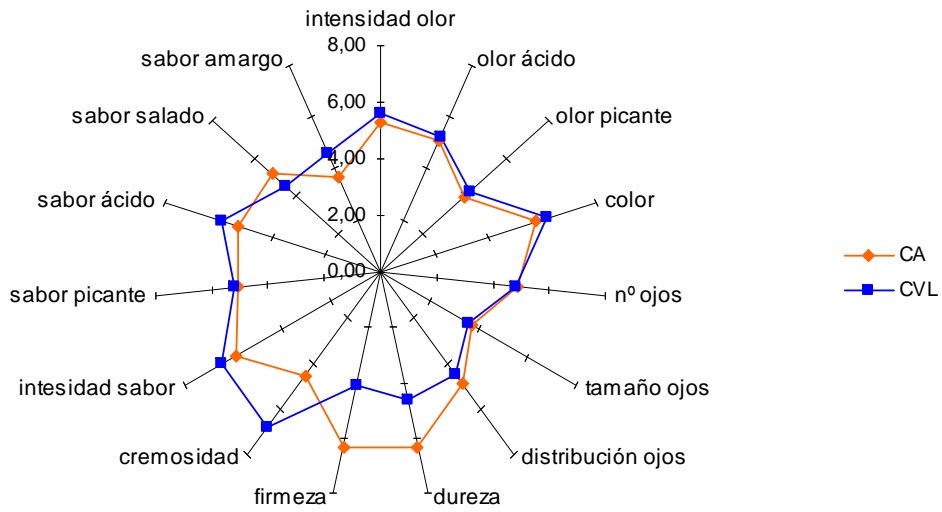


**Figura 52.-** Perfil sensorial de los quesos a los 90 días de maduración elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado.

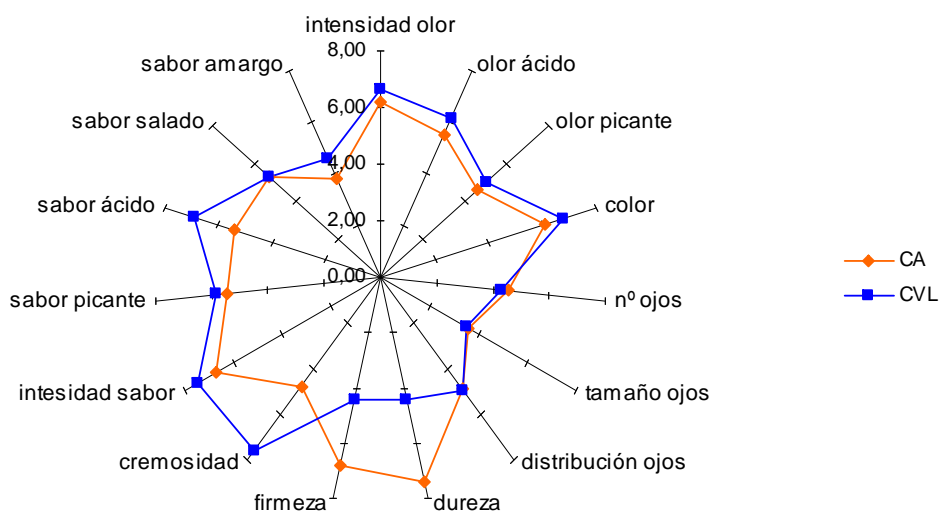


Resultados y Discusión

**Figura 53.-** Perfil sensorial de los quesos a los 120 días de maduración elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado



**Figura 54.-** Perfil sensorial de los quesos a los 180 días de maduración elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado.



#### IV.A.6.2.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.

##### IV.A.6.2.1.- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración.

En la Tabla 76 se muestran los valores de Lambda de Wilks y valor F de los atributos sensoriales estudiados para los quesos coagulados con cuajo animal y con coagulante vegetal liofilizado. Los atributos sabor salado, sabor amargo y intensidad olor fueron las variables con mayor capacidad de diferenciación de los 4 intervalos de maduración considerados. Por otra parte la intensidad de sabor fue el parámetro con menor capacidad discriminante.

**Tabla 74.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

atributo	Lambda de Wilks	Valor F
intensidad olor	0,31	4,55
olor ácido	0,64	1,12
olor picante	0,63	1,15
color	0,65	1,08
número ojos	0,61	1,27
tamaño ojos	0,57	1,51
distribución ojos	0,65	1,10
dureza	0,64	1,14
firmeza	0,89	0,25
cremosidad	0,44	2,55
intensidad sabor	0,97	0,06
sabor picante	0,38	3,27
sabor ácido	0,64	1,13
sabor salado	0,29	4,89
sabor amargo	0,26	5,67

En la Tabla 77 se presentan las distancias establecidas en función de los atributos sensoriales.

**Tabla 77.** Distancias entre grupos de los cuadrados de Mahalanobis.

	60	90	120	180
60	0,00	63,19	414,10	441,70
90	63,19	0,00	222,53	213,29
120	414,10	222,53	0,00	19,79
180	441,70	213,29	19,79	0,00

### Resultados y Discusión

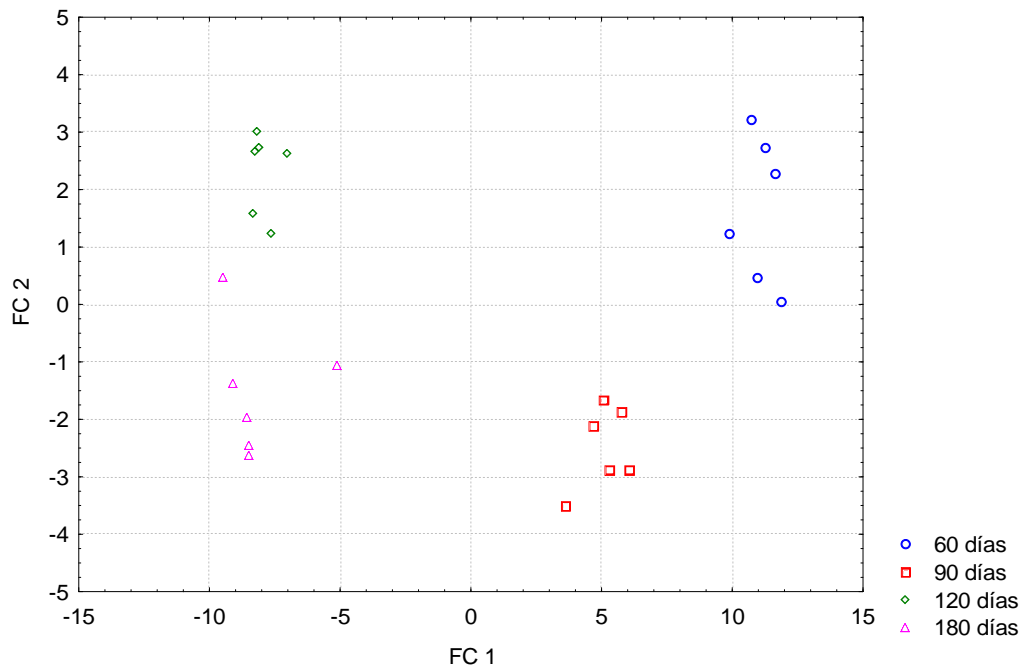
A partir de los atributos sensoriales considerados se obtienen las funciones de clasificación y con ellas la matriz de clasificación (Tabla 78), en la cual todos los quesos estudiados aparecen correctamente clasificados.

**Tabla 78.-** Número de muestras correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.

	Correcto (%)	60	90	120	180
60	100	6	0	0	0
90	100	0	6	0	0
120	100	0	0	6	0
180	100	0	0	0	6
Total correcto	100	6	6	6	6

Mediante las dos primeras funciones canónicas se representan en el diagrama de dispersión (Figura 55) los quesos con 60, 90, 120 y 180 días de maduración

**Figura 55.-** Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC 1 y FC 2.



#### **IV.A.6.2.2.- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante.**

Los valores de Lambda de Wilks y valor F de los atributos sensoriales estudiados para los quesos elaborados con cuajo animal y con coagulante vegetal liofilizado se presentan en la Tabla 79. La cremosidad, firmeza y distribución de ojos fueron las variables con mayor capacidad de diferenciación de los cuatro períodos de maduración considerados. Por otra parte los atributos color, dureza, intensidad olor, olor picante, olor ácido, intensidad sabor y sabor picante mostraron una escasa capacidad de discriminación.

**Tabla 79.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

atributo	Lambda de Wilks	Valor F
intensidad olor	0,99	0,07
olor ácido	0,90	0,86
olor picante	0,98	0,19
color	1,00	0,00
número ojos	0,87	1,22
tamaño ojos	0,87	1,18
distribución ojos	0,61	5,08
dureza	1,00	0,00
firmeza	0,60	5,26
cremosidad	0,52	7,43
intensidad sabor	0,95	0,38
sabor picante	0,94	0,49
sabor ácido	0,78	2,26
sabor salado	0,88	1,08
sabor amargo	0,89	1,02

En la Tabla 80 se presenta la Tabla de clasificación de los quesos donde se clasificaron correctamente el 100 % de los quesos estudiados.

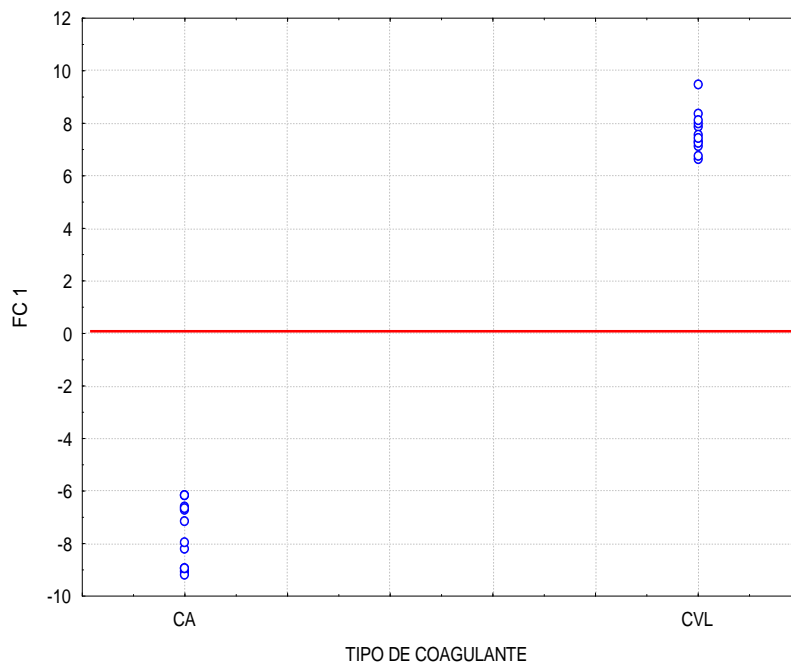
**Tabla 80.-** Número de quesos correctamente clasificados mediante la función de clasificación.

	Correcto (%)	CA	CVL
CA	100	12	0
CVL	100	0	12
Total	100	12	12

### Resultados y Discusión

Mediante la función discriminante se obtiene el diagrama de dispersión (Figura 56), donde aparecen correctamente clasificados todos los quesos estudiados.

**Figura 56.-** Representación de los quesos en función del coagulante ensayado mediante la función canónica FC 1.



#### IV.A.6.3.- RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS Y LOS ATRIBUTOS SENSORIALES. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.

El análisis de componentes principales se puede definir como un método estadístico de análisis multivariable, exploratorio y de simplificación estructural, cuyo objetivo es explicar la matriz de datos en base a una serie de componentes principales. Estos componentes son agrupaciones de variables correlacionadas entre sí. Así se consigue una reducción en el número de variables. Con su uso se pretenden establecer las interrelaciones que puedan existir entre las variables así como la determinación de la estructura de las muestras objeto de estudio (Bisquerra, 1989).

La finalidad de aplicar esta técnica estadística en el presente trabajo fue triple:

- Explorar la interrelación existente entre las variables estudiadas.
- Extraer los componentes principales (agrupaciones de variables interrelacionadas).
- Caracterizar a los quesos según esos componentes.

En dicho modelo estadístico se han empleado todas las variables sensoriales y aquellas variables físico-químicas, bioquímicas y microbiológicas que hayan podido ser responsables de los cambios organolépticos detectados en los quesos estudiados. Así, se han incluido un total de 32 variables:  $a_w$ , pH, variables composicionales (humedad, grasa, proteína, ácido láctico, cenizas, ClNa), contenido en calcio, algunas fracciones nitrogenadas (NS, NNP, NAA, N-NH<sub>3</sub>, N-NH<sub>2</sub>, Npp y Npéptidos), lactobacilos y los quince atributos sensoriales estudiados.

Con el propósito de observar las diferencias presentes entre las relaciones de las variables de los quesos elaborados con cuajo animal y los elaborados con coagulante vegetal liofilizado se aplicó el análisis de componentes principales para cada uno de ellos. Además no se realizó la rotación de la matriz de factores y como criterio de selección de variables fue que el autovalor fuese superior a 1.

Para los quesos elaborados con cuajo animal se detectaron 6 componentes principales que explicaron el 92,99 % de la varianza, y para los lotes de quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado se extrajeron 5 componentes principales que explicaron el 90,99 % de la varianza (Tabla 81).

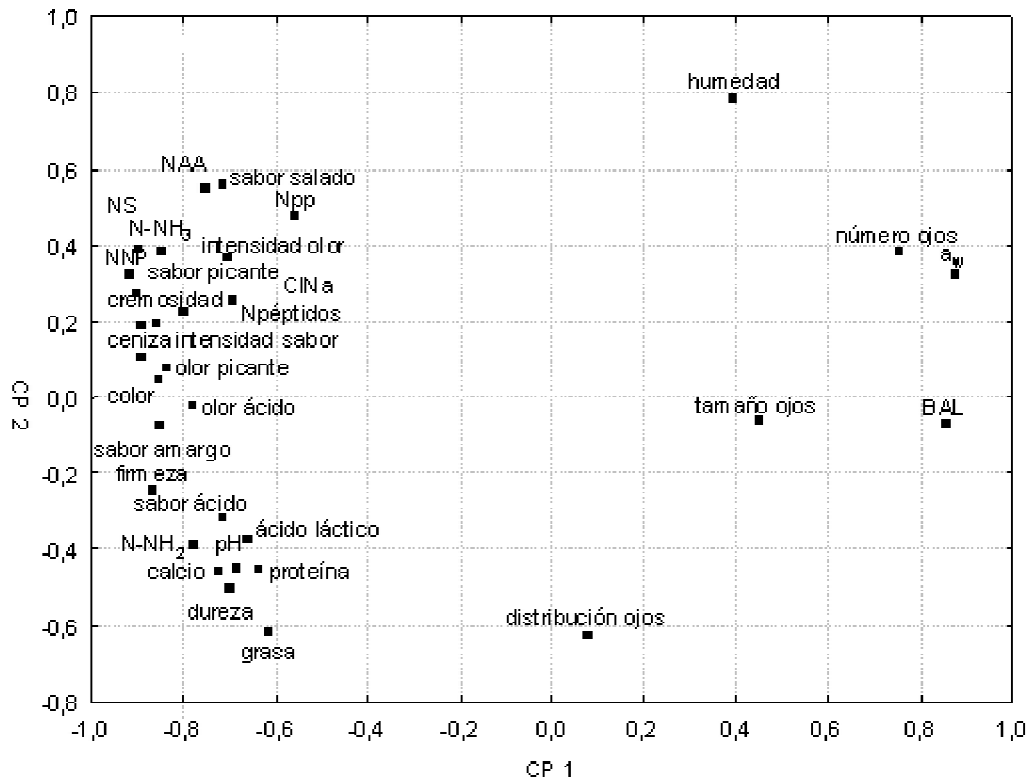


**Tabla 81.-** Características de los componentes principales.

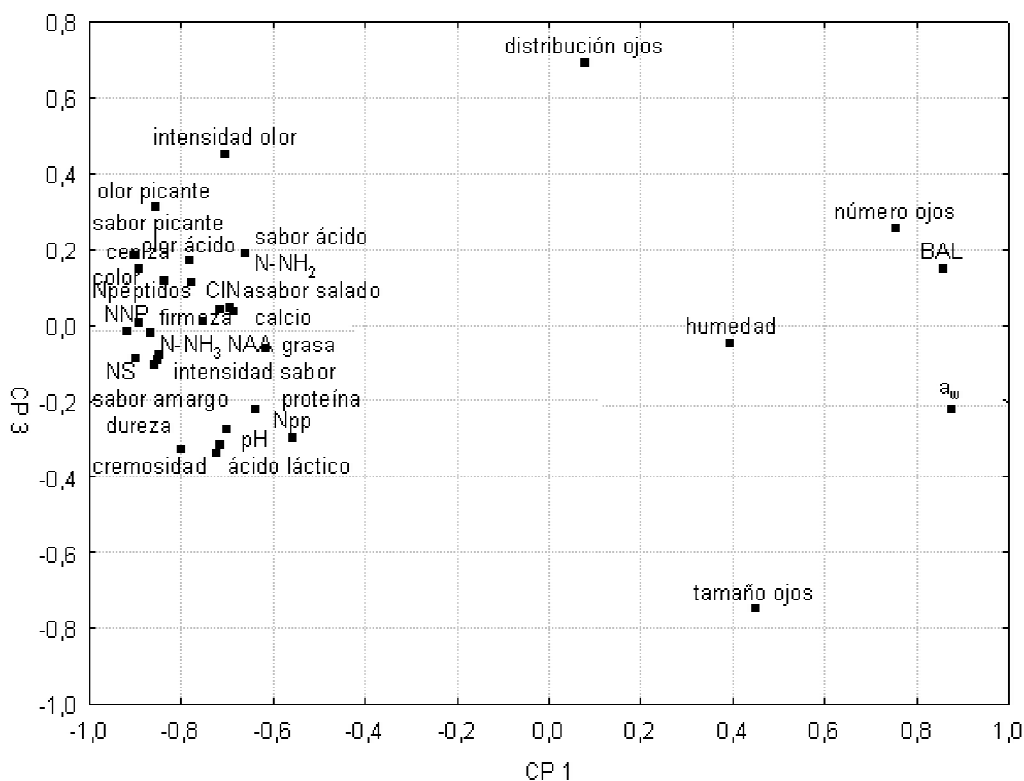
Componente	CA		CVL	
	autovalor	(%) varianza	autovalor	(%) varianza
1	18,34	57,31	18,00	56,25
2	4,69	14,66	6,11	19,09
3	2,21	6,90	2,29	7,15
4	1,79	5,58	1,46	4,55
5	1,50	4,68	1,26	3,95
6	1,24	3,86	--	--

En las Figuras 57, 58 y 59 se representan las 32 variables incluidas en el modelo estadístico en función de los tres primeros componentes principales (CP1, CP2 y CP3) de los quesos elaborados con cuajo animal, para proceder al análisis e interpretación de los resultados obtenidos. Los resultados respecto de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado se presentan en las Figuras 60, 61 y 62.

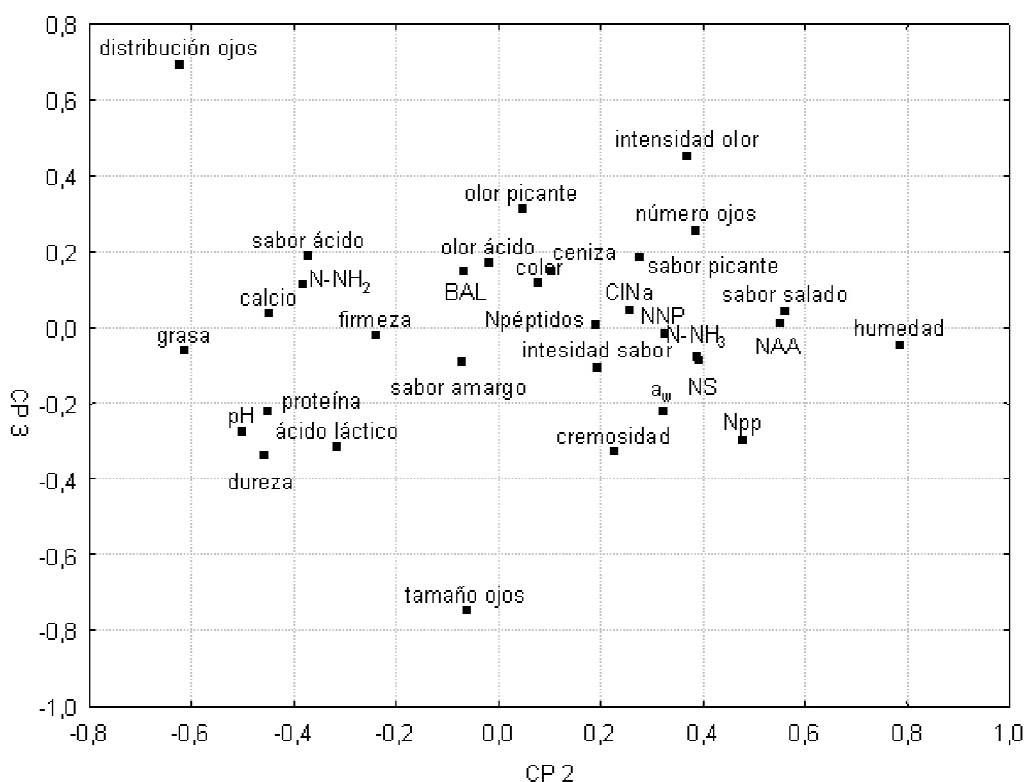
**Figura 57.-** Representación de las variables de los quesos elaborados con cuajo animal en función de los componentes principales CP1-CP2.



**Figura 58.-** Representación de las variables de los quesos elaborados con cuajo animal en función de los componentes principales CP1-CP3.

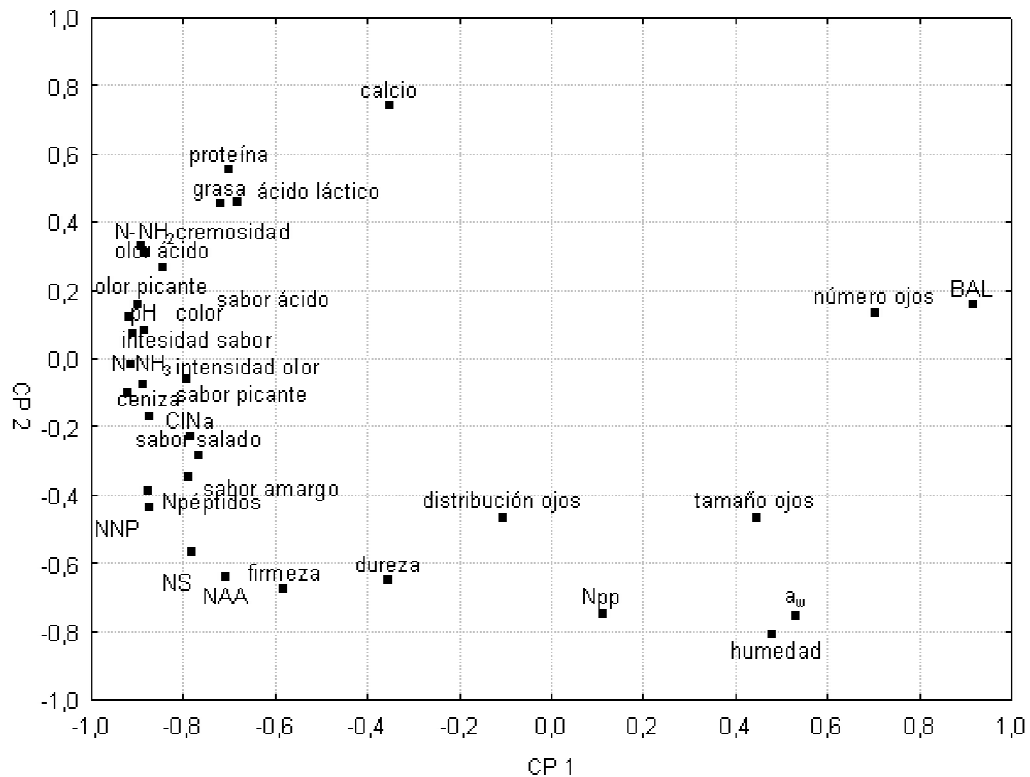


**Figura 59.-** Representación de las variables de los quesos elaborados con cuajo animal en función de los componentes principales CP2-CP3.

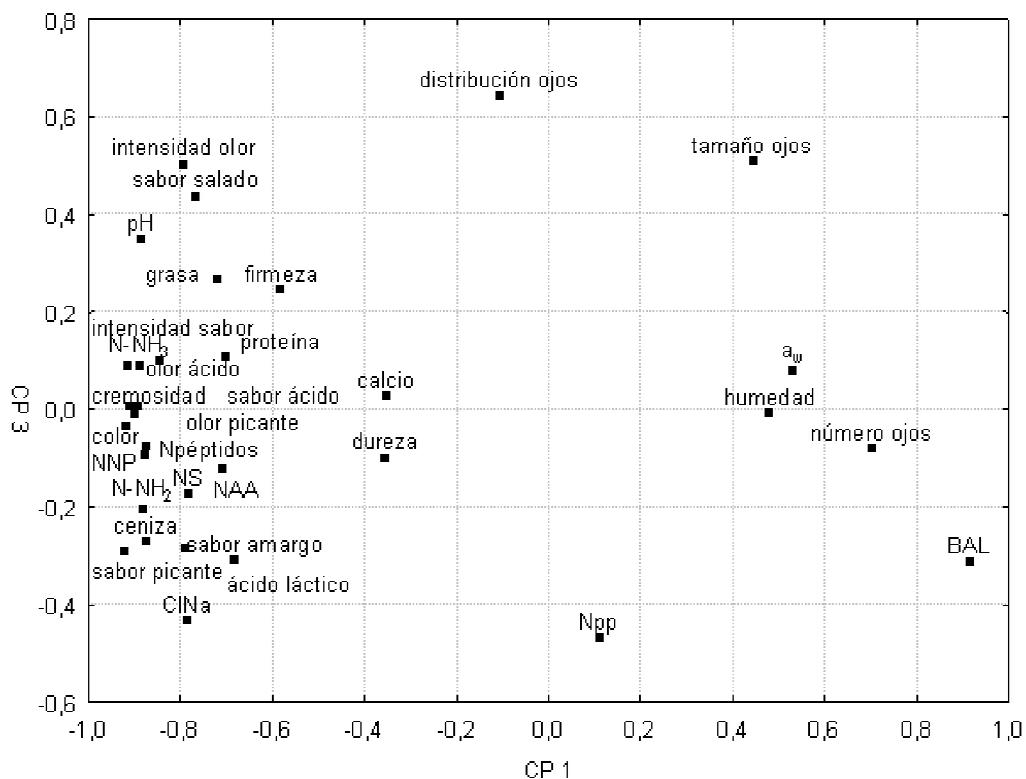


Resultados y Discusión

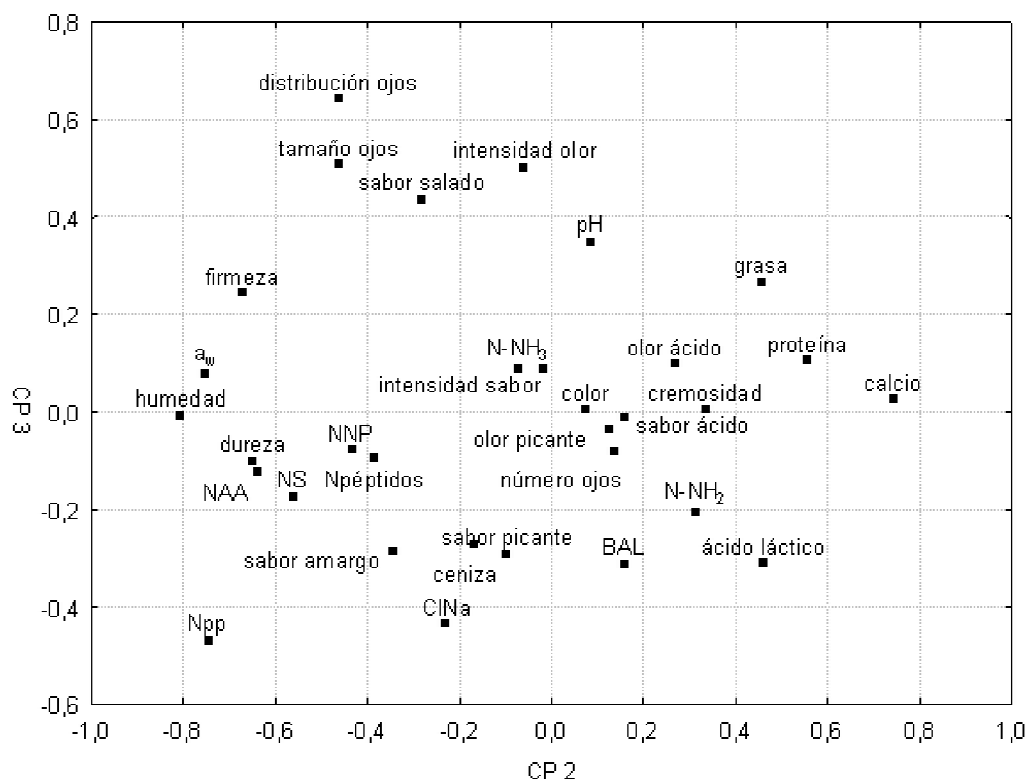
**Figura 60.-** Representación de las variables de los quesos elaborados con Coagulante vegetal liofilizado en función de los componentes principales CP1-CP2.



**Figura 61.-** Representación de las variables de los quesos elaborados con Coagulante vegetal liofilizado en función de los componentes principales CP1-CP3.



**Figura 62.-** Representación de las variables de los quesos elaborados con Coagulante vegetal liofilizado en función de los componentes principales CP2-CP3.



En la Figura 57 y 58 se observan dos grupos de variables con coeficientes elevados y diferenciados respecto del primer componente. En la parte izquierda se encuentra, correlacionadas negativamente con el primer componente extraído, aquellas variables que aumentaron desde los 60 hasta los 180 días de maduración, como son las fracciones nitrogenadas incluidas en el modelo, el contenido en proteína, grasa, ácido láctico y cloruros y la mayoría de atributos sensoriales. Aquellas variables que disminuyeron en los últimos cuatro meses del período madurativo estudiado aparecen en la parte derecha del eje de ordenadas, la  $a_w$ , humedad, número, tamaño y distribución de los ojos del queso, todas correlacionadas de forma positiva con el primer componente. Los atributos sensoriales se correlacionan de manera positiva entre ellos.

El segundo componente extraído se correlaciona intensamente y de forma positiva con la mayoría de fracciones nitrogenadas, CINa y sabor salado, y de forma negativa con los atributos de percepción háptica, la grasa, el pH y la proteína (Figuras 57 y 59). En la Figuras 58 y 59 se observa como el tercer componente se correlaciona de forma negativa con la grasa, cremosidad, pH y ácido láctico y de manera positiva

## Resultados y Discusión

con distribución de ojos, intensidad de olor, olor picante, olor ácido y N-NH<sub>2</sub>. Las fracciones nitrogenadas se correlacionan con la intensidad de olor (Figura 58).

Respecto de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado en la Figura 60 y 61 se observa como el primer componente se correlaciona de manera positiva con aquellas variables que aumentaron durante los seis meses de maduración considerados mientras que la  $a_w$ , humedad, BAL y número y tamaño de ojos (variables que disminuyeron durante la maduración) se correlacionan de forma negativa con este primer componente extraído. El segundo componente se correlaciona de forma positiva con la grasa, proteína, calcio y con atributos sensoriales olfativos, visuales y gustativos y de manera negativa con la dureza y la mayoría de las fracciones nitrogenadas estudiadas (Figura 60 y 62). En las Figuras 61 y 62 se observa como el tercer componente del modelo estadístico se correlaciona de forma positiva con el valor pH, grasa, distribución y tamaño de ojos e intensidad de olor y de manera negativa con la mayoría de fracciones nitrogenadas y el sabor amargo.

Respecto a los atributos sensoriales en referencia a las demás variables del modelo estadístico estudiado, en las Figuras 57, 58, 60 y 61 se observa, en la parte izquierda del eje de abscisas, tanto para los quesos elaborados con cuajo animal como para los elaborados con coagulante vegetal liofilizado, una relación directa entre los atributos de olor y algunas fracciones nitrogenadas. Todos los atributos de olor se relacionan directamente entre sí y con el resto de atributos sensoriales estudiados (Figuras 57, 58, 60 y 61) e indirectamente con el contenido en humedad y  $a_w$ .

La humedad y la  $a_w$  se relacionan directamente con el tamaño y número de ojos en todos los quesos mediante el primer componente (Figuras 57 y 60) y con la dureza y la firmeza. Estos dos atributos siempre aparecen relacionados entre ellos y con el calcio y la proteína en los quesos elaborados con cuajo animal y con las fracciones nitrogenadas NAA y NS en los quesos obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado. En los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado la cremosidad aparece relacionada con la grasa (Figuras 60, 61 y 62). Además se ha establecido una relación entre la grasa y la cremosidad en quesos obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado.

Respecto de los atributos de sabor se establece una relación directa entre la intensidad de sabor, el sabor picante y el sabor amargo con la proteína y la mayoría de las fracciones nitrogenadas. El sabor amargo se correlaciona positivamente con

NS, NNP y NAA en los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado (Figura 62). En quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado y cuajo animal el sabor ácido se relacionó con el contenido en ácido láctico.

## **IV.A.7.- RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS.**

### **IV.A.7.1.- CORRELACIONES.**

En las Tablas 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 y 92 se presentan los índices de correlación y la significación estadística que se establecen entre las variables físico-químicas, composicionales, fracciones nitrogenadas, recuentos microbianos y elementos minerales analizados.

### **IV.A.7.2.- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.**

En el análisis de componentes principales de las variables composicionales, de las fracciones nitrogenadas, recuentos microbianos y elementos minerales determinados para todos los lotes de quesos estudiados se han extraído 4 componentes con un autovalor superior a 1 que explican el 84,94 % de la varianza (Tabla 93).

**Tabla 93.-** Características de los componentes principales.

componente	autovalor	(%) varianza	(%) autovalor acumulado	(%) varianza acumulada
1	23,94	70,41	23,94	70,41
2	2,09	6,14	26,03	76,55
3	1,55	4,56	27,58	81,11
4	1,30	3,83	28,88	84,94

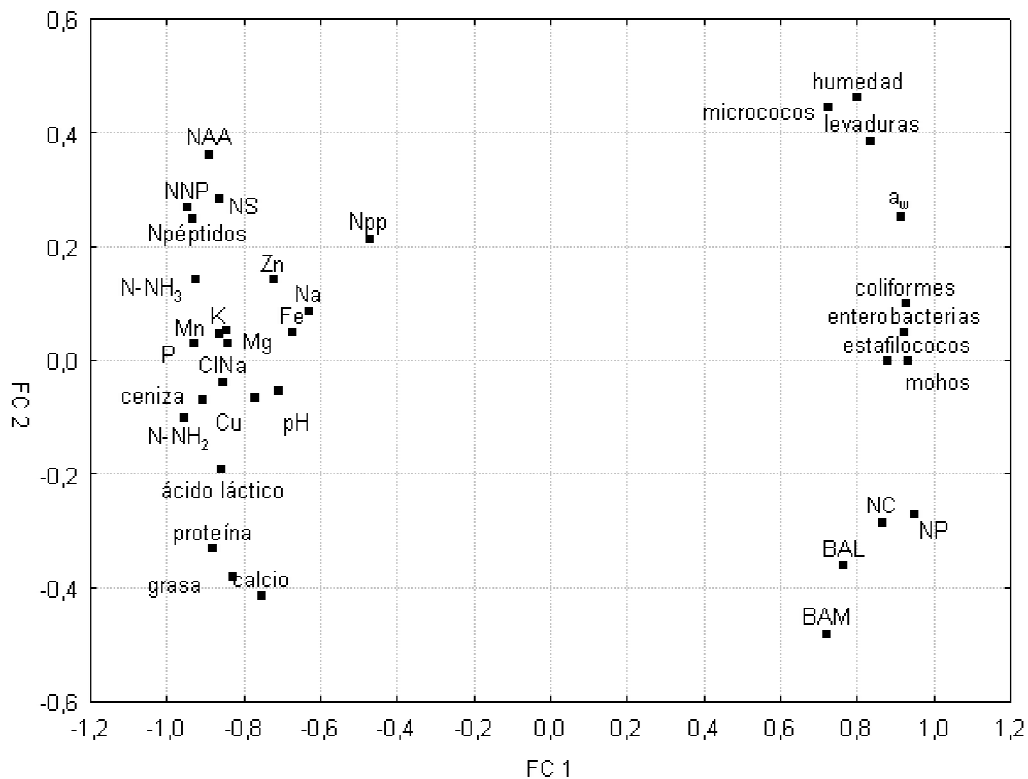
Mediante el primer componente diferenciamos dos grandes grupos de variables. En el lado izquierdo del eje de abscisas aparecen representadas aquellas variables

### Resultados y Discusión

que aumentaron durante el período madurativo estudiado, la proteína, grasa, cenizas, cloruro sódico, ácido láctico, NS, NNP, NAA, N-NH<sub>3</sub>, N-NH<sub>2</sub> y los contenidos minerales.

Las variables que disminuyeron durante la maduración se presentan agrupadas en el lado derecho del eje X: a<sub>w</sub>, humedad, NC, NP y recuentos de aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, estafilococos, micrococos, BAL, levaduras y mohos.

**Figura 63.-** Representación de las variables de los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado en función de los componentes CP 1-CP 2.



Resultados y Discusión

**Tabla 82.-** Correlaciones establecidas entre las variables composicionales.

	a <sub>w</sub>	pH	humedad	grasa	proteína	cenizas	CINa	ac. láctico
a <sub>w</sub>	1	-,6009	,8587	-,8342	-,8802	-,8817	-,7906	-,8693
	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
pH	-,6009	1	-,4984	,6023	,6543	,4724	,4295	,5865
	p=,000	p= ---	p=,001	p=,000	p=,000	p=,002	p=,005	p=,000
humedad	,8587	-,4984	1	-,8283	-,8490	-,8079	-,6902	-,7375
	p=,000	p=,001	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
grasa	-,8342	,6023	-,8283	1	,9097	,7540	,6979	,8153
	p=,000	p=,000	0	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
proteína	-,8802	,6543	-,8490	,9097	1	,7946	,7113	,8070
	p=,000	0	0	0	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000
cenizas	-,8817	,4724	-,8079	,7540	,7946	1,0000	,9235	,7542
	p=,000	p=,002	p=,000	p=,000	p=,000	1	p=,000	p=,000
CINa	-,7906	,4295	-,6902	,6979	,7113	p= ---	1,0000	,7476
	p=,000	p=,005	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	1	p=,000
ac. láctico	-,8693	,5865	-,7375	,8153	,8070	,7542	p= ---	1
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---

**Tabla 83.-** Correlaciones entre las variables composicionales y las fracciones nitrogenadas.

	NS	NNP	NAA	N-NH <sub>3</sub>	N-NH <sub>2</sub>	NC	NP	Npp	Np
a <sub>w</sub>	-,7704	-,7980	-,6967	-,8113	-,9160	,7704	,7980	-,4841	-,7982
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,001	p=,000
pH	,5294	,6522	,6885	,7301	,7187	-,5294	-,6522	,1865	,6039
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,237	p=,000
humedad	-,5976	-,6334	-,5248	-,6584	-,8214	,5976	,6334	-,3553	-,6400
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,021	p=,000
grasa	,6024	,6832	,6154	,7518	,7879	-,6024	-,6832	,2953	,6680
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,058	p=,000
proteína	,6684	,7594	,6920	,8151	,8722	-,6684	-,7594	,3258	,7433
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,035	p=,000
cenizas	,7801	,8572	,7766	,8076	,8532	-,7801	-,8572	,4211	,8588
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,005	p=,000
CINa	,6949	,8092	,7553	,7669	,7613	-,6949	-,8092	,3109	,8031
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,045	p=,000
ac. láctico	,7665	,7423	,6366	,7485	,8470	-,7665	-,7423	,5543	,7470
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000



Resultados y Discusión

**Tabla 84.-** Correlaciones entre las variables composicionales y los recuentos microbiológicos.

	AM	enterob	colifor	estafilo	microco	BAL	levadu	mohos
a <sub>w</sub>	,4760	,8571	,8689	,8288	,7292	,5804	,8261	,8061
	p=,001	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
pH	-,5977	-,5556	-,5967	-,7831	-,6897	-,6268	-,6698	-,7136
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
humedad	,2893	,7857	,8163	,6702	,7654	,4082	,7819	,6874
	p=,063	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,007	p=,000	p=,000
grasa	-,4394	-,7232	-,7274	-,7383	-,7660	-,5176	-,8037	-,6355
	p=,004	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
proteína	-,4883	-,8078	-,8023	-,8164	-,7803	-,5773	-,8320	-,7483
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
cenizas	-,5302	-,9317	-,9258	-,8059	-,6106	-,5687	-,7463	-,7696
	p=,000	p=0,00	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
CINa	-,5682	-,8573	-,8625	-,8131	-,5440	-,5180	-,7207	-,7086
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
ac. láctico	-,5285	-,7484	-,7628	-,8153	-,7311	-,5934	-,8017	-,7485
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000

**Tabla 85.-** Correlaciones entre las variables composicionales y los elementos minerales.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
a <sub>w</sub>	-,7884	-,8584	-,5512	-,7503	-,7346	-,7335	-,5873	-,5573	-,6880
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
pH	,5730	,6016	,2317	,5974	,4966	,6208	,4622	,5670	,5614
	p=,000	p=,000	p=,140	p=,000	p=,001	p=,000	p=,002	p=,000	p=,000
humedad	-,7259	-,7435	-,5476	-,6591	-,6643	-,6754	-,5370	-,5170	-,6210
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
grasa	,7577	,7607	,5390	,7325	,6516	,6895	,5457	,6109	,6908
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
proteína	,8079	,8182	,5403	,7415	,7013	,7470	,5418	,5899	,7389
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
cenizas	,6438	,8773	,7020	,7621	,7829	,7436	,5386	,6202	,6544
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
CINa	,6234	,8153	,6947	,7802	,7308	,6936	,5364	,5971	,6590
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
ac. Láctico	,7145	,7691	,4295	,7547	,6873	,6815	,5450	,6199	,6389
	p=,000	p=,000	p=,005	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000

Resultados y Discusión

**Tabla 86.-** Correlaciones entre las fracciones nitrogenadas estudiadas en el presente trabajo.

	NS	NNP	NAA	N-NH <sub>3</sub>	N-NH <sub>2</sub>	NC	NP	Npp	Np
NS	1,0000	,9081	,8275	,8228	,8391	-1,0000	-,9081	,8081	,9137
	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=0,00	p=,000	p=,000	p=,000
NNP	,9081	1,0000	,9502	,9270	,8928	-,9081	-1,0000	,4871	,9905
	p=,000	p= ---	p=0,00	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,001	p=0,00
NAA	,8275	,9502	1,0000	,9351	,7990	-,8275	-,9502	,3890	,9018
	p=,000	p=0,00	p= ---	p=0,00	p=,000	p=,000	p=0,00	p=,011	p=,000
N-NH <sub>3</sub>	,8228	,9270	,9351	1,0000	,8683	-,8228	-,9270	,4120	,8781
	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,007	p=,000
N-NH <sub>2</sub>	,8391	,8928	,7990	,8683	1,0000	-,8391	-,8928	,4941	,8932
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NC	-1,0000	-,9081	-,8275	-,8228	-,8391	1,0000	,9081	-,8081	-,9137
	p=0,00	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000
NP	-,9081	-1,0000	-,9502	-,9270	-,8928	,9081	1,0000	-,4871	-,9905
	p=,000	p= ---	p=0,00	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,001	p=0,00
Npp	,8081	,4871	,3890	,4120	,4941	-,8081	-,4871	1,0000	,5121
	p=,000	p=,001	p=,011	p=,007	p=,001	p=,000	p=,001	p= ---	p=,001
Np	,9137	,9905	,9018	,8781	,8932	-,9137	-,9905	,5121	1,0000
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---

**Tabla 87.-** Correlaciones entre las fracciones nitrogenadas y los recuentos microbiológicos.

	AM	enterob	colifor	estafilo	microco	BAL	levadu	mohos
NS	-,6364	-,7719	-,7756	-,7355	-,5571	-,6873	-,6093	-,6875
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NNP	-,7881	-,8598	-,8580	-,8708	-,5652	-,8165	-,7133	-,8042
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NAA	-,8267	-,8026	-,7802	-,8595	-,5057	-,8142	-,5799	-,7672
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,001	p=,000	p=,000	p=,000
N-NH <sub>3</sub>	-,7010	-,8128	-,7964	-,8695	-,6173	-,7805	-,6974	-,7924
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
N-NH <sub>2</sub>	-,6204	-,8800	-,8968	-,8910	-,7657	-,7214	-,8593	-,8614
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NC	,6364	,7719	,7756	,7355	,5571	,6873	,6093	,6875
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NP	,7881	,8598	,8580	,8708	,5652	,8165	,7133	,8042
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
Npp	-,2185	-,4003	-,4105	-,3088	-,3668	-,2848	-,2673	-,3026
	p=,164	p=,009	p=,007	p=,047	p=,017	p=,068	p=,087	p=,051
Np	-,7610	-,8536	-,8607	-,8423	-,5545	-,7928	-,7314	-,7879
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000

Resultados y Discusión

**Tabla 88.-** Correlaciones entre las fracciones nitrogenadas y los elementos minerales.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
NS	,5091	,7713	,5268	,7330	,7106	,6958	,5316	,5922	,6158
	p=,001	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NNP	,5910	,8721	,6250	,8307	,7794	,7895	,6014	,6918	,7323
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NAA	,5329	,8284	,6618	,7579	,7199	,7948	,5973	,7232	,6800
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
N-NH <sub>3</sub>	,6507	,8428	,6356	,7937	,7658	,7636	,5902	,7757	,6852
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
N-NH <sub>2</sub>	,7765	,8641	,5076	,8095	,7876	,7631	,6416	,6293	,7203
	p=,000	p=,000	p=,001	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NC	-,5091	-,7713	-,5268	-,7330	-,7106	-,6958	-,5316	-,5922	-,6158
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NP	-,5910	-,8721	-,6250	-,8307	-,7794	-,7895	-,6014	-,6918	-,7323
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
Npp	,2303	,3817	,2196	,3601	,3854	,3406	,2627	,2619	,2540
	p=,142	p=,013	p=,162	p=,019	p=,012	p=,027	p=,093	p=,094	p=,105
Np	,5777	,8583	,5884	,8288	,7715	,7627	,5822	,6426	,7293
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000

**Tabla 89.-** Correlaciones entre los recuentos microbiológicos de los lotes de quesos estudiados.

	AM	enterob	colifor	estafilo	microco	BAL	levadu	mohos
AM	1,0000	,5797	,5700	,7382	,3400	,8343	,4459	,6872
	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,028	p=,000	p=,003	p=,000
enterob	,5797	1,0000	,9518	,8522	,6115	,6023	,7735	,8527
	p=,000	p= ---	p=0,00	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
colifor	,5700	,9518	1,0000	,8589	,6746	,6189	,8465	,8463
	p=,000	p=0,00	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
estafilo	,7382	,8522	,8589	1,0000	,7008	,7333	,8031	,8889
	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
microco	,3400	,6115	,6746	,7008	1,0000	,4581	,7963	,6122
	p=,028	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,002	p=,000	p=,000
BAL	,8343	,6023	,6189	,7333	,4581	1,0000	,5346	,7662
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,002	p= ---	p=,000	p=,000
levadu	,4459	,7735	,8465	,8031	,7963	,5346	1,0000	,7546
	p=,003	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000
mohos	,6872	,8527	,8463	,8889	,6122	,7662	,7546	1,0000
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---

Resultados y Discusión

**Tabla 90.-** Correlaciones entre los elementos minerales y los recuentos microbiológicos.

	AM	enterob	colifor	estafilo	microco	BAL	levadu	mohos
Ca	-,4204 p=,006	-,6730 p=,000	-,6982 p=,000	-,6839 p=,000	-,6932 p=,000	-,5174 p=,000	-,7771 p=,000	-,6703 p=,000
P	-,7158 p=,000	-,8697 p=,000	-,8700 p=,000	-,8947 p=,000	-,6181 p=,000	-,7186 p=,000	-,7451 p=,000	-,8603 p=,000
Na	-,3547 p=,021	-,6611 p=,000	-,5844 p=,000	-,5502 p=,000	-,2563 p=,101	-,3014 p=,052	-,3467 p=,024	-,4177 p=,006
K	-,6655 p=,000	-,7896 p=,000	-,7838 p=,000	-,8025 p=,000	-,5343 p=,000	-,6373 p=,000	-,7057 p=,000	-,7770 p=,000
Mg	-,5905 p=,000	-,8110 p=,000	-,7726 p=,000	-,7478 p=,000	-,5092 p=,001	-,6355 p=,000	-,6715 p=,000	-,7688 p=,000
Mn	-,6979 p=,000	-,7529 p=,000	-,7713 p=,000	-,7904 p=,000	-,5803 p=,000	-,6822 p=,000	-,6289 p=,000	-,7779 p=,000
Fe	-,5973 p=,000	-,6260 p=,000	-,6064 p=,000	-,6349 p=,000	-,4614 p=,002	-,5784 p=,000	-,5327 p=,000	-,6267 p=,000
Zn	-,6227 p=,000	-,6447 p=,000	-,6254 p=,000	-,6731 p=,000	-,5060 p=,000	-,6107 p=,000	-,5149 p=,000	-,5991 p=,000
Cu	-,6235 p=,000	-,6394 p=,000	-,6486 p=,000	-,6962 p=,000	-,5408 p=,000	-,5964 p=,000	-,6770 p=,000	-,6081 p=,000

**Tabla 91.-** Correlaciones entre los elementos minerales.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
Ca	1,0000 p= ---	,6480 p=,000	,4078 p=,007	,6116 p=,000	,6854 p=,000	,6392 p=,000	,5129 p=,001	,4938 p=,001	,6903 p=,000
P	,6480 p=,000	1,0000 p= ---	,6214 p=,000	,7971 p=,000	,7935 p=,000	,8182 p=,000	,6464 p=,000	,6564 p=,000	,6614 p=,000
Na	,4078 p=,007	,6214 p=,000	1,0000 p= ---	,5521 p=,000	,6233 p=,000	,6399 p=,000	,4140 p=,006	,4931 p=,000	,4756 p=,001
K	,6116 p=,000	,7971 p=,000	,5521 p=,000	1,0000 p= ---	,7961 p=,000	,6858 p=,000	,5889 p=,000	,6213 p=,000	,6698 p=,000
Mg	,6854 p=,000	,7935 p=,000	,6233 p=,000	,7961 p=,000	1,0000 p= ---	,6847 p=,000	,6008 p=,000	,6290 p=,000	,6590 p=,000
Mn	,6392 p=,000	,8182 p=,000	,6399 p=,000	,6858 p=,000	,6847 p=,000	1,0000 p= ---	,5602 p=,000	,6090 p=,000	,7534 p=,000
Fe	,5129 p=,001	,6464 p=,000	,4140 p=,006	,5889 p=,000	,6008 p=,000	,5602 p=,000	1,0000 p= ---	,5321 p=,000	,4155 p=,006
Zn	,4938 p=,000	,6564 p=,000	,4931 p=,001	,6213 p=,000	,6290 p=,000	,6090 p=,000	,5321 p=,000	1,0000 p= ---	,4307 p=,004
Cu	,6903 p=,000	,6614 p=,000	,4756 p=,000	,6698 p=,000	,6590 p=,000	,7534 p=,000	,4155 p=,000	,4307 p=,004	1,0000 p= ---

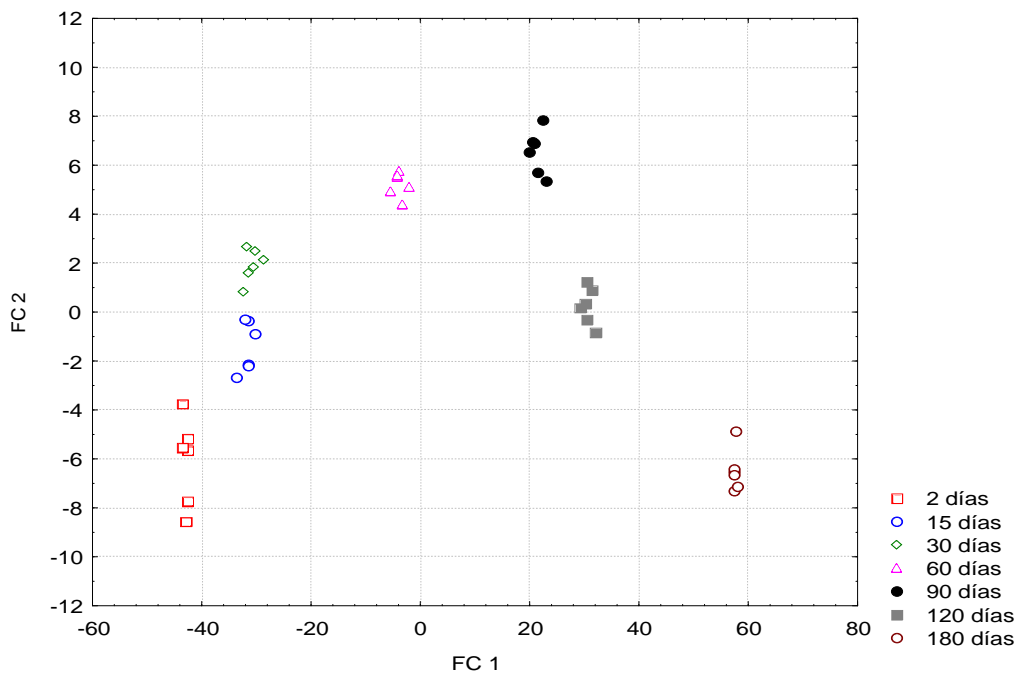
### IV.A.7.3.- ANÁLISIS DISCRIMINANTE.

#### IV.A.7.3.1.- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración.

En líneas generales, las variables que más capacidad discriminante presentaron fueron aquellas que presentaron una evolución más acusada durante los seis meses de maduración estudiados (grasa, ceniza, NS, NNP, Na, BAL, mohos, etc).

Con las funciones discriminantes se ha conseguido discriminar todos los quesos estudiados, cuya representación gráfica se recoge en la Figura 64.

**Figura 64.-** Representación gráfica de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones discriminante FC 1 y FC3.



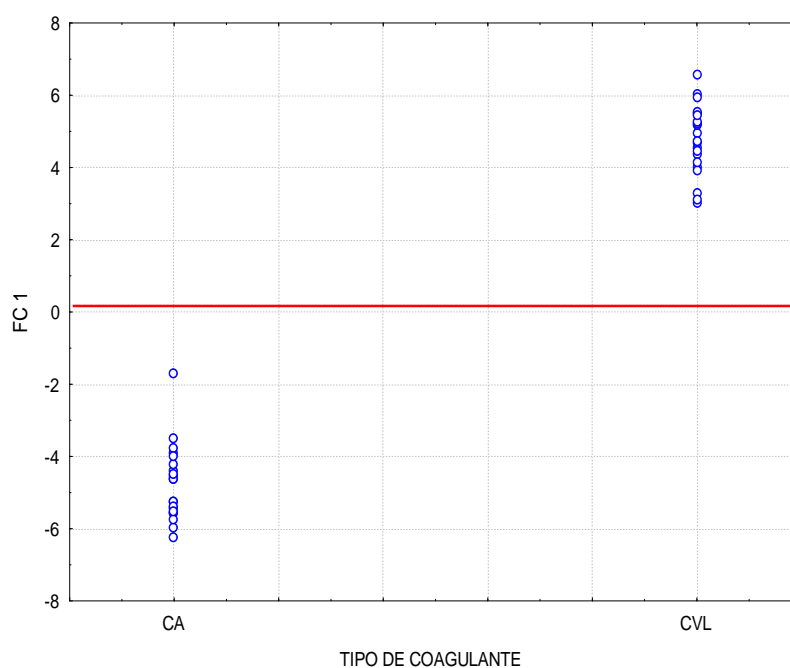
#### IV.A.7.3.2.- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante.

Al aplicar el análisis discriminante en relación al tipo de coagulante ensayado utilizando las variables físico-químicas, bioquímicas y microbiológicas se discriminaron perfectamente todos los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado.

El contenido de nitrógeno soluble fue la variable con mayor capacidad de discriminación entre los quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado.

Mediante la función canónica se representan en el diagrama de dispersión (Figura 65) los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado.

**Figura 65.-** Representación de los quesos en función del tipo de coagulante utilizado mediante las función canónica FC 1



## **IV.B.- QUESOS TIPO MANCHEGO ELABORADOS CON CUAJO ANIMAL Y CIPROSINA RECOMBINANTE.**

A continuación se muestran los resultados obtenidos de los análisis físico-químicos, bioquímicos y microbiológicos para los dos lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y los dos lotes obtenidos con cipsosina recombinante (CR) a los 2, 15, 30, 60, 90 y 120 días de maduración, así como la correspondiente discusión.

Los parámetros composicionales, fracciones nitrogenadas y recuentos microbiológicos se recogen en un artículo científico (apartado IV.B.1), y para los elementos minerales y ácidos grasos esterificados, se presenta una Tabla en la que se muestran los valores medios obtenidos para estos dos tipos de coagulantes ensayados y las desviaciones estándar de los grupos considerados, además de los resultados obtenidos en el test de comparación múltiple de medias para aquellos factores (tipo de coagulante ensayado y tiempo de maduración) que resultaron estadísticamente significativos (prueba de contraste de Tukey). En la última parte aparecen los resultados del análisis discriminante y del análisis de componentes principales.

#### **IV.B.1.- COMPOSICIÓN QUÍMICA, FRACCIONES NITROGENADAS Y RECuentOS MICROBIOLÓGICOS.**

El contenido de este apartado ha sido publicado en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2003), **51**, 7.426-7.430.





## **V.B.2.- ELEMENTOS MINERALES.**

### **IV.B.2.1.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE MACROMINERALES DEL QUESO A LO LARGO DE LA MADURACIÓN.**

En las Tablas 92, 93, 94, 95 Y 96 y en las Figuras 66, 67, 68, 69 y 70 se recogen los contenidos de calcio, fósforo, sodio, potasio y magnesio, respectivamente, expresados como mg/100 g de queso, de los lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y cipsosina recombinante (CR) a lo largo de la maduración.

En la Tabla 97 y Figura 71, se presentan los contenidos medios de macrominerales en función de la materia seca del queso (mg/100 g de materia seca de queso) y la relación Ca/P de los quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos con cipsosina recombinante a lo largo de la maduración.

El tiempo de maduración afectó significativamente ( $p < 0,001$ ) a los contenidos de todos los macrominerales estudiados, excepto para el Mg que fue  $p < 0,05$ , observándose una evolución ascendente a lo largo del período de maduración considerado.

Por otra parte no se han detectado diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los contenidos de elementos minerales mayoritarios de los quesos elaborados con cuajo animal y los obtenidos mediante cipsosina recombinante, coincidiendo con los resultados obtenidos en el correspondiente apartado anterior (IV.A.4.1)

En todos los macrominerales estudiados se han detectado diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los dos tipos de coagulantes ensayados cuando se expresaron en función de la materia seca, presentando los quesos elaborados con cuajo animal valores de macrominerales, expresados según la materia seca, superiores a los quesos coagulados con cipsosina recombinante. Posiblemente el efecto del tipo de coagulante ensayado sobre los contenidos de macrominerales en función de la materia seca sea de tipo matemático, al presentar los lotes de quesos elaborados con cipsosina recombinante contenidos en humedad significativamente

### Resultados y Discusión

inferiores ( $p < 0,001$ ) a los de los quesos elaborados con cuajo animal (apartado IV.B.1).

Aunque Sanjuán *et al.* (1998) sugieren que en los quesos elaborados con coagulante vegetal se produce una menor retención de Ca y P debido a que el tiempo de coagulación de la leche es más alto. Como en el caso anterior (apartado IV.A.4.1), este fenómeno no pudo tener lugar en la presente memoria puesto que el tiempo de coagulación para el cuajo animal y para las cipsosina recombinante fue muy similar.

Cuando los contenidos de macrominerales se expresaron en función de la materia seca (Tabla 97), se observa una disminución en los contenidos de calcio a lo largo de la maduración. Los contenidos de sodio de los quesos estudiados aumentaron durante el período de maduración estudiado, al igual que cuando los valores se expresaban en función del queso. Los demás macrominerales no mostraron ninguna evolución a lo largo del período de maduración considerado.

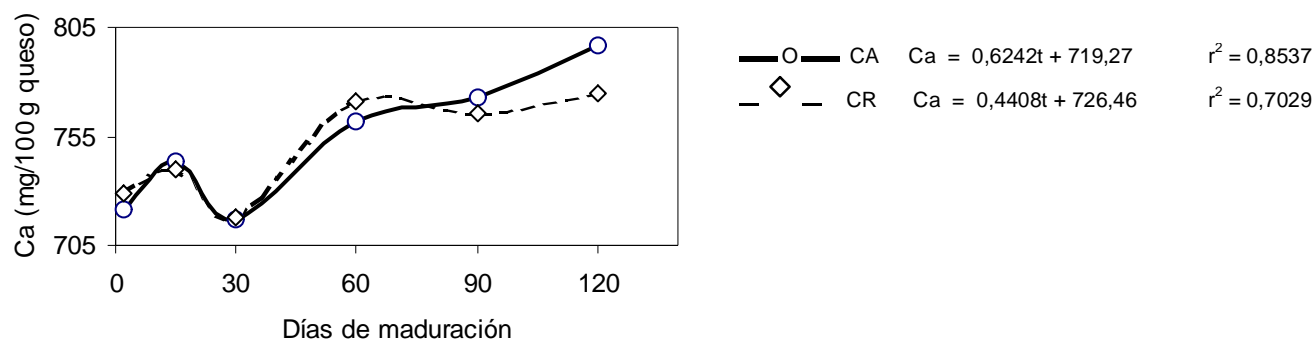
El cociente Ca/P disminuye durante el período madurativo considerado (Figura 71), no habiéndose detectado diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre la relación Ca/P de los quesos elaborados con cuajo animal y los quesos obtenidos con cipsosina recombinante.

**Tabla 92.-** Evolución del contenido en calcio (mg /100 g de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y cipsosina recombinante (CR) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
CA						
Lote CA1	711	742	728	776	790	810
Lote CA2	732	745	705	747	756	784
x ± sd	722 ± 15 <sup>ab</sup>	744 ± 2 <sup>abc</sup>	717 ± 16 <sup>a</sup>	762 ± 21 <sup>bcd</sup>	773 ± 24 <sup>cd</sup>	797 ± 18 <sup>d</sup>
CR						
LoteCR1	720	719	714	778	782	790
Lote CR2	738	760	721	764	750	760
x ± sd	729 ± 13 <sup>ab</sup>	740 ± 29 <sup>abc</sup>	718 ± 5 <sup>a</sup>	771 ± 10 <sup>bcd</sup>	766 ± 23 <sup>cd</sup>	775 ± 21 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Figura 66.** Evolución del contenido en calcio de los quesos a lo largo de la maduración.



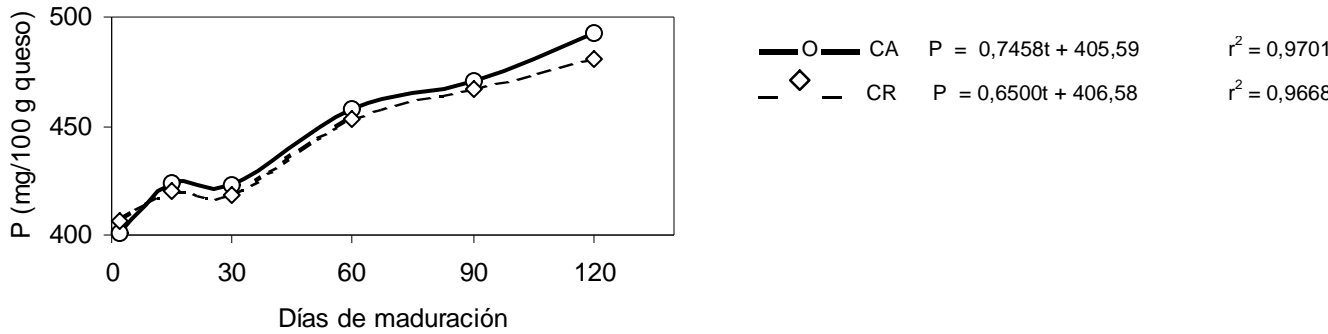
**Tabla 93.-** Evolución del contenido en fósforo (mg /100 g de queso) de quesos elaborados con coagulante recombinate (CR) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
Lote CA1	388	408	415	456	462
Lote CA2	413	440	430	460	480
x ± sd	401 ± 18 <sup>a</sup>	424 ± 23 <sup>abc</sup>	423 ± 11 <sup>abc</sup>	458 ± 3 <sup>abcd</sup>	471 ± 13 <sup>b</sup>
CR					
LoteCR1	395	406	406	445	474
Lote CR2	418	434	430	461	460
x ± sd	407 ± 16 <sup>a</sup>	420 ± 20 <sup>ab</sup>	418 ± 17 <sup>ab</sup>	453 ± 11 <sup>abcd</sup>	467 ± 10 <sup>b</sup>

<sup>a-d</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

262

**Figura 67.** Evolución del contenido en fósforo de los quesos a lo largo de la maduración.



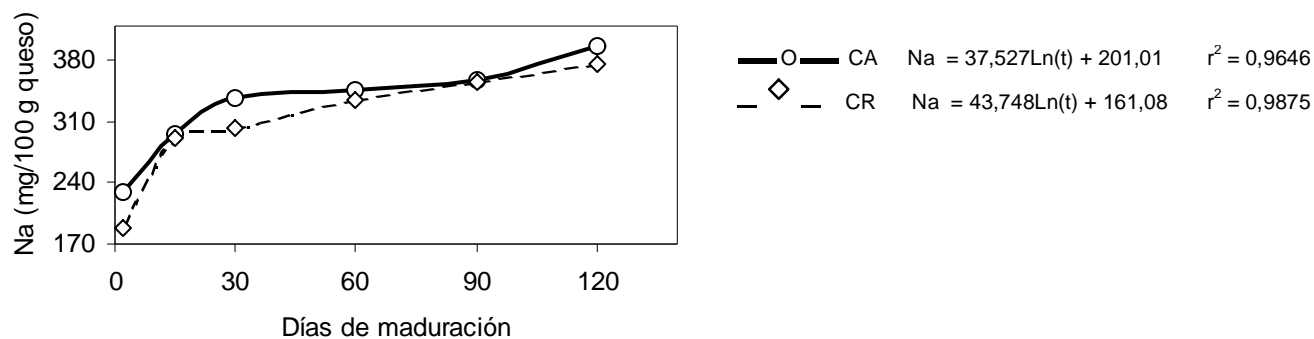
**Tabla 94.-** Evolución del contenido en sodio (mg /100 g de queso) de quesos elaborados con coagulante recombinante (CR) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
Lote CA1	177	268	372	327	344
Lote CA2	280	325	304	366	370
x ± sd	229 ± 73 <sup>ab</sup>	297 ± 40 <sup>abc</sup>	338 ± 48 <sup>bc</sup>	347 ± 28 <sup>bc</sup>	357 ± 18 <sup>b</sup>
CR					
LoteCR1	176	284	315	359	338
Lote CR2	201	300	291	311	371
x ± sd	189 ± 18 <sup>a</sup>	292 ± 11 <sup>abc</sup>	303 ± 17 <sup>abc</sup>	335 ± 34 <sup>bc</sup>	355 ± 23 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

263

**Figura 68.** Evolución del contenido en sodio de los quesos a lo largo de la maduración.



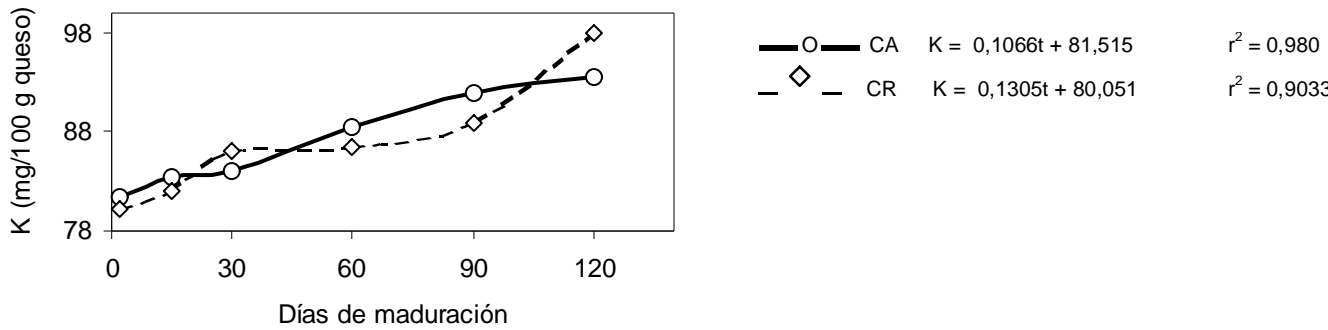
**Tabla 95.-** Evolución del contenido en potasio (mg /100 g de queso) de quesos elaborados con coagulante recombinate (CR) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
Lote CA1	80	81	84	86	88
Lote CA2	83	86	84	91	96
x ± sd	82 ± 2 <sup>ab</sup>	83 ± 3 <sup>abc</sup>	84 ± 0 <sup>abc</sup>	89 ± 4 <sup>abcd</sup>	92 ± 6 <sup>bcd</sup>
CR					
LoteCR1	82	83	88	85	87
Lote CR2	78	81	84	88	91
x ± sd	80 ± 3 <sup>a</sup>	82 ± 1 <sup>abc</sup>	86 ± 3 <sup>abc</sup>	87 ± 2 <sup>abcd</sup>	89 ± 3 <sup>abc</sup>

<sup>a-d</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

264

**Figura 69.** Evolución del contenido en potasio de los quesos a lo largo de la maduración.



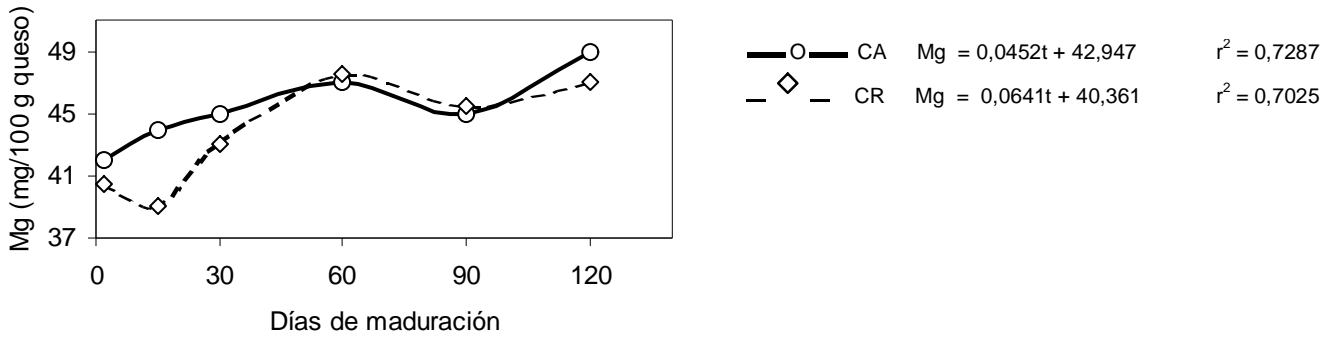
**Tabla 96.-** Evolución del contenido en magnesio (mg /100 g de queso) de quesos elaborados con coagulante recombinate (CR) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
Lote CA1	43	42	46	46	44
Lote CA2	41	46	44	48	46
x ± sd	42 ± 1 <sup>abc</sup>	44 ± 3 <sup>abc</sup>	45 ± 1 <sup>abc</sup>	47 ± 1 <sup>bc</sup>	45 ± 1 <sup>abc</sup>
CR					
LoteCR1	42	40	44	48	45
Lote CR2	39	38	42	47	46
x ± sd	41 ± 2 <sup>ab</sup>	39 ± 1 <sup>a</sup>	43 ± 1 <sup>abc</sup>	48 ± 1 <sup>bc</sup>	46 ± 1 <sup>abc</sup>

<sup>a-c</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes (p<0,05).

265

**Figura 70.** Evolución del contenido en magnesio de los quesos a lo largo de la maduración.

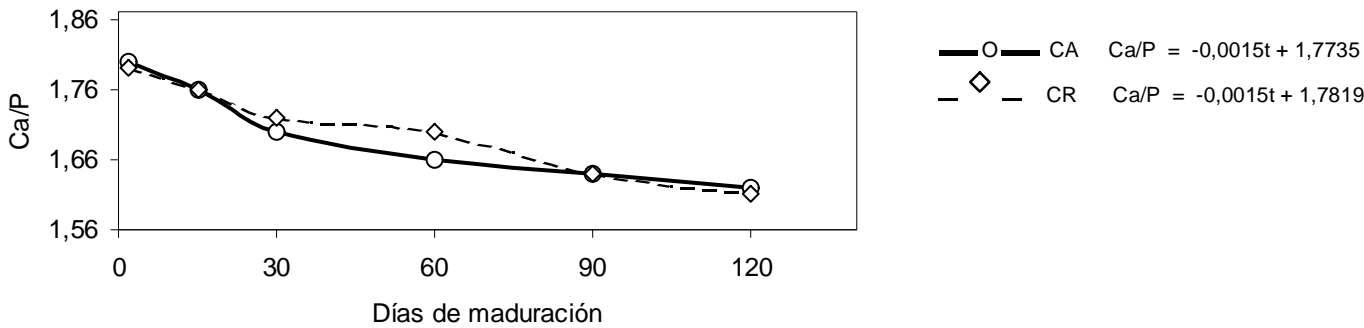




**Tabla 97.-** Contenidos medios de macrominerales (mg/100 g MS queso) de quesos elaborados con  $\alpha$ -caseína recombinante (CR) durante la maduración.

	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
Ca	1.186 ± 16	1.179 ± 6	1.158 ± 8	1.147 ± 34	1.136 ± 39
P	658 ± 24	672 ± 37	683 ± 28	690 ± 3	692 ± 17
Na	375 ± 117	470 ± 65	546 ± 69	522 ± 40	525 ± 25
K	134 ± 3	132 ± 6	136 ± 2	133 ± 5	135 ± 8
Mg	69 ± 3	70 ± 5	73 ± 1	71 ± 2	66 ± 2
Ca/P	1,80 ± 0,04	1,76 ± 0,09	1,70 ± 0,08	1,66 ± 0,06	1,64 ± 0,10
CR					
Ca	1.149 ± 14	1.136 ± 28	1.094 ± 18	1.091 ± 7	1.074 ± 43
P	641 ± 22	645 ± 21	637 ± 11	641 ± 20	655 ± 21
Na	297 ± 26	449 ± 11	462 ± 37	474 ± 45	497 ± 27
K	126 ± 5	126 ± 4	131 ± 7	122 ± 4	125 ± 3
Mg	64 ± 4	60 ± 3	66 ± 4	67 ± 1	64 ± 0
Ca/P	1,79 ± 0,04	1,76 ± 0,01	1,72 ± 0,06	1,70 ± 0,06	1,64 ± 0,01

**Figura 71.** Evolución de la relación Ca/P de los quesos a lo largo de la maduración.



#### IV.B.2.2.- EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO DE MICROMINERALES DEL QUESO A LO LARGO DE LA MADURACIÓN.

En las Tablas 98, 99, 100 y 101 y las Figuras 72, 73, 74 y 75 se presentan los contenidos de manganeso, hierro, cinc y cobre, expresados como  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso, de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) de los obtenidos con cipsosina recombinante (CR) durante los 4 meses de maduración estudiados.

En la Tabla 102 se presentan los contenidos (valores medios) de los cuatro microminerales estudiados en función de la materia seca del queso ( $\mu\text{g}/100\text{ g MS}$  queso) de los quesos elaborados con cuajo animal y con cipsosina recombinante a lo largo de la maduración y la representación gráfica se recoge en la Figura 76.

Los valores de microminerales de los quesos elaborados con cuajo animal fueron similares a los quesos fabricados con cipsosina recombinante, no estableciéndose diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ).

El tiempo de maduración modificó significativamente ( $p<0,001$ ) los contenidos de elementos minerales minoritarios de los quesos estudiados, observándose una evolución ascendente durante el período de maduración.

Cuando los valores de los elementos minerales minoritarios se expresaron en función de la materia seca, el tipo de coagulante ensayado influyó significativamente ( $p<0,05$ ), presentando los quesos elaborados con cuajo animal valores de microminerales significativamente superiores ( $p<0,05$ ) a los de los quesos elaborados con cipsosina recombinante, posiblemente por un efecto matemático, como en el caso anterior (apartado IV.B.2.1). El tiempo de maduración no afectó significativamente ( $p>0,05$ ) a los valores de microminerales, expresados en función de la materia seca, del presente trabajo.

La relación Zn/Cu mostró una evolución muy irregular a lo largo de la maduración (Figura 76), sin que se influyeran significativamente ( $p>0,05$ ) ni por el tipo de coagulante ni por el tiempo de maduración.

Como se ha comentado anteriormente, en los lotes de quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado tampoco se observaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en las tasas de elementos minerales minoritario (manganeso, hierro, cinc y cobre), presentando unos contenidos similares los quesos elaborado con ambos tipos de coagulantes ensayados (apartado IV.A.4.1).

## Resultados y Discusión

En un estudio realizado sobre el queso de Los Pedroches, Tejada (2001) no detectó diferencias significativas entre los contenidos de elementos minerales minoritarios de los quesos elaborados con cuajo animal con respecto de los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado, ni tampoco entre los lotes elaborados con coagulante vegetal fresco y los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado.

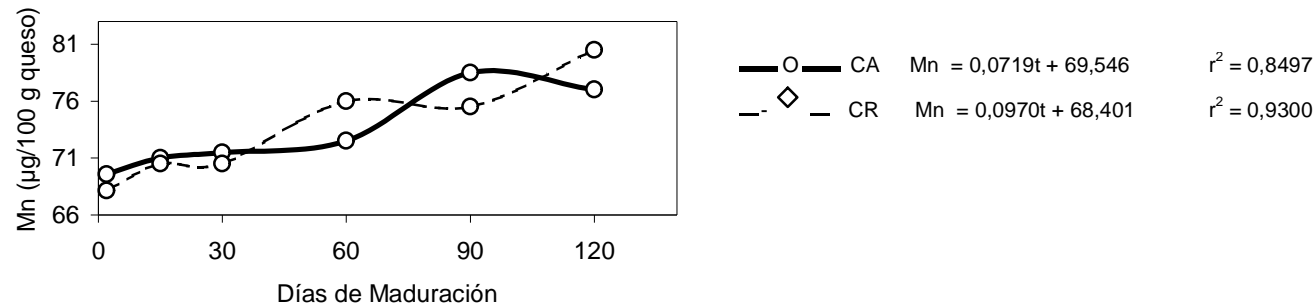
**Tabla 98.-** Evolución de contenido en manganeso ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y cipsosina recombinante (CR) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración					
Coagulante	2	15	30	60	90	120
CA						
Lote CA1	63	73	73	74	77	75
Lote CA2	76	69	70	71	80	79
x $\pm$ sd	70 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	71 $\pm$ 3 <sup>ab</sup>	72 $\pm$ 2 <sup>abc</sup>	73 $\pm$ 2 <sup>abc</sup>	79 $\pm$ 2 <sup>bc</sup>	77 $\pm$ 3 <sup>c</sup>
CR						
LoteCR1	67	70	72	75	76	82
Lote CR2	69	71	69	77	75	79
x $\pm$ sd	68 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	71 $\pm$ 9 <sup>ab</sup>	71 $\pm$ 2 <sup>abc</sup>	76 $\pm$ 1 <sup>abc</sup>	76 $\pm$ 1 <sup>bc</sup>	81 $\pm$ 2 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup>Medias sin superíndices comunes son estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

269

**Figura 72.** Evolución del contenido en manganeso de los quesos a lo largo de la maduración



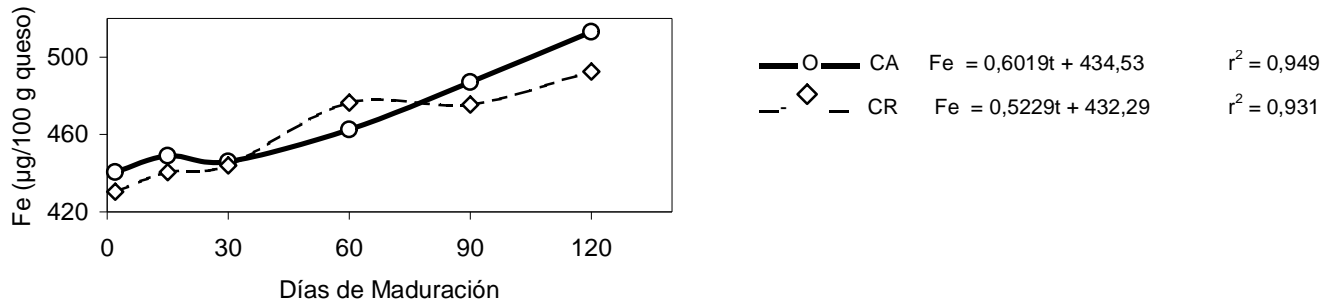
**Tabla 99.-** Evolución de contenido en hierro ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CR) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
Lote CA1	451	456	457	446	472
Lote CA2	430	442	435	479	502
x $\pm$ sd	441 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	449 $\pm$ 10 <sup>sb</sup>	446 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>	463 $\pm$ 23 <sup>abc</sup>	487 $\pm$ 21 <sup>b</sup>
CR					
Lote CR1	444	434	441	487	492
Lote CR2	417	447	447	466	459
x $\pm$ sd	431 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	441 $\pm$ 9 <sup>sb</sup>	444 $\pm$ 4 <sup>ab</sup>	477 $\pm$ 15 <sup>abc</sup>	476 $\pm$ 23 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

270

**Figura 73.** Evolución del contenido en hierro de los quesos a lo largo de la maduración.



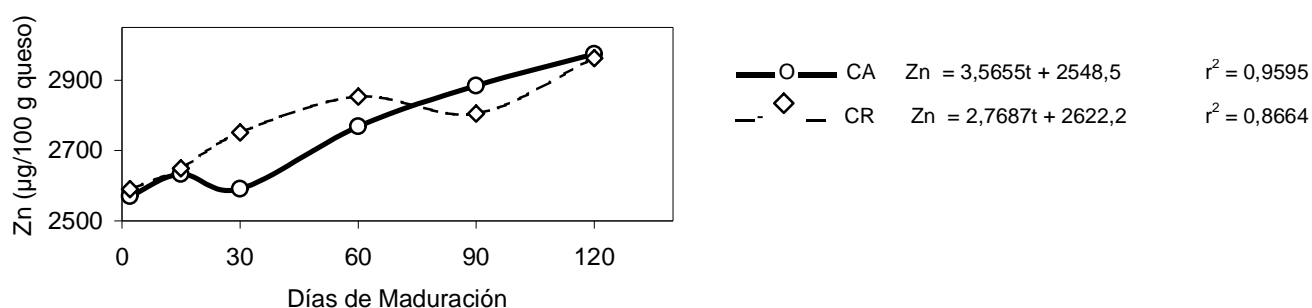
**Tabla 100.-** Evolución de contenido en cinc ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de queso) de quesos elaborados con cuajo animal (CR) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
Lote CA1	2.590	2.681	2.597	2.777	2.894
Lote CA2	2.550	2.586	2.585	2.760	2.875
x $\pm$ sd	2.570 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	2.633 $\pm$ 67 <sup>abc</sup>	2.591 $\pm$ 8 <sup>ab</sup>	2.769 $\pm$ 12 <sup>bcd</sup>	2.885 $\pm$ 13 <sup>cde</sup>
CR					
Lote CR1	2.664	2.686	2.712	2.810	2.824
Lote CR2	2.516	2.612	2.790	2.896	2.786
x $\pm$ sd	2.590 $\pm$ 105 <sup>ab</sup>	2.649 $\pm$ 52 <sup>abc</sup>	2.751 $\pm$ 55 <sup>abcd</sup>	2.853 $\pm$ 61 <sup>de</sup>	2.805 $\pm$ 27 <sup>de</sup>

<sup>a-e</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

271

**Figura 74.** Evolución del contenido en cinc de los quesos a lo largo de la maduración.



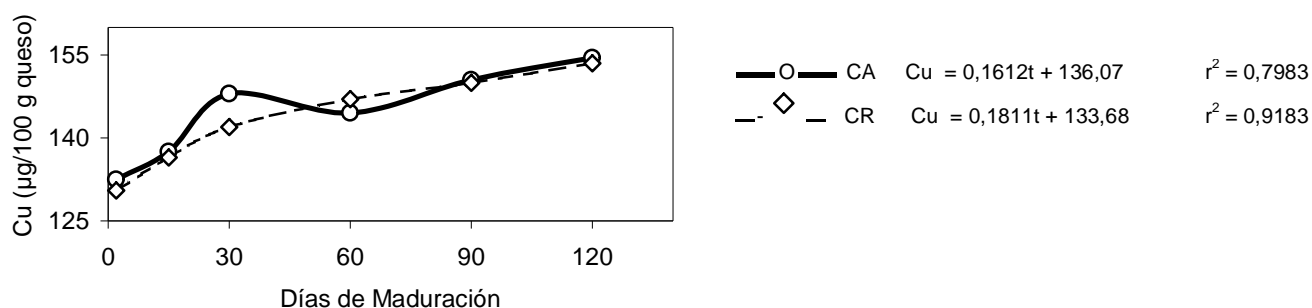
**Tabla 101.-** Evolución de contenido en cobre ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  de queso) de quesos elaborados con coagulante recombinate (CR) a lo largo de la maduración.

Coagulante	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
CA	129	133	151	148	154
Lote CA1	136	142	145	141	147
Lote CA2	$133 \pm 5^{ab}$	$138 \pm 6^{abc}$	$148 \pm 4^{abc}$	$145 \pm 5^{abc}$	$151 \pm 5^{bc}$
$\bar{x} \pm \text{sd}$					
CR	134	139	145	144	152
Lote CR1	127	134	139	150	148
Lote CR2	$131 \pm 5^{ab}$	$137 \pm 4^{abc}$	$142 \pm 4^{abc}$	$147 \pm 4^{abc}$	$150 \pm 3^{bc}$

<sup>a-c</sup> Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

272

**Figura 75.** Evolución del contenido en cobre de los quesos a lo largo de la maduración.

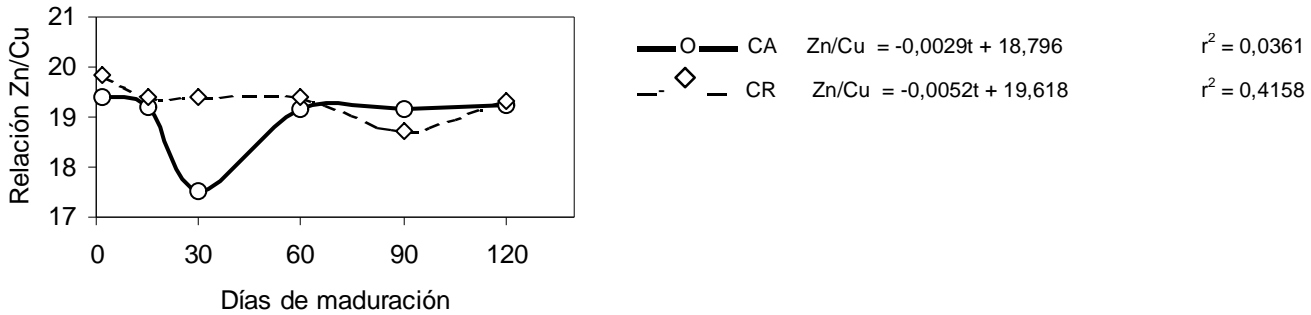


**Tabla 102.-** Contenidos medios de microminerales ( $\mu\text{g}/100\text{ g MS queso}$ ) de quesos elaborados con recombinate (CR) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración				
	2	15	30	60	90
CA					
Mn	114 $\pm$ 15	113 $\pm$ 4	116 $\pm$ 2	109 $\pm$ 3	115 $\pm$ 3
Fe	724 $\pm$ 30	712 $\pm$ 14	721 $\pm$ 14	696 $\pm$ 34	716 $\pm$ 29
Zn	4.224 $\pm$ 77	4.175 $\pm$ 97	4.189 $\pm$ 53	4.168 $\pm$ 28	4.239 $\pm$ 33
Cu	218 $\pm$ 7	218 $\pm$ 11	239 $\pm$ 3	218 $\pm$ 8	221 $\pm$ 8
Zn/Cu	19,41 $\pm$ 0,94	19,18 $\pm$ 1,38	17,51 $\pm$ 0,44	19,17 $\pm$ 0,57	19,18 $\pm$ 0,54
CR					
Mn	107 $\pm$ 1	108 $\pm$ 0	108 $\pm$ 6	108 $\pm$ 3	106 $\pm$ 2
Fe	679 $\pm$ 33	677 $\pm$ 5	677 $\pm$ 10	674 $\pm$ 16	667 $\pm$ 40
Zn	4.083 $\pm$ 185	4.071 $\pm$ 138	4.194 $\pm$ 15	4.037 $\pm$ 113	3.932 $\pm$ 80
Cu	206 $\pm$ 9	210 $\pm$ 8	217 $\pm$ 12	208 $\pm$ 7	210 $\pm$ 6
Zn/Cu	19,85 $\pm$ 0,05	19,41 $\pm$ 0,12	19,39 $\pm$ 0,97	19,41 $\pm$ 0,15	18,70 $\pm$ 0,17

273

**Figura 76.** Evolución de la relación Zn/Cu de los quesos a lo largo de la maduración.





#### IV.B.2.3.- ANALISIS DISCRIMINANTE.

##### IV.B.2.3.1.- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración.

Uno de los objetivos de este análisis discriminante es determinar las variables con mayor capacidad de diferenciación de los seis períodos de maduración estudiados. En la Tabla 103 se presentan los valores de Lambda de Wilks y valores F de los minerales determinados. El sodio, calcio y cinc fueron las variables que mayor capacidad discriminante presentaron entre los distintos intervalos de maduración considerados. Por otra parte los contenidos de manganeso, hierro y fósforo fueron las variables que menos capacidad discriminante mostraron entre los 6 intervalos de maduración considerados.

**Tabla 103.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
Lambda de Wilks	0,41	0,74	0,38	0,48	0,51	0,89	0,72	0,42	0,66
Valor F	2,88	0,72	3,25	2,18	1,88	0,24	0,77	2,81	1,04

En la Tabla 104 se muestran las distancias de los cuadrados de Mahalanobis entre grupos. Los grupos que presentaron las mínimas distancias fueron los quesos de 2 y 15 días, y las máximas distancias entre los 2 y 120 días de maduración.

**Tabla 104.-** Distancias entre grupos de los cuadrados de Mahalanobis.

	2	15	30	60	90	120
2	0,0	26,9	69,8	147,0	170,9	317,8
15	26,9	0,0	21,4	64,1	82,0	195,3
30	69,8	21,4	0,0	60,4	76,6	187,5
60	147,0	64,1	60,4	0,0	12,0	51,6
90	170,9	82,0	76,6	12,0	0,0	27,2
120	317,8	195,3	187,5	51,6	27,2	0,0

A partir de las funciones discriminantes se obtuvo la matriz de clasificación (Tabla 105), en la cual aparecen correctamente clasificadas todos los quesos

### Resultados y Discusión

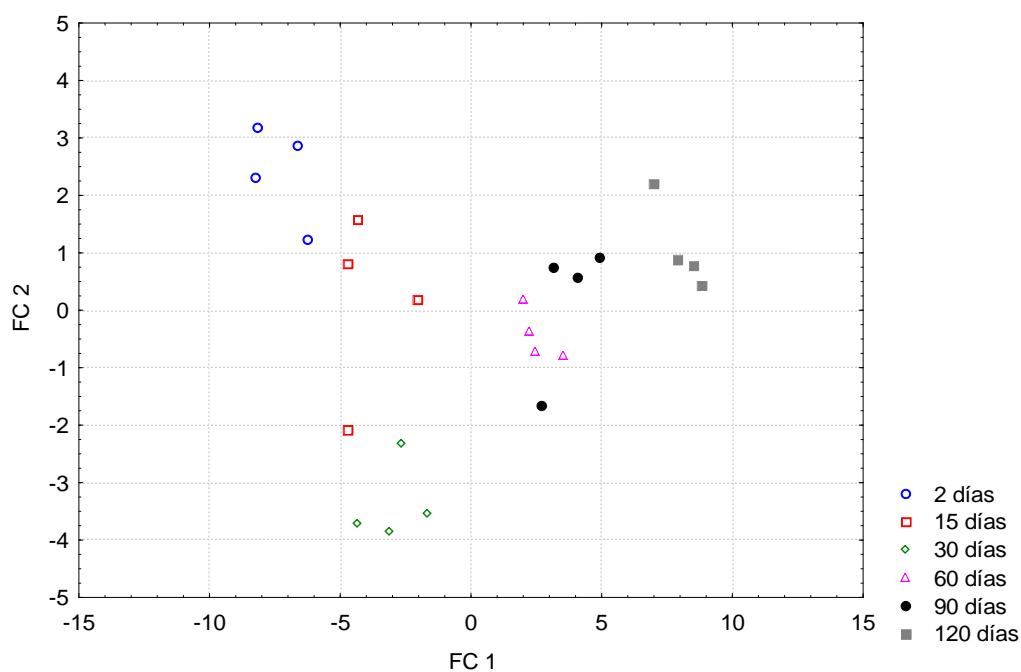
estudiados, excepto un queso con 90 días de maduración que fue clasificado en el intervalo de los 60 días de maduración.

**Tabla 105.-** Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones clasificación.

	Correcto (%)	2	15	30	60	90	120
2	100	4	0	0	0	0	0
15	100	0	4	0	0	0	0
30	100	0	0	4	0	0	0
60	100	0	0	0	4	0	0
90	75	0	0	0	1	3	0
120	100	0	0	0	0	0	4
Total Correcto	96	4	4	4	5	3	4

Mediante las dos primeras funciones discriminantes se representan en el diagrama de dispersión (Figura 77) los quesos de 2, 15, 30, 60, 90 y 120 días.

**Figura 77.** Representación de los quesos elaborados en función del tiempo de maduración mediante las funciones de clasificación.



#### **IV.B.2.3.2.- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante.**

Con objeto de obtener mejores porcentajes de clasificación de los quesos se han seleccionado para el análisis discriminante los contenidos en los diferentes minerales estudiados expresados en función de la materia seca, ya que estos presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos tipos de coagulantes en el análisis de la varianza.

En la Tabla 106 se muestran los valores de Lambda de Wilks y valores F de los elementos minerales determinados. Los contenidos de magnesio, sodio y potasio, expresados en función de la materia seca, fueron las variables con mayor capacidad discriminante de los dos tipos de coagulante ensayados.

**Tabla 106.-** Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
Lambda de Wilks	0,94	0,98	0,68	0,80	0,65	0,92	0,99	0,77	0,84
Valor F	0,87	0,24	6,60	3,44	7,52	1,30	0,13	4,10	2,73

En la Tabla 107 se presenta la matriz de clasificación. Con las funciones de clasificación obtenidas se clasificaron correctamente el 100 % de los quesos.

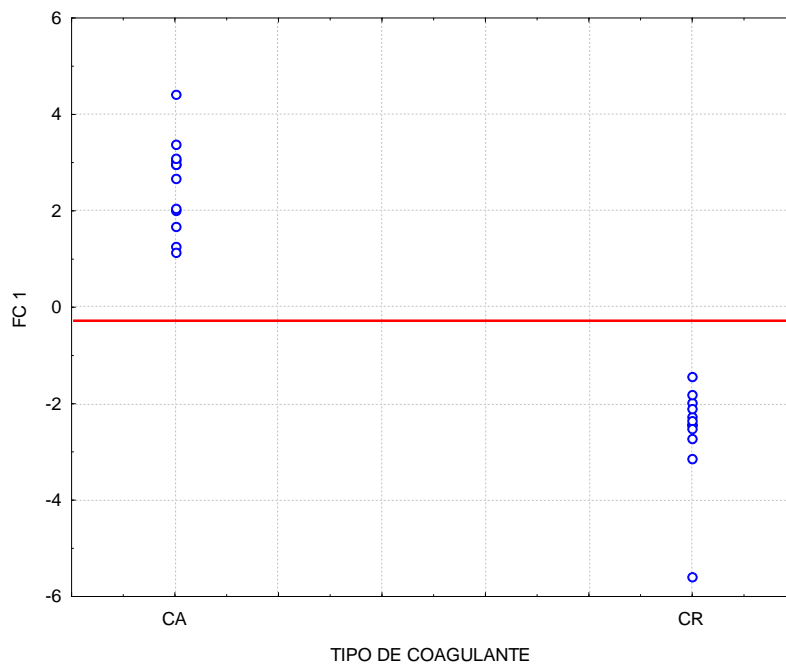
**Tabla 107.-** Número de quesos correctamente clasificados mediante la función de clasificación.

	Correcto (%)	CA	CR
CA	100	12	0
CR	100	0	12
Total	100	12	12

## Resultados y Discusión

Mediante la función canónica FC 1 se obtiene el diagrama de dispersión de los quesos elaborados con cuajo animal y cipsosina recombinante (Figura 76).

**Figura 76.** Representación de los quesos elaborados en función del tipo de coagulante ensayado mediante la función de clasificación.



### **IV.B.3.- ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.**

#### **IV.B.3.1.- EVOLUCIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS A LO LARGO DE LA MADURACIÓN.**

Los porcentajes relativos, respecto al 100 % total, de los 13 ácidos grasos esterificados detectados mediante la técnica analítica de cromatografía gaseosa en los dos lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y los dos lotes elaborados con cipsosina recombinante (CR), a lo largo de los cuatro meses de maduración, se presentan en las Tablas 108, 109, 110 y 111.

En las Tablas 112 y 113 se presentan los valores medios y desviaciones estándar de los porcentajes de los 13 ácidos grasos esterificados de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con cipsosina recombinante (CR) a lo largo del tiempo de maduración. Además se muestran los valores correspondientes a los tres grupos de ácidos grasos principales:

- Cadena corta:  $C_{4:0} + C_{6:0} + C_{8:0}$
- Cadena media:  $C_{10:0} + C_{12:0} + C_{14:0}$
- Cadena larga:  $C_{15:0} + C_{16:0} + C_{16:1} + C_{18:0} + C_{18:1} + C_{18:2} + C_{18:3}$

Como en el caso anterior (apartado IV.A.5.1), no se han detectado diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes de ácidos grasos esterificados elaborados con cuajo animal y los elaborados con cipsosina recombinante, ni entre los porcentajes de AGE a los seis periodos de maduración considerados. Por este motivo no se ha estimado conveniente establecer una relación entre variables ni aplicar el análisis discriminante.

Resultados y Discusión

**Tabla 108.-** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con cuajo animal (CA1) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0	3,29	3,17	2,89	4,09	4,19	2,88
C6:0	3,61	3,49	3,09	3,40	3,25	3,89
C8:0	3,41	3,28	3,26	3,15	3,02	3,51
C10:1	0,22	0,21	0,22	0,27	0,27	0,23
C10:0	7,88	8,52	8,44	8,59	8,33	9,40
C12:0	3,83	3,70	4,46	4,56	4,46	5,00
C13:0	0,09	0,11	0,11	0,10	0,10	0,14
C14:0i	0,25	0,20	0,23	0,22	0,21	0,17
C14:1	0,14	0,16	0,21	0,17	0,18	0,19
C14:0	9,01	8,79	10,54	9,96	9,90	9,81
C15:0i	0,26	0,22	0,29	0,26	0,27	0,29
C15:1	0,55	0,59	0,53	0,50	0,50	0,55
C15:0	1,02	1,09	1,05	1,08	1,00	0,99
C16:0i	0,44	0,33	0,29	0,31	0,33	0,27
C16:1	0,79	0,77	0,93	0,81	0,84	0,71
C16:0	24,70	25,09	24,75	24,44	24,06	25,01
C17:0i	0,35	0,35	0,36	0,41	0,35	0,31
C17:1	0,47	0,46	0,47	0,54	0,45	0,39
C17:0	0,65	0,61	0,63	0,63	0,61	0,51
C18:2	2,99	2,94	2,40	2,60	2,71	2,74
C18:1	18,72	18,47	18,62	18,81	18,81	18,80
C18:3	4,62	4,70	4,15	4,09	4,31	3,04
C18:0	11,08	11,06	10,77	9,62	10,37	9,96
C19:0	0,90	0,95	0,85	0,79	0,82	0,88
C20:1	0,13	0,14	0,12	0,09	0,11	0,10
C20:0	0,12	0,13	0,09	0,07	0,09	0,06
C21:1	0,22	0,22	0,18	0,15	0,17	0,14
C21:0	0,28	0,27	0,08	0,29	0,30	0,04

*Resultados y Discusión*

**Tabla 109.-** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con cuajo animal (CA2) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0	2,87	4,41	4,53	3,86	3,17	3,55
C6:0	2,88	3,36	3,96	3,04	3,68	3,10
C8:0	3,49	3,03	3,15	2,79	3,19	2,99
C10:1	0,23	0,26	0,36	0,25	0,35	0,27
C10:0	8,33	8,28	8,48	7,79	8,29	8,78
C12:0	4,26	4,46	4,49	4,28	4,83	4,86
C13:0	0,14	0,14	0,17	0,10	0,09	0,17
C14:0i	0,17	0,29	0,31	0,20	0,31	0,22
C14:1	0,16	0,18	0,19	0,18	0,21	0,26
C14:0	9,90	9,04	8,81	9,71	10,17	10,62
C15:0i	0,36	0,26	0,32	0,26	0,29	0,34
C15:1	0,56	0,59	0,51	0,59	0,50	0,54
C15:0	1,01	1,03	1,04	1,00	1,01	1,08
C16:0i	0,31	0,27	0,23	0,31	0,41	0,40
C16:1	0,84	1,09	0,90	0,82	1,03	0,91
C16:0	25,39	25,23	25,25	24,80	25,11	24,81
C17:0i	0,46	0,46	0,39	0,44	0,35	0,42
C17:1	0,47	0,64	0,35	0,44	0,46	0,49
C17:0	0,60	0,66	0,65	0,60	0,64	0,64
C18:2	2,56	2,25	1,78	2,88	2,73	2,21
C18:1	18,35	18,42	18,83	18,53	18,40	18,34
C18:3	4,49	3,70	3,81	4,41	3,95	3,95
C18:0	10,83	9,91	9,51	10,29	9,42	9,51
C19:0	0,83	0,89	1,00	0,84	0,83	0,87
C20:1	0,10	0,22	0,35	0,26	0,00	0,08
C20:0	0,19	0,17	0,12	0,85	0,00	0,18
C21:1	0,23	0,28	0,23	0,17	0,08	0,37
C21:0	0,00	0,45	0,23	0,27	0,47	0,00

Resultados y Discusión

**Tabla 110.-** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con cipsosina recombinante (CR1) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0	3,00	3,72	2,90	3,59	3,74	3,96
C6:0	3,23	3,11	3,49	3,06	3,76	3,34
C8:0	3,88	3,10	3,36	3,10	3,44	3,55
C10:1	0,23	0,26	0,22	0,28	0,32	0,31
C10:0	8,91	8,18	8,00	8,82	8,59	8,82
C12:0	3,45	4,59	4,22	4,12	4,17	3,97
C13:0	0,14	0,17	0,10	0,18	0,13	0,16
C14:0i	0,23	0,25	0,24	0,35	0,20	0,24
C14:1	0,25	0,18	0,19	0,25	0,22	0,26
C14:0	10,37	10,60	10,46	9,68	10,15	9,95
C15:0i	0,32	0,40	0,29	0,37	0,31	0,28
C15:1	0,56	0,58	0,54	0,55	0,56	0,52
C15:0	1,08	1,07	1,00	1,05	1,00	1,03
C16:0i	0,36	0,41	0,29	0,29	0,32	0,34
C16:1	0,90	0,91	0,96	0,96	0,90	0,90
C16:0	24,55	24,40	24,33	25,96	24,92	24,36
C17:0i	0,32	0,37	0,36	0,41	0,36	0,37
C17:1	0,38	0,41	0,48	0,53	0,44	0,42
C17:0	0,67	0,61	0,65	0,66	0,60	0,64
C18:2	3,12	2,46	2,37	2,24	2,37	2,20
C18:1	18,60	18,22	18,44	18,28	18,77	18,43
C18:3	3,47	4,01	4,22	4,07	3,97	4,16
C18:0	10,10	10,43	10,98	9,97	9,53	10,64
C19:0	0,82	1,03	1,00	0,86	0,77	0,81
C20:1	0,10	0,22	0,16	0,15	0,08	0,00
C20:0	0,16	0,00	0,10	0,00	0,07	0,14
C21:1	0,54	0,15	0,45	0,16	0,15	0,10
C21:0	0,29	0,16	0,17	0,07	0,16	0,07



Resultados y Discusión

**Tabla 111.** Composición de ácidos grasos esterificados (% del total) de quesos elaborados con cipsosina recombinante (CR2) a lo largo de la maduración.

	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0	3,74	4,11	3,59	3,56	4,69	3,73
C6:0	2,99	3,22	3,17	2,89	3,68	3,93
C8:0	2,85	3,01	2,87	2,73	3,37	3,47
C10:1	0,27	0,28	0,31	0,25	0,31	0,32
C10:0	8,33	8,77	8,49	8,00	8,40	8,57
C12:0	4,83	4,99	4,89	4,62	5,11	4,99
C13:0	0,11	0,12	0,12	0,11	0,12	0,13
C14:0i	0,22	0,24	0,21	0,17	0,19	0,21
C14:1	0,19	0,20	0,26	0,19	0,22	0,18
C14:0	9,91	9,94	9,93	10,55	9,93	10,30
C15:0i	0,30	0,29	0,32	0,28	0,30	0,36
C15:1	0,54	0,53	0,55	0,54	0,55	0,60
C15:0	1,03	1,02	1,03	1,07	1,03	1,03
C16:0i	0,35	0,44	0,32	0,30	0,31	0,32
C16:1	0,91	0,88	0,90	0,90	0,88	0,85
C16:0	25,43	24,72	25,02	25,26	24,37	24,73
C17:0i	0,35	0,34	0,48	0,33	0,35	0,32
C17:1	0,44	0,44	0,49	0,43	0,43	0,42
C17:0	0,61	0,58	0,65	0,61	0,59	0,56
C18:2	2,50	2,47	2,54	2,35	2,32	2,23
C18:1	18,39	18,43	18,48	18,85	18,36	18,47
C18:3	4,18	3,94	4,12	4,29	3,88	3,67
C18:0	9,96	9,36	9,88	10,27	9,32	8,86
C19:0	0,99	0,95	1,00	1,04	0,85	0,91
C20:1	0,10	0,08	0,20	0,12	0,08	0,21
C20:0	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,15
C21:1	0,15	0,14	0,00	0,14	0,14	0,31
C21:0	0,24	0,44	0,10	0,05	0,15	0,15

**Tabla 112.-** Composición de ácidos grasos esterificados principales (% del total) de quesos elaborados con cuajo animal a lo largo de la maduración. Valores medios y desviaciones estándar.

	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0	3,08 ± 0,21	3,79 ± 0,62	3,71 ± 0,82	3,97 ± 0,12	3,68 ± 0,51	3,22 ± 0,33
C6:0	3,24 ± 0,36	3,42 ± 0,06	3,53 ± 0,43	3,22 ± 0,18	3,47 ± 0,22	3,50 ± 0,40
C8:0	3,45 ± 0,04	3,16 ± 0,12	3,21 ± 0,05	2,97 ± 0,18	3,10 ± 0,09	3,25 ± 0,26
C10:0	8,11 ± 0,23	8,40 ± 0,12	8,46 ± 0,02	8,19 ± 0,40	8,31 ± 0,02	9,09 ± 0,31
C12:0	4,04 ± 0,21	4,08 ± 0,38	4,48 ± 0,02	4,42 ± 0,14	4,64 ± 0,18	4,93 ± 0,07
C14:0	9,46 ± 0,45	8,92 ± 0,13	9,67 ± 0,87	9,83 ± 0,12	10,04 ± 0,14	10,22 ± 0,41
C15:0	1,02 ± 0,00	1,06 ± 0,03	1,05 ± 0,01	1,04 ± 0,04	1,00 ± 0,01	1,04 ± 0,05
C16:1	0,81 ± 0,03	0,93 ± 0,16	0,91 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,94 ± 0,10	0,81 ± 0,10
C16:0	25,05 ± 0,35	25,16 ± 0,07	25,00 ± 0,25	24,62 ± 0,18	24,58 ± 0,53	24,91 ± 0,10
C18:2	2,77 ± 0,21	2,60 ± 0,34	2,09 ± 0,31	2,74 ± 0,14	2,72 ± 0,01	2,47 ± 0,26
C18:1	18,54 ± 0,18	18,45 ± 0,03	18,73 ± 0,11	18,67 ± 0,14	18,61 ± 0,21	18,57 ± 0,23
C18:3	4,55 ± 0,07	4,20 ± 0,50	3,98 ± 0,17	4,25 ± 0,16	4,13 ± 0,18	3,50 ± 0,45
C18:0	10,95 ± 0,12	10,48 ± 0,58	10,14 ± 0,63	9,95 ± 0,33	9,90 ± 0,48	9,74 ± 0,22
cadena corta	9,78 ± 0,53	10,37 ± 0,44	10,45 ± 1,20	10,17 ± 0,47	10,25 ± 0,21	9,96 ± 0,32
cadena media	21,61 ± 0,88	21,40 ± 0,38	22,62 ± 0,83	22,44 ± 0,66	22,99 ± 0,30	24,24 ± 0,02
cadena larga	63,69 ± 0,22	62,87 ± 1,24	61,90 ± 0,78	62,09 ± 0,65	61,88 ± 0,22	61,04 ± 0,21

**Tabla 113.-** Composición de ácidos grasos esterificados principales (% del total) de quesos elaborados con cipsosina recombinante a lo largo de la maduración. Valores medios y desviaciones estándar.

	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0	3,37 ± 0,37	3,92 ± 0,19	3,25 ± 0,35	3,58 ± 0,01	4,21 ± 0,47	3,85 ± 0,12
C6:0	3,11 ± 0,12	3,17 ± 0,06	3,33 ± 0,16	2,97 ± 0,09	3,72 ± 0,04	3,63 ± 0,30
C8:0	3,36 ± 0,51	3,06 ± 0,05	3,12 ± 0,24	2,91 ± 0,19	3,41 ± 0,04	3,51 ± 0,04
C10:0	8,62 ± 0,29	8,47 ± 0,30	8,25 ± 0,24	8,41 ± 0,41	8,49 ± 0,10	8,70 ± 0,13
C12:0	4,14 ± 0,69	4,79 ± 0,20	4,56 ± 0,33	4,37 ± 0,25	4,64 ± 0,47	4,48 ± 0,51
C14:0	10,14 ± 0,23	10,27 ± 0,33	10,20 ± 0,27	10,12 ± 0,44	10,04 ± 0,11	10,13 ± 0,17
C15:0	1,05 ± 0,03	1,04 ± 0,03	1,02 ± 0,01	1,06 ± 0,01	1,02 ± 0,01	1,03 ± 0,00
C16:1	0,91 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,93 ± 0,03	0,93 ± 0,03	0,89 ± 0,01	0,87 ± 0,03
C16:0	24,99 ± 0,44	24,56 ± 0,16	24,67 ± 0,35	25,61 ± 0,35	24,65 ± 0,28	24,55 ± 0,19
C18:2	2,81 ± 0,31	2,47 ± 0,01	2,46 ± 0,09	2,30 ± 0,06	2,34 ± 0,03	2,21 ± 0,01
C18:1	18,49 ± 0,10	18,32 ± 0,11	18,46 ± 0,02	18,57 ± 0,29	18,56 ± 0,21	18,45 ± 0,02
C18:3	3,83 ± 0,36	3,98 ± 0,04	4,17 ± 0,05	4,18 ± 0,11	3,93 ± 0,04	3,92 ± 0,25
C18:0	10,03 ± 0,07	9,89 ± 0,53	10,43 ± 0,55	10,12 ± 0,15	9,43 ± 0,11	9,75 ± 0,89
cadena corta	9,85 ± 0,26	10,14 ± 0,20	9,70 ± 0,05	9,47 ± 0,29	11,34 ± 0,39	10,99 ± 0,14
cadena media	22,90 ± 0,17	23,53 ± 0,17	23,00 ± 0,31	22,89 ± 0,28	23,17 ± 0,26	23,30 ± 0,55
cadena larga	62,10 ± 0,30	61,16 ± 0,34	62,14 ± 0,17	62,76 ± 0,24	60,81 ± 0,65	60,78 ± 0,94

#### IV.B.3.2.- RELACIONES ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.

En las Tablas 114 y 115 se muestran los valores medios de 24 de ellas. Ni el tipo de coagulante ensayado, ni el tiempo de maduración afectaron significativamente ( $p>0,05$ ) a estas relaciones.

**Tabla 114.-** Relaciones entre ácidos grasos esterificados de los quesos elaborados con cuajo animal durante la maduración. Valores medios.

Relaciones ácidos grasos	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0 + C6:0 + C8:0 + C10:0 + C12:0 + (C14:0/C16:0)	22,31	23,20	23,77	23,17	23,61	24,40
C4:0/C6:0	0,95	1,11	1,05	1,23	1,06	0,92
C4:0/C6:0 + C8:0	4,40	4,26	4,26	4,20	4,16	4,17
C4:0 + C10:0/C6:0 + C8:0	9,03	9,40	9,32	9,48	9,18	9,06
C6:0/C8:0	0,94	1,08	1,10	1,09	1,12	1,08
C10:0/C6:0	2,50	2,45	2,40	2,54	2,40	2,60
C10:0/C8:0	2,35	2,66	2,64	2,76	2,68	2,80
C10:0/C10:1	36,05	35,47	29,22	31,17	26,89	36,32
C10:0 + C14:0/C6:0+ C8:0	14,47	14,16	14,41	14,21	14,31	15,26
C12:0/C8:0	1,17	1,29	1,40	1,49	1,50	1,52
C12:0/C10:0	0,50	0,49	0,53	0,54	0,56	0,54
C14:0/C8:0	2,74	2,83	3,02	3,31	3,23	3,14
C14:0/C10:0	1,17	1,06	1,14	1,20	1,21	1,12
C14:0/C12:0	2,34	2,19	2,16	2,22	2,16	2,07
C15:0/C14:1	6,94	6,17	5,25	5,89	5,08	4,59
C16:0/C8:0	7,26	7,97	7,80	8,29	7,92	7,67
C16:0/C10:0	3,09	2,99	2,95	3,01	2,96	2,74
C16:0/C14:0	2,65	2,82	2,58	2,50	2,45	2,44
C18:0/C8:0	3,18	3,32	3,16	3,35	3,19	3,00
C18:0/C16:0	0,44	0,42	0,41	0,40	0,40	0,39
C18:1/C16:0	0,74	0,73	0,75	0,76	0,76	0,75
C18:1/C18:0	1,69	1,76	1,85	1,88	1,88	1,91
C18:3/C18:2	1,64	1,62	1,90	1,55	1,52	1,41
INSATURADOS	28,41	28,15	27,58	28,29	28,04	27,15
SATURADOS	70,72	70,93	71,50	70,89	71,13	71,97
INSAT/SATUR.	0,40	0,40	0,39	0,40	0,39	0,38

Resultados y Discusión

**Tabla 115** - Relaciones entre ácidos grasos esterificados de los quesos elaborados con cipsosina recombinante durante la maduración. Valores medios.

Relaciones ácidos grasos	Días de Maduración					
	2	15	30	60	90	120
C4:0 + C6:0 + C8:0 + C10:0 + C12:0 + (C14:0/C16:0)	23,02	23,82	22,91	22,64	24,88	24,58
C4:0/C6:0	1,08	1,24	0,97	1,20	1,13	1,06
C4:0/C6:0 + C8:0	4,45	4,29	4,09	4,12	4,54	4,57
C4:0 + C10:0/C6:0 + C8:0	9,50	9,65	8,84	9,32	9,90	9,75
C6:0/C8:0	0,93	1,04	1,07	1,02	1,09	1,04
C10:0/C6:0	2,77	2,67	2,48	2,83	2,28	2,39
C10:0/C8:0	2,56	2,77	2,65	2,89	2,49	2,48
C10:0/C10:1	34,55	31,14	31,14	31,36	27,17	27,38
C10:0 + C14:0/C6:0+ C8:0	15,24	14,77	14,42	14,72	14,60	14,99
C12:0/C8:0	1,23	1,57	1,46	1,50	1,36	1,28
C12:0/C10:0	0,48	0,57	0,55	0,52	0,55	0,52
C14:0/C8:0	3,01	3,36	3,27	3,47	2,95	2,89
C14:0/C10:0	1,18	1,21	1,24	1,20	1,18	1,16
C14:0/C12:0	2,45	2,14	2,24	2,32	2,16	2,26
C15:0/C14:1	4,69	5,49	4,54	4,78	4,64	4,64
C16:0/C8:0	7,43	8,04	7,92	8,79	7,24	7,00
C16:0/C10:0	2,90	2,90	2,99	3,05	2,90	2,82
C16:0/C14:0	2,46	2,39	2,42	2,53	2,45	2,42
C18:0/C8:0	2,98	3,24	3,35	3,47	2,77	2,78
C18:0/C16:0	0,40	0,40	0,42	0,40	0,38	0,40
C18:1/C16:0	0,74	0,75	0,75	0,72	0,75	0,75
C18:1/C18:0	1,84	1,85	1,77	1,83	1,97	1,89
C18:3/C18:2	1,36	1,61	1,70	1,82	1,68	1,77
INSATURADOS	27,92	27,40	27,94	27,76	27,47	27,29
SATURADOS	71,17	71,61	71,06	71,29	71,72	71,85
INSAT/SATUR.	0,39	0,38	0,39	0,39	0,38	0,38

## **IV.B.4.- RELACIONES ENTRE LAS VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS, BIOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS.**

### **IV.B.4.1.- CORRELACIONES.**

En las Tablas 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 y 125 se presentan los índices de correlación y la significación estadística que se establecen entre las variables físico-químicas, de composición química, fracciones nitrogenadas, recuentos microbianos y contenido en elementos minerales de los quesos elaborados con cuajo animal y cipsosina recombinante.

### **IV.B.4.2.- ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.**

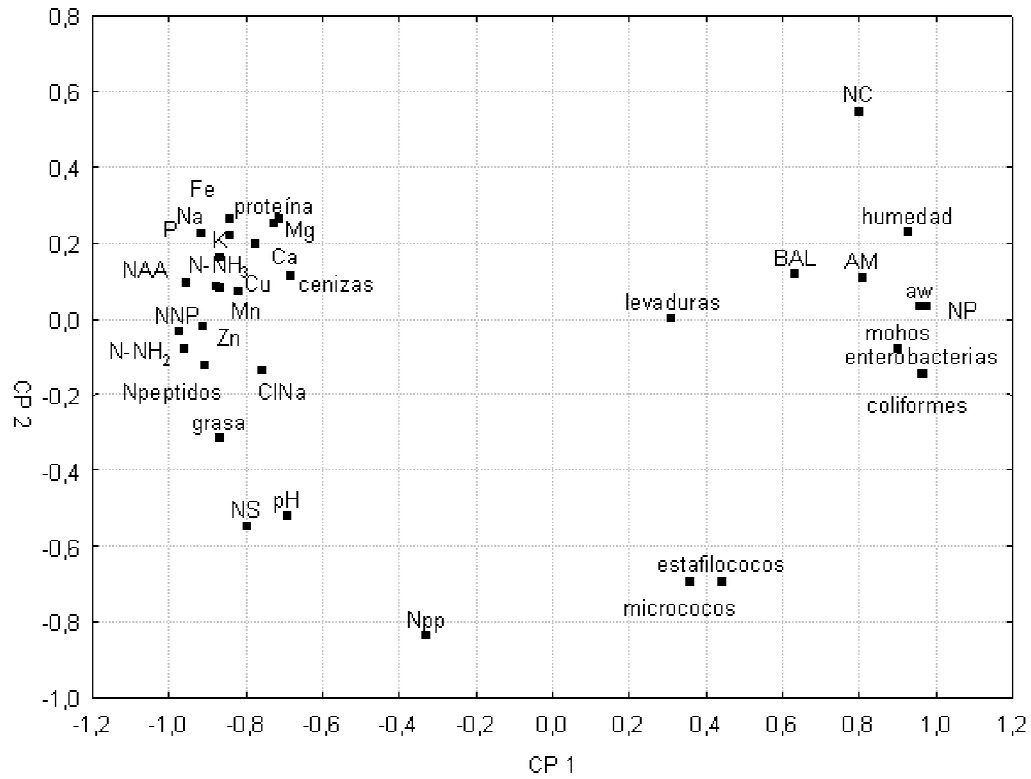
En la Tabla 126 se observa como, mediante el análisis de componentes principales de las variables de composición química, fracciones nitrogenadas, recuentos microbiológicos y elementos minerales estudiados, se han extraído 4 componentes principales que explican el 84,74 % de la varianza.

**Tabla 126.-** Características de los componentes principales.

componente	autovalor	(%) varianza	(%) autovalor acumulado	(%) varianza acumulada
1	21,81	66,09	21,81	66,09
2	3,20	9,70	25,01	75,79
3	1,78	5,40	26,79	81,19
4	1,17	3,55	27,97	84,74

Con el primer componente extraído del modelo estadístico, que explica más del 66 % de la varianza, se separan en el lado izquierdo del eje de abscisas aquellas variables que aumentaron durante los 4 meses de maduración considerados, proteína, grasa, cenizas, cloruros, NS, NNP, NAA, N-NH<sub>3</sub>, N-NH<sub>2</sub> y los contenidos minerales. En el lado derecho del mismo eje aparecen representadas aquellas variables que disminuyeron durante el período madurativo de estudio, a<sub>w</sub>, humedad, NC, NP y recuentos de aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, estafilococos, micrococos, BAL, levaduras y mohos.

**Figura 79 .-** Representación de las variables de los quesos elaborados con cuajo animal y cipsosina recombinante en función de los componentes CP 1-CP 2



Resultados y Discusión

**Tabla 116.-** Correlaciones establecidas entre las variables composicionales.

	a <sub>w</sub>	pH	humedad	grasa	proteína	cenizas	ClNa
a <sub>w</sub>	1,0000	-,6587	,9020	-,7858	-,7513	-,6388	-,7193
	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,001	p=,000
pH	-,6587	1,0000	-,8361	,8004	,5031	,3092	,4442
	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,012	p=,141	p=,030
humedad	,9020	-,8361	1,0000	-,9068	-,7031	-,5280	-,6752
	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,008	p=,000
grasa	-,7858	,8004	-,9068	1,0000	,5928	,5467	,6389
	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,002	p=,006	p=,001
proteína	-,7513	,5031	-,7031	,5928	1,0000	,3872	,3116
	p=,000	p=,012	p=,000	p=,002	p= ---	p=,062	p=,138
cenizas	-,6388	,3092	-,5280	,5467	,3872	1,0000	,6179
	p=,001	p=,141	p=,008	p=,006	p=,062	p= ---	p=,000
ClNa	-,7193	,4442	-,6752	,6389	,3116	,6179	1,0000
	p=,000	p=,030	p=,000	p=,001	p=,138	p=,000	p= ---

**Tabla 117.-** Correlaciones entre las variables composicionales y las fracciones nitrogenadas.

	NS	NNP	NAA	N-NH <sub>3</sub>	N-NH <sub>2</sub>	NC	NP	Npp	Np
a <sub>w</sub>	-,7856	-,9135	-,8821	-,8616	-,9228	,7856	,9135	-,3724	-,8440
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,073	p=,000
pH	,7368	,6757	,6179	,5995	,7185	-,7368	-,6757	,5229	,6497
	p=,000	p=,000	p=,001	p=,002	p=,000	p=,000	p=,000	p=,009	p=,001
humedad	-,8265	-,8835	-,8682	-,8208	-,9123	,8265	,8835	-,4662	-,8125
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,022	p=,000
grasa	,8323	,8512	,8574	,7845	,8759	-,8323	-,8512	,5063	,7748
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,012	p=,000
proteína	,3994	,6334	,6582	,7008	,6727	-,3994	-,6334	,0272	,5376
	p=,053	p=,001	p=,000	p=,000	p=,000	p=,053	p=,001	p=,900	p=,007
cenizas	,5230	,6851	,6628	,5386	,6598	-,5230	-,6851	,1740	,6598
	p=,009	p=,000	p=,000	p=,007	p=,000	p=,009	p=,000	p=,416	p=,000
ClNa	,7521	,7699	,7318	,6185	,7312	-,7521	-,7699	,4569	,7441
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,001	p=,000	p=,000	p=,000	p=,025	p=,000



Resultados y Discusión

**Tabla 118.-** Correlaciones entre las variables composicionales y los recuentos microbiológicos.

	AM	enterob	colifor	estafilo	microco	BAL	levadu	mohos
a <sub>w</sub>	,7384	,9334	,9347	,3458	,3184	,5831	,3223	,8405
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,098	p=,129	p=,003	p=,125	p=,000
pH	-,7119	-,5483	-,5440	,1461	,1154	-,6680	-,2216	-,6393
	p=,000	p=,006	p=,006	p=,496	p=,591	p=,000	p=,298	p=,001
humedad	,7737	,8122	,8161	,2554	,1372	,6157	,4591	,8281
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,228	p=,523	p=,001	p=,024	p=,000
grasa	-,7579	-,7407	-,7541	-,2189	-,0013	-,5036	-,3783	-,8000
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,304	p=,995	p=,012	p=,068	p=,000
proteína	-,5495	-,6936	-,6914	-,4323	-,3745	-,4647	-,4436	-,6694
	p=,005	p=,000	p=,000	p=,035	p=,071	p=,022	p=,030	p=,000
cenizas	-,5216	-,6951	-,7212	-,3886	-,3928	-,3335	-,1360	-,5718
	p=,009	p=,000	p=,000	p=,061	p=,058	p=,111	p=,526	p=,004
CINa	-,5811	-,7259	-,7597	-,2933	-,3524	-,3943	-,0073	-,5848
	p=,003	p=,000	p=,000	p=,164	p=,091	p=,057	p=,973	p=,003

**Tabla 119.-** Correlaciones entre las variables composicionales y los elementos minerales.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
a <sub>w</sub>	-,7089	-,8782	-,8070	-,8721	-,6767	-,7889	-,8104	-,8801	-,8133
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
pH	,5143	,5744	,3384	,5351	,3316	,5373	,4568	,6586	,4586
	p=,010	p=,003	p=,106	p=,007	p=,113	p=,007	p=,025	0	p=,024
humedad	-,7620	-,8454	-,6661	-,7597	-,5711	-,7478	-,7553	-,8897	-,6879
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,004	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
grasa	,6485	,7559	,5808	,6877	,5196	,7060	,6909	,8046	,6801
	p=,001	p=,000	p=,003	p=,000	p=,009	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
proteína	,6445	,7710	,6212	,6990	,5979	,6304	,7585	,6244	,5691
	p=,000	p=,000	p=,001	p=,000	p=,002	p=,001	p=,000	p=,001	p=,004
cenizas	,3678	,6549	,7289	,6199	,4196	,5991	,4516	,5142	,6674
	p=,077	p=,001	p=,000	p=,001	p=,041	p=,002	p=,027	p=,010	p=,000
CINa	,5277	,6750	,7555	,5333	,4275	,5718	,5290	,6492	,6630
	p=,008	p=,000	p=,000	p=,000	p=,037	p=,004	p=,008	p=,000	p=,000

Resultados y Discusión

**Tabla 120.-** Correlaciones entre las fracciones nitrogenadas estudiadas en el presente trabajo.

	NS	NNP	NAA	N-NH <sub>3</sub>	N-NH <sub>2</sub>	NC	NP	Npp	Np
NS	1,0000	,8022	,6876	,6103	,7988	-1,0000	-,8022	,8198	,8183
	p= ---	p=,000	p=,000	p=,002	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000
NNP	,8022	1,0000	,9545	,8029	,9387	-,8022	-1,0000	,3158	,9647
	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,133	p=,000
NAA	,6876	,9545	1,0000	,8849	,9452	-,6876	-,9545	,1773	,8499
	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,407	p=,000
N-NH <sub>3</sub>	,6103	,8029	,8849	1,0000	,8597	-,6103	-,8029	,1998	,6298
	p=,002	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,002	p=,000	p=,349	p=,001
N-NH <sub>2</sub>	,7988	,9387	,9452	,8597	1,0000	-,7988	-,9387	,3692	,8560
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,076	p=,000
NC	-1,0000	-,8022	-,6876	-,6103	-,7988	1,0000	,8022	-,8198	-,8183
	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000
NP	-,8022	-1,0000	-,9545	-,8029	-,9387	,8022	1,0000	-,3158	-,9647
	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p= ---	p=,133	p=,000
Npp	,8198	,3158	,1773	,1998	,3692	-,8198	-,3158	1,0000	,3752
	p=,000	p=,133	p=,407	p=,349	p=,076	p=,000	p=,133	p= ---	p=,071
Np	,8183	,9647	,8499	,6298	,8560	-,8183	-,9647	,3752	1,0000
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,001	p=,000	p=,000	p=,000	p=,071	p= ---

**Tabla 121.-** Correlaciones entre las fracciones nitrogenadas y los recuentos microbiológicos.

	AM	enterob	colifor	estafilo	microco	BAL	levadu	mohos
NS	-,6602	-,6922	-,7084	-,0218	,0097	-,5163	-,2088	-,6139
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,919	p=,964	p=,010	p=,328	p=,001
NNP	-,7621	-,9514	-,9525	-,4079	-,3107	-,6219	-,2265	-,8836
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,048	p=,139	p=,001	p=,287	p=,000
NAA	-,7399	-,9276	-,9296	-,4946	-,3414	-,5226	-,3068	-,9251
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,014	p=,103	p=,009	p=,145	p=,000
N-NH <sub>3</sub>	-,6813	-,8325	-,8441	-,3794	-,3485	-,4564	-,2727	-,8410
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,067	p=,095	p=,025	p=,197	p=,000
N-NH <sub>2</sub>	-,7351	-,9072	-,9171	-,3166	-,3187	-,5500	-,3200	-,8716
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,132	p=,129	p=,005	p=,127	p=,000
NC	,6602	,6922	,7084	,0218	-,0097	,5163	,2088	,6139
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,919	p=,964	p=,000	p=,328	p=,000
NP	,7621	,9514	,9525	,4079	,3107	,6219	,2265	,8836
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,001	p=,287	p=,000
Npp	-,3182	-,1875	-,2122	,3565	,3134	-,2241	-,1145	-,1282
	p=,130	p=,380	p=,319	p=,087	p=,136	p=,293	p=,594	p=,550
Np	-,7118	-,8914	-,8894	-,3321	-,2541	-,6434	-,1539	-,7815
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,113	p=,231	p=,000	p=,473	p=,000

Resultados y Discusión

**Tabla 122.-** Correlaciones entre las fracciones nitrogenadas y los elementos minerales.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
NS	,4702	,5757	,6438	,5877	,4487	,5912	,5156	,7124	,6988
	p=,020	p=,003	p=,001	p=,003	p=,028	p=,002	p=,010	p=,000	p=,000
NNP	,7636	,8767	,8216	,8030	,6828	,7718	,7802	,8852	,9027
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NAA	,7641	,9204	,7680	,8586	,6857	,7817	,8263	,9045	,8265
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
N-NH <sub>3</sub>	,6144	,8369	,6386	,8654	,6806	,7334	,7877	,8142	,6504
	p=,001	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,001
N-NH <sub>2</sub>	,6686	,8772	,7631	,8881	,7056	,7469	,7665	,8918	,7828
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
NC	-,4702	-,5757	-,6438	-,5877	-,4487	-,5912	-,5156	-,7124	-,6988
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,028	p=,000	p=,010	p=,000	p=,000
NP	-,7636	-,8767	-,8216	-,8030	-,6828	-,7718	-,7802	-,8852	-,9027
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
Npp	,0149	,0740	,2351	,1638	,0582	,1993	,0711	,2831	,2448
	p=,945	p=,731	p=,269	p=,444	p=,787	p=,351	p=,741	p=,180	p=,249
Np	,7202	,7737	,8054	,6762	,6094	,6951	,6743	,8004	,9058
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,002	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000

**Tabla 123.-** Correlaciones entre los recuentos microbiológicos de los lotes de quesos estudiados.

	AM	enterob	colifor	estafilo	microco	BAL	levadu	mohos
AM	1,0000	,7294	,7336	,4064	,2211	,8460	,1319	,8221
	p= ---	p=,000	p=,000	p=,049	p=,299	p=,000	p=,539	p=,000
enterob	,7294	1,0000	,9913	,4615	,4250	,5868	,1986	,8774
	p=,000	p= ---	p=0,00	p=,023	p=,038	p=,003	p=,352	p=,000
colifor	,7336	,9913	1,0000	,4781	,4766	,5761	,1745	,8552
	p=,000	p=0,00	p= ---	p=,018	p=,019	p=,000	p=,415	p=,000
estafilo	,4064	,4615	,4781	1,0000	,5987	,2750	,3028	,4802
	p=,049	p=,023	p=,018	p= ---	p=,002	p=,193	p=,150	p=,018
microco	,2211	,4250	,4766	,5987	1,0000	,2307	-,1435	,2350
	p=,299	p=,038	p=,019	p=,002	p= ---	p=,278	p=,503	p=,269
BAL	,8460	,5868	,5761	,2750	,2307	1,0000	,0625	,6191
	p=,000	p=,003	p=,003	p=,193	p=,278	p= ---	p=,772	p=,001
levadu	,1319	,1986	,1745	,3028	-,1435	,0625	1,0000	,2765
	p=,539	p=,352	p=,415	p=,150	p=,503	p=,772	p= ---	p=,191
mohos	,8221	,8774	,8552	,4802	,2350	,6191	,2765	1,0000
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,269	p=,001	p=,191	p= ---

Resultados y Discusión

**Tabla 124.-** Correlaciones entre los elementos minerales y los recuentos microbiológicos.

	AM	enterob	colifor	estafilo	microco	BAL	levadu	mohos
Ca	-,5909	-,7218	-,7103	-,5597	-,2785	-,4964	-,4636	-,7104
	p=,002	p=,000	p=,000	p=,004	p=,188	p=,014	p=,023	p=,000
P	-,7001	-,8838	-,8956	-,5445	-,4387	-,5029	-,3299	-,8328
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,006	p=,032	p=,012	p=,115	p=,000
Na	-,5654	-,8545	-,8729	-,5226	-,5879	-,4000	-,1511	-,6547
	p=,004	p=,000	p=,000	p=,009	p=,003	p=,053	p=,481	p=,001
K	-,6475	-,8626	-,8646	-,3922	-,4451	-,4636	-,2989	-,8062
	p=,001	p=,000	p=,000	p=,058	p=,029	p=,023	p=,156	p=,000
Mg	-,4862	-,7843	-,7907	-,3189	-,4972	-,3571	-,1167	-,6090
	p=,016	p=,000	p=,000	p=,129	p=,013	p=,087	p=,587	p=,002
Mn	-,6022	-,8065	-,7869	-,4060	-,2632	-,4127	-,3361	-,7480
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,049	p=,214	p=,045	p=,108	p=,000
Fe	-,6607	-,8186	-,8204	-,5439	-,4196	-,4512	-,3178	-,8069
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000	p=,041	p=,027	p=,130	p=,000
Zn	-,6973	-,8697	-,8649	-,3873	-,2503	-,5391	-,4041	-,8258
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,061	p=,238	p=,007	p=,050	p=,000
Cu	-,6764	-,9132	-,9063	-,4690	-,3472	-,5745	-,1075	-,7379
	p=,000	p=,000	p=,000	p=,021	p=,096	p=,003	p=,617	p=,000

**Tabla 125.-** Correlaciones entre los elementos minerales.

	Ca	P	Na	K	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
Ca	1,0000	,8311	,6544	,5356	,4975	,6980	,7668	,7446	,6647
	p= ---	p=,000	p=,001	p=,007	p=,013	p=,000	p=,000	p=,000	p=,000
P	,8311	1,0000	,7925	,8164	,6450	,7882	,8090	,8363	,7812
	p=,000	p= ---	p=,000	p=,000	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001
Na	,6544	,7925	1,0000	,7424	,6846	,7288	,7199	,6648	,8562
	p=,001	p=,001	p= ---	p=,001	p=,000	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001
K	,5356	,8164	,7424	1,0000	,7289	,7635	,7589	,8282	,7451
	p=,007	p=,001	p=,001	p= ---	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001
Mg	,4975	,6450	,6846	,7289	1,0000	,4665	,7132	,6459	,6893
	p=,013	p=,001	p=,001	p=,001	p= ---	p=,022	p=,001	p=,001	p=,001
Mn	,6980	,7882	,7288	,7635	,4665	1,0000	,6618	,7490	,7447
	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,022	p= ---	p=,001	p=,001	p=,001
Fe	,7668	,8090	,7199	,7589	,7132	,6618	1,0000	,8480	,7100
	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p= ---	p=,001	p=,001
Zn	,7446	,8363	,6648	,8282	,6459	,7490	,8480	1,0000	,7721
	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p= ---	p=,001
Cu	,6647	,7812	,8562	,7451	,6893	,7447	,7100	,7721	1,0000
	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p=,001	p= ---

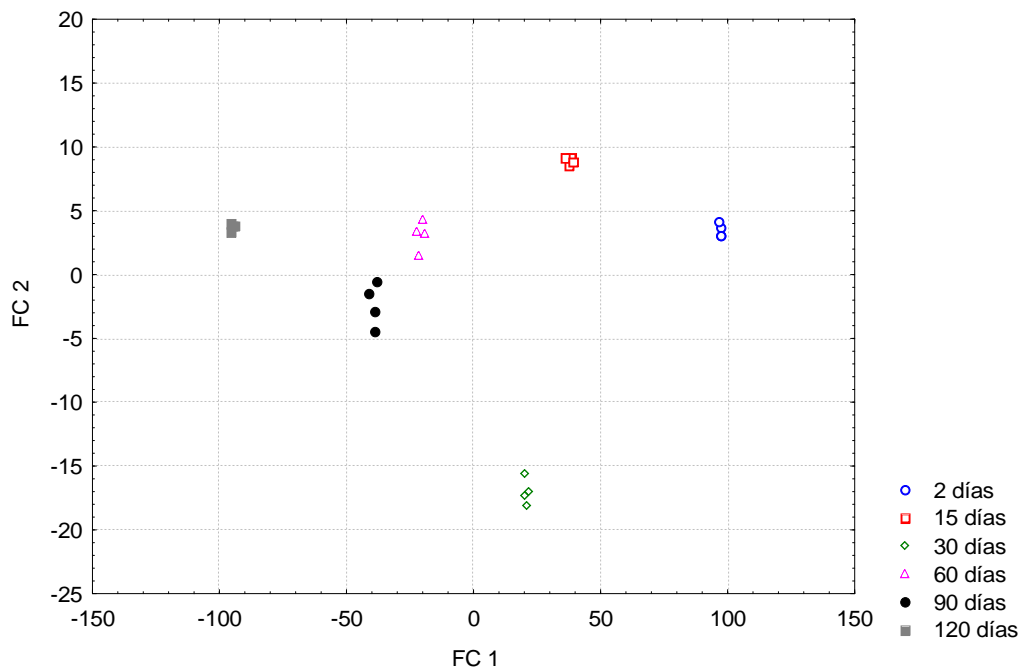
#### IV.B.4.3.- ANALISIS DISCRIMINANTE.

##### IVB.4.3.1.- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración.

Las variables grasa, humedad,  $a_w$ , levaduras y mohos, que mostraron una evolución más acusada durante el período de maduración considerado, fueron las que presentaron mayor capacidad discriminante.

Con las funciones discriminantes se ha conseguido clasificar correctamente, dentro de los seis intervalos de maduración considerados, todos los quesos estudiados, cuya representación gráfica se recoge en la Figura 80.

**Figura 80.-** Representación gráfica de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones discriminante FC 1 y FC2.

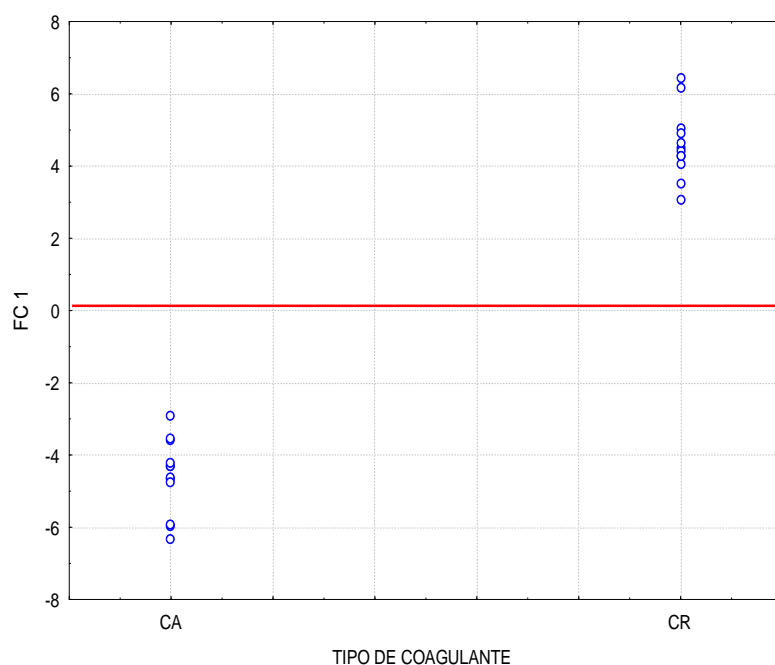


### IVB.4.3.2.- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante.

La variable que mayor capacidad de discriminación presentaron entre los quesos coagulados con cuajo animal y los obtenidos con cipsosina recombinante fue el NS.

Mediante la función canónica se representan en el diagrama de dispersión (Figura 81) los quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado, donde todos los quesos estudiados fueron clasificados correctamente.

**Figura 81.-** Representación de los quesos en función del tipo de coagulante utilizado mediante las función canónica FC 1



## V. - CONCLUSI ONES

## V.- CONCLUSIONES

**PRIMERA-** La composición química bruta de los quesos coagulados con cuajo animal fue, en general, bastante similar a los correspondientes quesos obtenidos con coagulante vegetal liofilizado y con cipsosina recombinante. No obstante, la  $a_w$  de los lotes de quesos coagulados con cuajo animal fue superior a la de los respectivos lotes obtenidos mediante coagulante vegetal, debido a la mayor proteólisis desarrollada en los últimos.

**SEGUNDA-** El nitrógeno soluble (NS) de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado y cipsosina recombinante aumentó durante la maduración de forma más intensa que los correspondientes quesos obtenidos mediante cuajo animal, debido a que las cipsosinas presentan mayor actividad caseinolítica que la quimosina.

**TERCERA-** Las tasas de NNP, NAA, N-NH<sub>3</sub> y N-NH<sub>2</sub> de los quesos elaborados con coagulante vegetal fueron, en la mayoría de intervalos de maduración considerados, superiores a las correspondientes de los quesos elaborados con cuajo animal a causa de la mayor actividad proteolítica de las cipsosinas, aunque la producción de estos componentes es más dependiente de las enzimas microbianas que del tipo de coagulante ensayado.

**CUARTA-** En líneas generales los recuentos microbianos estudiados disminuyen a lo largo de la maduración, sin que se observen diferencias en función del tipo de coagulante ensayado, ya que el coagulante vegetal liofilizado es prácticamente aséptico y no añaden carga microbiana a la leche durante el proceso de elaboración del queso, al igual que el cuajo animal y la cipsosina recombinante.

**QUINTA-** No se han detectado diferencias entre los contenidos de elementos minerales y en el perfil de los ácidos grasos esterificados de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado y con cipsosina recombinante en relación a los quesos coagulados con cuajo animal. Ni el perfil de ácidos grasos combinados ni los



### Conclusiones

contenidos de elementos minerales, expresados en función de la materia seca, se vieron influenciados por el tiempo de maduración.

**SEXTA-** Los quesos elaborados con el coagulante vegetal liofilizado presentaron mayor intensidad de olor y sabor, un olor ácido y picante ligeramente superior, un color más intenso y fueron menos duros y firmes, pero más cremosos que los quesos obtenidos mediante quimosina. Estos últimos presentaron un sabor amargo ligeramente menor al de los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado.

**SÉPTIMA-** Aunque no se ha realizado la valoración sensorial de los quesos coagulados con la cipsosina recombinante, todos los parámetros físico-químicos, bioquímicos y microbiológicos obtenidos sugieren que esta enzima constituye una alternativa válida a la utilización de otras formas posibles del coagulante vegetal procedente del cardo *Cynara cardunculus*.

**OCTAVA-** Se han confirmado las experiencias previas realizadas en queso de Los Pedroches, de menor formato, de que el coagulante vegetal liofilizado es una excelente alternativa para quesos de formato tipo “Manchego” frente al tradicional uso de los extractos acuosos crudos de las flores desecadas de *C. cardunculus*.

**NOVENA-** La mayor proteólisis de los quesos coagulados con las dos formas ensayadas del coagulante vegetal frente a la quimosina, evidenciados por una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el nitrógeno soluble y también por una mayor intensidad de dicha proteólisis, se traduce en que se alcanza en menor tiempo los parámetros sensoriales más apreciados por el consumidor, como el olor y sabor, lo cual indica que las cipsosinas de *C. cardunculus* se pueden utilizar en la maduración acelerada de quesos de oveja de gran formato como “Manchego” y “Zamorano”, entre otros.

## VI . - RESUMEN

## VI.- RESUMEN

En la presente memoria se estudia el efecto del empleo de un coagulante vegetal procedente del cardo *Cynara cardunculus*, en forma liofilizada y obtenido mediante ingeniería genética, sobre las características de un queso artesanal tipo Manchego elaborado con leche cruda de oveja.

Para ello se elaboraron, en diferentes épocas, seis lotes de quesos tipo Manchego, tres coagulados mediante un cuajo animal comercial y otros tres obtenidos a partir de la liofilización de extractos acuosos crudos de las flores del cardo *C. cardunculus*, que se maduraron durante 6 meses. Paralelamente se desarrolló, en la misma industria quesera, otro ensayo experimental donde se fabricaron cuatro lotes de quesos tipo Manchego, dos a partir de cuajo animal comercial y dos coagulados con cipsosina (enzima con capacidad coagulante presente en las flores del cardo *C. cardunculus*) recombinante.

Durante todo el período madurativo considerado la composición química bruta, el valor de pH y los contenidos de los elementos minerales mayoritarios y minoritarios, estudiados de los lotes de quesos coagulados con cuajo animal fueron similares a los lotes de quesos respectivos obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado y los elaborados con cipsosina recombinante. Sin embargo los valores de  $a_w$  de los quesos elaborados con los coagulantes vegetales (liofilizado y cipsosina recombinante) fueron inferiores a los detectados en los correspondientes quesos fabricados con cuajo animal, debido fundamentalmente a la mayor proteólisis desarrollada en los primeros.

En líneas generales, las fracciones nitrogenadas determinadas analíticamente en el presente trabajo (NS, NNP, NAA, N-NH<sub>3</sub> y N-NH<sub>2</sub>) aumentaron a lo largo del período madurativo estudiado de forma más acentuada en los quesos elaborados con los dos coagulantes vegetales ensayados con respecto a los correspondientes quesos fabricados con cuajo animal, debido a la mayor actividad proteolítica desarrollada por ambas presentaciones de la cipsosina, estableciéndose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los contenidos de NS.

## Resumen

No se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los recuentos microbianos de los quesos coagulados con cuajo animal y los obtenidos mediante coagulante vegetal liofilizado, debido a que el primero, a diferencia del extracto acuoso crudo de partida, es prácticamente aséptico y no añade carga microbiana a la leche durante el proceso de fabricación del queso. Igualmente, los lotes de quesos elaborados con cipsosina recombinante presentaron unos recuentos de los grupos microbianos estudiados similares a los observados en los correspondientes lotes de quesos coagulados con cuajo animal.

El perfil de ácidos grasos esterificados de los quesos estudiados no se vió afectado significativamente ( $p > 0,05$ ) ni por el tiempo de maduración ni por el tipo de coagulante ensayado.

Respecto al análisis sensorial, los quesos elaborados con coagulante vegetal liofilizado mostraron mayor intensidad de olor y sabor, un olor picante y olor ácido ligeramente superior, un color más intenso y fueron menos duros y firmes, y más cremosos que los elaborados con cuajo animal.

## VII. - BIBLIOGRAFÍA

## Bibliografía

- A.O.A.C. (1990). Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> Edition. Vol 2. W. Horwitz, Ed. Washington, D.C. USA.
- A.O.A.C (1991). Official Methods of Analysis. 2<sup>nd</sup> supplement. Helrich, K. Ed. Virginia. USA
- ABDEL-KADER, Y.J. (2003). Changes in the nitrogen fractions of Domiati cheese made with microbial and recombinant rennet during ripening. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **31**, 111-124.
- ABO-ENALGA, I.G. and PLAPP, R. (1987). Peptidases of *Lactobacillus casei* and *L. plantarum*. *Journal of Basic Microbiology*, **27**, 123-130.
- ADAM, A.C., PRIETO, J.A., RUBIO-TEXEIRA, M. and POLAINA, J. (1999). Construction of a lactose-assimilating strain of baker's yeast. *Yeast*, **15**, 1.299-1.305.
- ADDA, J., GRIPON, J.C. and VASSAL, L. (1982). The chemistry of flavour and texture development in cheese. *Food Chemistry*, **9**, 115-129.
- ALAIS, CH. (1986). Ciencia de la Leche. Ed. Reverté, S.A. Barcelona. España.
- ALICHANIDIS, E. and POLICHRONIADOU, A. (1995). Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. Proceedings of IDF/Greek National Committee of IDF/CIRVAL. Seminar titled "Production and Utilization of Ewe and Goat Milk". October, Crete. Greek.
- ALONSO, L., JUÁREZ, M. y RAMOS, M. (1989). Contribución al estudio de quesos industriales de pasta azul. *Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **29**, 77-85.
- AMANTEA, G.F., SKURA, B.J., and NAKAY, S. (1986). Culture on ripening characteristics and rheological behavior of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, **51**, 912-918.
- AMERINE, M.A., PANGBORN, R.M. and ROESSLER, E.B. (1965). Principles of sensory evaluation of foods. Academic Press, New York. USA.
- AMIGO, L. (1989). Proteínas de la leche de vaca, oveja y cabra: Estudio comparativo. *Alimentación Equipos y Tecnología*, **1**, 211-220.
- AMIGO, L., OLANO, A. and CALVO, M.M. (1995). Preservation of raw milk with CO<sub>2</sub>. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, **200**, 293-296.
- ANDREWS, A.T. and ALICHANIDIS, E. (1983). Proteolysis of caseins and the proteose-peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, **50**, 275-279.
- ANÓNIMO (1987) BOE de 17 de Julio. Orden de 9 de Julio de 1987 del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de La Secretaría del Gobierno sobre las normas para los quesos "Hispánico", "Ibérico" y "De la Mesta", destinados al mercado interior.
- ANÓNIMO (1988). Orden del 14 de enero de 1988. Norma general de identidad y pureza para el cuajo y otros enzimas coagulantes de leche destinados al mercado interior.
- ANÓNIMO. (1990). Catálogo de Quesos Españoles. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. España.
- ANÓNIMO (1991). Código Alimentario Español (CAE). Ed. Boletín Oficial del Estado. Colección textos legales. 6ª Ed. Madrid. España.
- ANÓNIMO (1996a). BOE de 26 de febrero de 1996. Orden de 20 de febrero de 1996 por la que se modifica la Orden del 14 de enero de 1988.
- ANONIMO (1996b). BOE de 1 de marzo. Real Decreto 402/1996 de 8 de abril, que modifica al R.D. 1679/1994 por el que se establecen las condiciones aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos.
- ANÓNIMO (1999). Ammoniak Testkit 1112732. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH. Darmstadt. Germany.
- ANZALDÚA-MORALES, A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- APHA. (1976). Recommended methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association. Washington. USA.
- APHA (1985). Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association. Washington. USA.
- APHA (1992). Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association. Washington. USA
- ARANDA, P., ORIA, R. and CALVO, M. (1988). Detection of cows' milk in ewes' milk and cheese by immunodotting method. *Journal of Dairy Research*, **55**, 121-124.
- ARANDA, P., SÁNCHEZ, L., PÉREZ, M.D., ENA, J.M., PUYOL, P., ORIA, R. and CALVO, M. (1993). Rapid immunoenzymatic method for detecting adulteration in ewes' milk. *Food Control*, **4**, 101-104.
- ASSENAT, L. (1985). Le lait de brebis. Composition et propriétés. In: *Lait et produits laitiers. Vache, brebis et chèvre*. Technique et documentation. Lavoisier. Paris. Ed. F. M. Luquet. France.

## Bibliografía

- ASSENAT, L. (1991). Leche de oveja. En: Leche y productos lácteos. Vaca-cabra-oveja. 1. La leche de la mama a la lechería. Luquet, F.M. Ed Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- ASTM (1992). American Society for Testing and Materials. Manual on descriptive analysis. Testing for sensory evaluation. Philadelphia. USA.
- ASTON, J.W., GREIVE, P.A., DURWARD, I.G. and DULLEY, J.R. (1983). Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. *Australian Journal and Food Chemistry*, **38**, 55-60.
- AWAD, S., LUTHI-PENG, Q.Q. and PUHAN, Z. (1998) Proteolytic activities of chymosin and porcine pepsin on buffalo, cow, and goat whole and beta-casein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4.997-5.007.
- BALCONES, E., OLANO, A. and CALVO, M.M. (1996). Factors affecting the rennet clotting properties of ewe's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1.993-1.996.
- BALLESTEROS, C. (2002). Estudio comparativo de los quesos manchegos artesanales e industriales: Aspectos físico-químicos, microbiológicos y características sensoriales y mecánicas. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Castilla-La Mancha. Ciudad Real. España.
- BANKS, J.M., ROA, I. and MUIR, D.D. (1998) Manipulation of the texture of low-fat Cheddar using a plant protease extracted from *Cynara cardunculus*. *Australian Journal of Dairy Technology*, **53**, 105.
- BARBOSA, M., VASSAL, L., VALLES, E. et MOCQUOT, G. (1976). L'Utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pate cuite. *Le Lait*, **54**, 1-17.
- BARBOSA, M., CORRADINI, C. and BATTISTONI, B. (1981). Cheese-making experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from cardo (*C. cardunculus* L.). *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, **32**, 203-221.
- BARBOSA, M. (1985). "Cardo" (*Cynara cardunculus*) as a vegetable rennet. LNETI, DTIA, Nº 58, *Comunicações e Conferências*- 45.
- BÁRCENAS, P., PÉREZ-ELORTONDO, F.J., SALMERÓN, J. and ALBISU, M. (1997). Development of descriptive terms for sensory analysis of ewes cheeses added by multivariate statistical procedures. *Sémes Journées Européennes Agro Industrie et Méthodes Statistiques*. Versailles. France.
- BÁRCENAS, P., PÉREZ-ELORTONDO, F.J., SALMERÓN, J. and ALBISU, M. (1998a). Application of linear discriminant analysis to sensory data from comparing cheeses made from different type of milk. *3<sup>rd</sup> Pangborn Sensory Science Symposium*. Alesund. Norway.
- BÁRCENAS, P., PÉREZ-ELORTONDO, F.J., SALMERÓN, J. and ALBISU, M. (1998b). Evaluación de un equipo de catadores durante el entrenamiento para el análisis sensorial de la textura del queso Idiazabal. *Alimentaria*, **289**, 51-55.
- BÁRCENAS, P., PÉREZ-ELORTONDO, F.J., SALMERÓN, J. and ALBISU, M. (1999). Development of a preliminary sensory lexicon and standard references of ewes milk cheeses aided by multivariate statistical procedures. *Journal of Sensory Studies*, **14**, 161-279.
- BÁRCENAS, P., PÉREZ-ELORTONDO, F.J. and ALBISU, M. (2003). Sensory changes during ripening of raw ewe's milk cheese manufactured with and without the addition of a starter culture. *Journal of Food Science*, **68**, 2.572-2.578.
- BARCINA, Y., RODRÍGUEZ, L., ROS, G. y RINCÓN, F. (1988). Evolución de la microflora durante la maduración del queso Idiazabal. *Alimentaria*, **196**, 37-40.
- BAREFOOT, S.F. and NETTLES, C.G. (1993). Antibiosis Revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science*, **76**, 2.366-2.374.
- BARRETT, F.M., KELLY, A.L., McSWEENEY, P.L.H. and FOX, P.F. (1999). Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, **9**, 421-427.
- BARTELS., H.J., JONHSON, M.E. and OLSON, N.F. (1987). Accelerated ripening of Gouda cheese 1. Effect of heat-shocked thermophilic Lactobacilli and streptococci on proteolysis and flavour development. *Milchwissenschaft*, **42**, 139-144.
- BASTIAN, E.D. and BROWN, R.J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: An update. *International Dairy Journal*, **6**, 435-457.
- BASTIAN, E.D., LO, C.G. and DAVID, K.M.M. (1997). Plasminogen activation in cheese milk: Influence on Swiss cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, **80**, 245-251.
- BAUTISTA, L., BERMEJO, M.P. and NÚÑEZ, M. (1986). Seasonal variation and characterization of *Micrococcaceae* present in raw ewes' milk. *Journal of Dairy Science*, **53**, 1-5.
- BAUTISTA, L., GAYA, P., MEDNA, M. and NÚÑEZ, M. (1988). A quantitative study on enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 566-569.
- BEERENS, H. y LUQUET, F.M. (1990). Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y productos

## Bibliografía

- lácteos. Ed. Acibia, S.A. Zaragoza. España.
- BELTRÁN DE HEREDIA, F. (1985). Caracterización química del queso Manchego comercial. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba.
- BENCINI, R. and PURVIS, I.W. (1990). The yield and composition of milk from Merino sheep. *Wool Technology and Sheep Breeding*, **16**, 71-73.
- BENEDITO, J., GONZÁLEZ, R., ROSSELLO, C. and MULET, A. (2000). Instrumental and expert assessment of Mahon cheese texture. *Journal of Food Science*, **65**, 1.170-1.174.
- BENFELDT, C., SORENSEN, J. and PETERSEN, T.E. (1998). Inhibitory activity against plasmin, trypsin, and elastase in rennet whey and in cheese fortified with whey protein. *Journal of Dairy Science*, **81**, 615-620.
- BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N.A., BRENNAN, N.L. and COGAN, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, **11**, 259-274.
- BERGER, C., MARTÍN, N., COLLIN, S., GIJS, L., KHAN, J.A., PIRAPREZ, G., SPINLER, H.E. and VULFSON, E.N. (1999). Combinatorial approach to flavor analysis. 2. Olfactory investigation of a library of s-methyl thioesters and sensory evaluation of selected components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3.274-3.279.
- BÉRODIER, F., LAVANCHY, P., ZANNONI, M., CASALS, J., HERRERO, L. et ADAMO, C. (1997a). Guide d'évaluation olfato-gustative des fromages à pâte dure et semidure. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **30**, 298-304.
- BÉRODIER, F., STÉVENOT, C. et SCHLICH, P. (1997b). Descripteurs de l'arôme du fromage Comté. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **30**, 298-304.
- BERTOZZI, L. and PANARI, G. (1993). Cheeses with appellation d'origine contrôlée (AOC). Factors that affect quality. *International Dairy Journal*, **3**, 297-312.
- BHOWMILK, T. and MARTH, E.H. (1990). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: A review. *Journal of Dairy Science*, **73**, 859-866.
- BIEBER, S.L. and SMITH, D.V. (1986). Multivariate analysis of sensory data: A comparison of method. *Chemical Senses*, **11**, 19-47.
- BILLS, D.D., SCANLAN, R.A., LINDSAY, R.C. and SATHER, L. (1969). Free fatty acid and the flavour of dairy products. *Journal of Dairy Science*, **52**, 1.340-1.345.
- BISQUERRA, R. (1989). Introducción conceptual al análisis multivariante. Un enfoque informático con los paquetes SPSS-X BMDP, LISREL y SPAD. Ediciones Promociones y Publicaciones Universitarias, S. A. Barcelona.
- BOCKELMAN, W., MONNET, V., GEIS, A., TEUBER, M. and GRIPON, J.C. (1989). Comparison of cell wall proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AC1 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO763. I. Purification and action of the enzymes on caseins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **31**, 278-282.
- BRAMAUD, C., AIMAR, P. and DAUFIN, G. (1997a). Whey protein fractionation isoelectric precipitation of alpha-lactalbumin under gentle heat-treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, **56**, 391-397.
- BRAMAUD, C., AIMAR, P. and DAUFIN, G. (1997b). Optimisation of a whey-protein fractionation process- based on the selective precipitation of alpha-lactalbumin. *Le Lait*, **77**, 411-423.
- BRANGER, A. (1992). Il controllo dei batteri lattici. *Il Latte*, **1**, 46.
- BRITISH STANDARDS INSTITUTION (1963). Methods for the chemical analysis of cheese. London: BSI (British Standard nº. 770).
- BRODELIUS, P.E., CORDEIRO, M.C. and PAIS, M.S. (1995). Aspartic proteinases (cyprosin) from *Cynara cardunculus* spp. *flavescens* cv. Cardoon; purification, characterisation, and tissue-specific expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **362**, 255-266.
- BRODELIUS, P.E., CORDEIRO, M.C. XUE, Z.T., PIETRZAK, M. and PAIS, M.S. (1996). Plant aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* spp. *Flavescens* cv. Cardoon; nucleotide sequence of a cDNA encoding cyprosin and its organ-specific expression. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **362**, 367-372.
- BROOME, M.C., KRAUSE, D.A. and HICKEY, M.W. (1990). The use of non-saturated lactobacilli in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*, **45**, 67-73.
- BUCHÍN, S., MARTÍN, B., DUPONT, D., BORNARD, A. and ACHILLEOS, C. (1999). Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. *Journal of Dairy Research*, **66**, 579-588.
- BUTTIAUX, R. (1974). Manual de techniques bacteriologiques. 4ª Ed. Ed. Flammarion Medicine Science. Paris. Francia.
- CABEZAS, L. (1980). Ensayos sobre el coagulante de la leche del cardo *C. humilis* L. *Tesina de licenciatura*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.



## Bibliografía

- CABEZAS, L., ESTEBAN, M.A. y MARCOS, A. (1981). Difusión en gel de agar de las proteinasas del cardo *C. humilis* L. y otras enzimas. *Alimentaria*, **128**, 17-22.
- CAESSENS, P.W.J.R., VISSER, S. and GRUPPEN, H. (1997). Method for the isolation of bovine beta-lactoglobulin from a cheese whey-protein fraction and physicochemical characterization of the purified product. *International Dairy Journal*, **7**, 229-235.
- CAIRNCROSS, S.E. and SJÖSTRÖM, L.B. (1950). Flavor profiles-A new approach to flavor problems. *Food Technology*, **4**, 308-311.
- CALVO, M.M., MONTILLA, M.A. and OLANO, A. (1993). A research note-rennet-clotting properties and starter activity on milk acidified with carbon-dioxide. *Journal of Food Protection*, **56**, 1.073-1.076.
- CAMPOS, R., GUERRA, R., AGUIAR, M., VENTURA, O. and CAMACHO, L. (1990). Chemical characterization of proteases extracted from wild thistle (*Cynara cardunculus*). *Food Chemistry*, **35**, 89-97.
- CARBALLO, J., FRESNO, J.M., TUERO, J.R., PRIETO, J.G., BERNARDO, A. and MARTÍN-SARMIENTO, R. (1994). Characterization and biochemical-changes during the ripening of a Spanish hard goat cheese. *Food Chemistry*, **49**, 77-82.
- CARIDI, A., MICARI, P., CAPARRA, P., CUFARI, A. and SARULLO, V. (2003). Ripening and seasonal properties of the ewe's cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, **13**, 191-200.
- CARJAVILLE, C., GÓNZALEZ, J., REPETTO, J.L., RODRÍGUEZ, C.A. and MARTÍNEZ, A. (1999). Nutritive value of green forage and crop by products of *Cynara cardunculus*. *Annales de Zootechnie*, **48**, 353-365.
- CARMINATI, D. (1997). Sensory analysis of cheese. *Il Latte*, **22**, 34-38.
- CARMONA, M.A. (1994). Adición de cultivos iniciadores y condiciones de maduración en la fabricación del queso de oveja artesano. Características químicas y sensoriales. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- CARMONA, M.A. y GÓMEZ, R. (1994). Adición de cultivos lácticos y maduración controlada en la elaboración del queso de Los Pedroches. Influencia sobre la composición química y la proteólisis. *Industrias Lácteas Españolas*, **184**, 33-39.
- CARMONA, M.A., GÓMEZ, R., VIOQUE, M., SÁNCHEZ, C., MATA, C. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1998). Influences of addition of lactic starters and of the ripening conditions on chemical and organoleptic characteristics of Los Pedroches cheese made with a vegetable coagulant. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, **16**, 289-298.
- CARMONA, M.A., SANJUÁN, E., GÓMEZ, R. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1999). Effect of starter cultures on the physico-chemical and biochemical features in ewe cheese made with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**, 737-744.
- CARO, I. y MATEO, J. (2000). Rendimientos queseros. I. Concepto y factores que afectan. *Alimentaria*, **311**, 103-113.
- CARRERA, E., GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1999). Effect of milk coagulant on the formation of hydrophobic and hydrophilic peptides during the manufacture of cows' milk Hispanic cheese. *Milchwissenschaft*, **54**, 146-149.
- CASTANHEIRA, P.M.D. (1998) Distribuição diferencial das cardosinas A e B ao longo do pistilo de *Cynara cardunculus* L. M.Sc. thesis, Universidade de Coimbra, Portugal.
- CATALANO, M., DE FELICE, M. et GOMES, T. (1985). Influenza della frazione lipidica sulla qualità dei formaggi. *Il Latte*, **10**, 936-943.
- CATTANEO, T.M.P., NIGRO, F., MESSINA, G. and GIANGIACOMO, R. (1994). Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, **49**, 269-272.
- CeNAN (1982). Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. España.
- CENTENO, J.A., CEPEDA, A., RODRÍGUEZ, J.L. y DOCAMPO, F. (1991). Estudio higio-sanitario del queso de Arzúa. *Alimentaria*, **33**, 91-96.
- CENTENO, J.A., MENÉNDEZ, S. and RODRÍGUEZ, J.L. (1996a). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cows milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, **33**, 307-313.
- CENTENO, J.A., CEPEDA, A. and RODRÍGUEZ, J.L. (1996b). Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cow's milk cheese. *International Dairy Journal* **6**, 65-78.
- CHAPMAN, G.H. (1945) The significance of sodium chloride studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology*, **50**, 201-203.
- CHÁVARRI, F., SANTISTEBAN, A., VIRTO, M. and DE RENOBLES, M. (1998). Alkaline phosphatase, acid phosphatase, lactoperoxidase, and lipoprotein lipase activities in industrial ewe's milk and cheese. *Journal of*

## Bibliografía

- Agricultural and Food Chemistry, 46, 2.926-2.932.
- CHEN, S., AGBOOLA, S and ZHAO, J. (2003). Use of Australian cardoon in the manufactured of ovine milk cheese: A comparison with commercial rennet preparations. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 799-807.
- CHIANESE, L., GARRO, G., MAURIELLO, R., LAEZZA, P., FERRANTI, P. and ADDEO, F. (1996). Occurrence of five  $\alpha$ s1-casein variants in ovine milk. *Journal of Dairy Research*, 63, 49-59.
- CHICK, J.F., MARCHESSEAU, K. and GRIPON, J.C. (1997). Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO763. Purification and characterization. *International Dairy Journal*, 7, 169-172.
- CHOISY, C., DESMEZAUD, M., GRIPON, J.C., LAMBERET, G., LENOIR, J. y TOURNEUR, C. (1990). Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. En: *El Queso*. Ed. Omega, S.A. Barcelona. España.
- CHRISTEN, C. et VIRASORO, E. (1935). Présure vegetal extraction et propriétés. *Le Lait*, 15, 144-354.
- CHRISTOPHERSON, S.W. and GLASS, R.L. (1969). Preparation of milk fat methylesters by alcoholysis in a essentially nonalcoholic solution. *Journal of Dairy Science*, 52, 1.289-1.290.
- CLOSE, J.A. (1994). The concept of sensory quality. *Journal Society Cosmetic Chemistry*, 45, 95-107.
- COGAN, T.M., BARBOSA, M., BEUVIER, E., BIANCHI, B., COCCONCELLI, P.S., FERNANDES, Y., GÓMEZ, J., GÓMEZ, R., KALANTZOPOULOS, G., LEDDA, A., MEDINA, M., REA, M.C. and RODRÍGUEZ, E. (1997). Characterization of the lactic-acid bacteria in artisanal dairy-products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- COLLIN, J.C., MOULINS, I., ROLETREPECAUD, O., BAILLY, C. and LAGARDE, G. (1997). Detection of recombinant chymosins in calf rennet by enzyme-linked-immunosorbent-assay. *Le Lait*, 77, 425-431.
- CONSIDINE, T., HEALTY, A., KELLY, A.L. and McSWEENEY, P.L.H. (1998). Proteolytic specificity of elastase on bovine  $\beta$ -casein. *Food Chemistry*, 66, 463-470.
- CORDEIRO, M., JACOB, E., PUHAN, Z., PAIS, M.S. and BRODELIUS, P. (1992). Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*: A comparison to chymosin. *Milchwissenschaft*, 47, 683-687.
- CORDEIRO, M.C., PAIS, M.S. and BRODELIUS, P.E. (1994a). *Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of Cynara cardunculus* L. *Physiologia Plantarum*, 92, 645-653.
- CORDEIRO, M., XUE, Z.T., PIETRZAK, M., PAIS, M.S. and BRODELIUS, P.E. (1994b). Isolation and characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Molecular Biotechnology*, 24, 733-741.
- CORRADINE, C. and INNOCENTE, N. (1998). Sensory characteristics as quality index in DOP cheeses. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 49, 151-160.
- CORZO, N., VILLAMIEL, M., ARIAS, M., JIMÉNEZ-PÉREZ, S. and MORALES, F.J. (2000). The Maillard reaction during the ripening of Manchego cheese. *Food Chemistry*, 71, 255-258.
- COSENTINO, S. and PALMAS, F. (1997). Hygienic conditions and microbial contamination in 6 ewe's milk processing plants in Sardinia, Italy. *Journal of Food Protection*, 60, 283-287.
- COSTELL, E. (1983). El equipo de catadores como instrumento de análisis. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 23, 1-10.
- COUSSINS, C.M., SHARPE, M.E. and LAW, B.A. (1977). The bacteriological quality of milk for Cheddar cheesemaking. *Dairy Industries International*, 42, 12-18.
- CREAMER, L.K. and OLSON, N.F. (1982). Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631-646.
- CREAMER, L.K., LAWRENCE, R.C. and GILLES, J. (1985). Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 20, 185-203.
- CRISTINA, C. and BRAMLEY, J. (1981). The microbiology of raw milk. In: *Dairy Microbiology*. Vol I. Ed. Robinson, R. K. Elsevier Applied Science Publishers. London. UK.
- CUER, A. (1982). Les aromes de fromage. *Perfums cosmétique aromatique*, 44, 88-92.
- CUESTA, P., FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., GONZÁLEZ DE LLANO, D., MONTILLA, A. and RODRÍGUEZ, A. (1996). Evolution of the microbiological and biochemical characteristics of Afuega'l Pitu cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 79, 1.693-1.698.
- CZULAK, J., CONOCHIE, J., SUTHERLAND, B.J. and LEEUWEN, H.J.M. (1970). Further notes on the lactose, lactic acid and mineral equilibria in Cheddar cheese manufacture. *XVIII International Dairy Congress*. Sidney. 1E, 303.

## Bibliografía

- DALGLEISH, D.G. (1993). The enzymatic coagulation of milk. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volumen 1, P. F. Fox, Ed. Chapman & Hall, London. UK.
- DE LA FUENTE, M.A. y JUÁREZ, M. (1993). Revisión : Determinación de ácidos grasos libres en productos lácteos. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, **33**, 247-269.
- DE LA FUENTE, M.A., REQUENA, T. and JUÁREZ, M. (1997). Salt balance in ewe's and goat's milk during storage at chilling and freezing temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 82-88.
- DEETH, H.C. and FITZGERALD, C.H. (1976). Lipolysis in dairy products: A review. *Australian Journal of Dairy Technology*, **6**, 53-61.
- DELACROIX-BUCHET, A., BARILLET, F. and LAGRIFFOUL, G. (1994). Caracterisation de l'aptitude fromagère des laits de brebis Lacaune à l'aide d'un Formagraph. *Le Lait*, **74**, 175-186.
- DELACROIX-BUCHET, A., DEGAS, C., LMABERET, G. and VASSAL, L. (1996). Effect of AA and FF caprine alpha(s<sub>1</sub>)-casein variants on cheese-making. *Le Lait*, **76**, 217-241.
- DELUCA, G., ZANETTI, F. and STAMPI, S. (1997). Staphylococcus aureus in dairy-products in the Bologna area. *International Journal of Food Microbiology*, **35**, 267-270.
- DEMARIGNY, Y., BEUVIER, E., BUCHIN, S., POCHE, S. and GRAPPIN, R. (1997). Influence of raw-milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. 2. Biochemical and sensory characteristics. *Le Lait*, **77**, 151-167.
- DOI, H., KAWAGUCHI, F., IBUKI, F. and KANAMORI, M. (1979). Susceptibility of  $\kappa$ -casein components to various proteases. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology*, **25**, 33-36.
- DOI, E., SHIBATA, D. and MATOBA, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry*, **118**, 173-184.
- DOMINGOS, A., XUE, Z., GURUPRASAD, T., CLEMENTE, A., BLUNDELL, T., PAIS, M.S. and BRODELIUS, P. (1996). An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*: Purification, characterization, molecular cloning and modelling of its three-dimensional structure. Poster presented at the 5th International Aspartic Proteinase Conference, Banff, Canada, P7-6.
- DORDEVIC, J. (1971). Passage of calcium into curd and its dynamics in Kachkaval cheese manufactured. *Archiv za Poljoprivrednu Nanke*, **24**, 105.
- DRAKE, M.A., HARRISON, S.L., ASPLUND, M., BARBOSA-CANOVAS, G. and SWANSON, B.G. (1997). High pressure treatment of milk and effects on microbiological and sensory quality of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, **62**, 843-845.
- DRAKE, M.A., GERARD, P.D., TRUONG, V.D. and DAUBERT, C.R. (1999). Relationship between instrumental and sensory measurements of cheese texture. *Journal of Texture Studies*, **30**, 451-476.
- DULLEY, J.R. and GRIEVE, C.H. (1974). Volatile fatty acid production in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, **29**, 120-123.
- DURÁN, L., DAMASIO, M.H., COSTELL, E. and IZQUIERDO, K. (1989). Non-oral texture evaluation of mixed gels. Selection of parameters. In: *Food Properties and Computer-Aided Engineering of Food Processing System*. Singh, R.P. and Medina, A.G. (Ed.) Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- DYBING, S.T. and SMITH, D.E. (1998). The ability of phosphates or kappa-carrageenan to coagulate whey protein and the possible uses of such coagulant in cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, **81**, 309-317.
- EARLY, R. (1995). Guide to quality management systems for the food industry. Chapman and Hall. London. UK.
- ECK, A. (1990). El queso. Ed. Omega, S.A. Barcelona. España.
- EIGEL, W.N., BUTLER, J.L., ERNSTROM, C.A., FARREL, H.M., HARWALKAR, V.R., JENNESS, R. and WHITNEY, R. McL. (1984). Nomenclature of protein of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science*, **67**, 1.599-1.608.
- EL SODA, M., DESMAZEAUD, M.J. and BERGÈRE, J.L. (1978). Peptide hydrolases of *Lactobacillus casei*: Isolation and general properties of various peptidase activities. *Journal of Dairy Research*, **45**, 445-455.
- EL SODA, M., EL WAHAB, J.A., EZZAT, N., DESMAZEAUD, M.J. and ISMAIL, A. (1986a) The esterolytic and lipolytic activities of the Lactobacilli II. Detection of esterase system of *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Le Lait*, **66**, 431-442.
- EL SODA, M., FATHALLANH, S., EZZAT, N., DESMAZEAUD, M.J. and ABOUDONIA, S. (1986b) The esterolytic and lipolytic activities of the Lactobacilli. Detection of esterase system of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum*. *Science Aliments*, **6**, 545-557.
- EL SODA, M., DESMAZEAUD, M.J., LE BARS, D. and ZEVACO, C. (1986c). Cell wall associated proteinases in

## Bibliografía

- Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Protection*, **49**, 361-365.
- ENGELS, W.J.M. and VISSER, S. (1996). Development of cheese flavor from peptides and amino-acids by cell-free extracts of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 in a model system. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **50**, 3-17.
- ESCRICHE, I., SERRA, J., GUARDIOLA, V. and MULET, A. (1999). Composition of medium volatility (simultaneous distillation extraction-SDE) aromatic fraction of pressed, uncooked paste cheese (Mahón cheese). *Journal of Food Composition and Analysis*, **12**, 63-69.
- ESPIE, W.E. and MADDEN, R.H. (1997). The carbonation of chilled bulk milk. *Milchwissenschaft*, **52**, 249-253.
- ESQUIVEL, M.G., FONSECA, M.R., NOVAIS, J.M., CABRAL, J.S. and PAIS, M.S. (1988). Continuous coagulation of milk using immobilized cells of *Cynara cardunculus*. *Plant Cell Biotechnology*, **18**, 379-385.
- ESTEBAN, M., MARCOS, A. y CABEZAS, L. (1982). Sistema proteinasa del cardo *C. humilis* L. *Alimentaria*, **130**, 19-24.
- EXTERKATE, F.A., ALTING, A. C. and SLANGEN, C.J. (1995). Conversion on  $\alpha_{s1}$ -casein (24-199) fragment and  $\beta$ -casein under cheese conditions by chimosin and starter peptidases. *Systematic and Applied Microbiology*, **18**, 7-12.
- EXTERKATE, F.A., LAGERWERF, F.M., HAVERKAMP, J. and VANSCHALKWIJK, S. (1997). The selectivity of chimosin action on alpha(s1)-caseins and beta-caseins in solution is modulated in cheese. *International Dairy Journal*, **7**, 47-54.
- EXTERKATE, F.A., SLANGE, C. and SIEZEN, R.J. (2001). Effect of genetically modified *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinases with altered specificity on the course of casein degradation under cheese conditions. *International Dairy Journal*, **11**, 363-371.
- EZZAT, N.I., ZEVAÇO, C., EL SODA, M. and GRIPON, J.C. (1987). Partial purification and characterization of a cell wall associated proteinase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Milchwissenschaft*, **42**, 95-97.
- FARKYE, N.Y. and FOX, P.F. (1990). Objective indices of cheese ripening. *Trends in Food Science and Technology*, **1**, 37-40.
- FARKYE, N.Y. and FOX, P.F. (1991). Preliminary study on the contribution of plasmin to proteolysis in Cheddar cheese: Cheese containing plasmin inhibitor, 6-aminohexanoic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 786-793.
- FARO, C.J., ALFACE, J.S. and PIRES, E.V. (1987). Purification of a protease from the flowers of *Cynara cardunculus* L.. *Ciênc. Biol.*, **12**, 201.
- FARO, C.J. (1991). Purificação e caracterização físico-química da protease de *Cynara cardunculus* (L). Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra. Coimbra. Portugal.
- FARO, C.J., MOIR, A.J. and PIRES, E. (1992). Specificity of a milk-clotting enzyme extracted from the thistle *Cynara cardunculus* L.: action on oxidized insulin and  $\kappa$ -casein. *Biotechnology letter*, **14**, 841-846.
- FARO, C.J., VERISSIMO, P., LIN, Y., TANG, J. and PIRES, E.V. (1995). In: Aspartic proteinases: Structure, Function, Biology and Biomedical Implications. Takahashi, K. Ed. Plenum Press, New York, USA. pp. 373-377.
- FARRAG, S.A., EL-GAZZAR, F.E. and MARTH, E.H. (1992a). Use of the lactoperoxidase system to inactivate *Escherichia coli* 0157:H7 in a semi-synthetic medium and in raw milk. *Milchwissenschaft*, **47**, 15-18.
- FARRAG, S.A., EL-GAZZAR, F.E. and MARTH, E.H. (1992b). Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by the lactoperoxidase system in a semi-synthetic medium and in raw milk. *Milchwissenschaft*, **47**, 95-99.
- FERNÁNDEZ DE PALENCIA, P.F., MARTÍN, C., LÓPEZ, R. and PELÁEZ, C. (1997a). Proteolytic activity of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731 in a model cheese system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3.703-3.7087.
- FERNÁNDEZ DE PALENCIA, P.F., PELÁEZ, C., ROMERO, C. and MARTÍN-HERNÁNDEZ, M.C. (1997b). Purification and characterization of the cell-wall proteinase of *Lactobacillus-casei* subsp. *casei* Ifpl-731 isolated from raw goat's milk cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 3.401-3.405.
- FERNÁNDEZ DEL POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ-MARÍN, A. and NÚÑEZ, M. (1988a). Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewe's milk during ripening. *Journal of Dairy Research*, **55**, 457-464.
- FERNÁNDEZ DEL POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A. and NÚÑEZ, M. (1988b). Changes in the microflora of La Serena ewes' milk during ripening. *Journal of Dairy Research*, **55**, 449-455.
- FERNÁNDEZ DEL POZO, B., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ-MARÍN, A. y NÚÑEZ, M. (1989). El queso de La Serena: Tecnología, química, reología y microbiología. *Revista Española de Lechería*, **25**, 32-34.

## Bibliografía

- FERNÁNDEZ-ESPLÁ, M.D., FOX, P.F. and MARTÍN-HERNÁNDEZ, M.C. (1997). Purification and characterization of a novel serine aminopeptidase from *Lactobacillus casei* spp. *casei* ifpl-731. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1.624-1.628.
- FERNÁNDEZ-ESPLÁ, M.D. and FOX, P.F. (1998). Effect of adding *Propionibacterium shermanii* Ncdo-853 or *Lactobacillus casei* spp. *casei* Ifpl-731 on proteolysis and flavor development of Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1.228-1.234.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., TOMILLO, J. and NÚÑEZ, M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **52**, 189-196.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CABONELL, M., GAYA, P. and NÚÑEZ, M. (2004). Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation. *International Dairy Journal*, **14**, 701-711.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1975). Composición química y cambios de los componentes nitrogenados durante la maduración del queso de Los Pedroches. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., ESTEBAN, M.A. y MARCOS, A. (1977). Principales componentes químicos y parámetros físicos del queso de Los Pedroches. *Trabajos Científicos Universidad de Córdoba*, **7**, 1-16.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., BARRETO, J., y MARSILLA, B.A. (1978). Principales componentes nitrogenados del queso de La Serena. *Archivos de Zootecnia*, **27**, 365-373.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., RUIZ-ÍÑIGUEZ, J y MARCOS, A. (1984). Fraccionamiento de los componentes nitrogenados del queso Torta del Casar. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, **24**, 383-390.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., ALCALÁ, M., MARCOS, A. and ESTEBAN, M.A. (1986a). Measurement and calculation of water activity in Blue cheese. *Journal of Dairy Research*, **53**, 639-644.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., FLORIDO, S., ALCALÁ, M., MARCOS, A. y ESTEBÁN, M.A. (1986b). Composición en ácidos grasos de algunos quesos madurados por hongos. *Grasas y Aceites*, **37**, 152-155.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., FLORIDO, S. y MARCOS, A. (1986c). Aportación al estudio de la fracción lipídica de algunos quesos madurados comerciales. *Revista Agroquímica y tecnología de los alimentos*, **26**, 283-290.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., MARCOS, A., ALCALÁ, M. and ESTEBAN, M.A. (1989). Proteolysis of Cabrales cheese and other European blue vein cheese varieties. *Journal of Dairy Research*, **56**, 141-145.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., SANJUÁN, E. and MONTERO, E. (1991). A preliminary study of the chemical composition of Guía cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, **4**, 262-269.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., GÓMEZ, R. Y CARMONA, M.A. (1995). Queso de Grazalema: características y posibilidades de producción. *Boletín informativo* (Colegio Oficial de Veterinarios, Cádiz-Ceuta), **22**, 4-11.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. y GÓMEZ, R. (1997). Estudio de los quesos tradicionales de Andalucía. Publicaciones de la Universidad de Córdoba y obra Social y Cultural Cajasur. España.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., SÁNCHEZ, E., GÓMEZ, R., VIOQUE, M., MATA, C., y TEJADA, L. (1998). Influencia de la adición de cultivos lácticos y distintos tipos de cuajo sobre la flora indicadora y las características sensoriales de quesos de oveja artesanos. "XI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos" Pamplona, Septiembre 1998.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. and SANJUÁN, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewe's milk cheese. *Food Chemistry*, **64**, 177-183.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., SÁNCHEZ, E., GÓMEZ, R., MATA, C., VIOQUE, M., and TEJADA, L. (1999). A preliminary study of microbiological quality of cardoons of genus *Cynara*, L. used in manufacture of traditional cheese. *Milchwissenschaft*, **54**, 688-690.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., TEJADA, L. and GÓMEZ, R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, **82**, 464-468.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., GÓMEZ, R., TEJADA, L. y VIOQUE, M. (2003a). Un coagulante vegetal liofilizado, procedimiento para su preparación y sus aplicaciones en la fabricación de quesos. **Patente de Invención P200001593**. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., PRADOS, F., CALISTO, F., VIOQUE, M., SAMPAIO, P. and TEJADA, L. (2003b). Use of recombinant cyprosin in the manufacture of ewe's milk cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7.426-7.430.

## Bibliografía

- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., GÓMEZ, R., PRADOS, F., PINO, A. y VIOQUE, M. (2003c). Effect of freezing and frozen storage on physicochemical and sensorial characteristics of fully ripened sheep's milk cheese made with a powdered vegetable coagulant a rennet. *12<sup>th</sup> Congress of Food Science and Technology*. Chicago. USA.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2004). Internal Mould-Ripened Cheeses: characteristics, composition and proteolysis of main European blue vein varieties. *Italian Journal of Food Science*, **16**, 451-459.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., PRADOS, F., PINO, A., VIOQUE, M., GALÁN, E., MEDINA, M. Y GÓMEZ, R. (2004). Influencia de un coagulante vegetal en polvo en la maduración de quesos de oveja. *III Congreso español de Ingeniería de Alimentos*, CESIA. Pamplona. España.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2005). Comunicación personal.
- FERRAZZA, R.E., FRESNO, J.M., RIBEIRO, J.J., TORNADIJO, M.E., MANSUR, M. and FURTADO, M., (2004). Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. *Food Research International*, **37**, 149-155.
- FIGUEIREDO, A.C., FEVEREIRO, P., CABRAL, J.S., NOVAIS, J.M. and PAIS, M.S. (1987). Callus and suspension cultures for biomass production of *Cynara cardunculus* (Compositae). *Biotechnology Letter*, **9**, 213-218.
- FODA, F.A., HAMMOND, E.G., REINBOLD, G.W. and HOTCHKISS, D.K. (1974). Role of fat in flavour of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **57**, 1.137-1.142.
- FOLEGATTI, M.I.S., ANTUNES, A.J. and ROIG, S.M. (1997) Influence of 3 rennet types on the ripening process of the Brazilian Prato cheese. *Milchwissenschaft*, **52**, 318-322.
- FOLKERTSMA, B. and FOX, P.F. (1992). Use of Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, **59**, 217-224.
- FOLKERTSMA, B., FOX, P.F. and McSWEENEY, P.L.H. (1996). Acceleration of Cheddar cheese ripening at elevated temperatures. *International Dairy Journal*, **6**, 1.117-1.122.
- FONTECHA, J., PELÁEZ, C. and JUÁREZ, M. (1994). Biochemical characteristics of semihard ewe's milk cheese. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung*, **198**, 24-28.
- FOTI, S., MAUROMICALE, G., RACCUIA, S.A. and IERNA, A. (1993). Yield potential of *Cynara scolymus* L. as a biomass crop for energy production in Mediterranean environment. *Second European Symposium on industrial crops and products*. Pisa. Italy.
- FOTI, S., MAUROMICALE, G., RACCUIA, S.A., FALLICO, B., FANELLA, F. and MACCARONE, E. (1999). Possible alternative utilization of *Cynara* spp. I. Biomass, grain yield and chemical composition of grain. *Industrial Crops and Products*, **10**, 219-228.
- FOX, F.P. and WALLACE, J.M. (1997). Formation of flavour compounds. *Advances in Applied Microbiology*, **45**, 17-85.
- FOX, P.F. (1989a). The milk protein system. In: *Developments in Dairy Chemistry*. 4<sup>th</sup> Ed. Fox, P.F. (Ed). Elsevier Applied Science. London. UK.
- FOX, P.F. (1989b). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy science*, **72**, 1.379-1.400.
- FOX, P.F., LUCEY, J.A. and COGAN, T.M. (1990). Gylcolysis and related reactions during cheese manufactured and ripening. *CRC Critical Reviews of Food Science and Nutritions*, **29**, 237-253.
- FOX, P.F. and LAW, J. (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology*, **5**, 239-247.
- FOX, P.F. (1993). Cheese: An overview. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volumen 1, P.F. Fox, Ed. Chapman & Hall, London. UK.
- FOX, P.F. and STEPANIAK, L. (1993). Enzymes in cheese technology. *International Dairy Journal*, **3**, 509-530.
- FOX, P.F., SINGH, T.K., and McSWEENEY, P.L.H. (1994). Proteolysis in cheese during ripening. In *Biochemistry of Milk Product*, Eds A. T. Andrews and J. Varley, 1-31. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. UK.
- FOX, P.F., SINGH, T.K. and McSWEENEY, P.L.H. (1995). Biogenesis of flavor compounds in cheese. In: *Chemistry of Structure-function Relationships in Cheese* Manlin E.L. and Tunick M.H. (eds) Plenum Press. London. UK.
- FOX, P.F. and McSWEENEY, P.L.H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, **12**, 457-509.
- FOX, P.F., GUINEE, T.M. COGAN, T.M. and McSWEENEY, P.L.H. (2000). Biochemistry of Cheese Ripening. In: *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Inc. Maryland, USA.
- FRAU, M. (1998). Relación entre las características físicas, químicas y sensoriales del queso Mahón. *Tesis doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria. España.

## Bibliografía

- FRAU, M., SIMAL, S., FEMENIA, A., SANJÚAN, E. and ROSSELLO, C. (1999). Use of principal component analysis to evaluate the physical properties of Mahón cheese. *European Food Research and Technology*, **210**, 73-76.
- FREITAS, A.C. and MALCATA, F.X. (1996). Influence of milk type, coagulant, salting procedure and ripening time on the final characteristics of Picante cheese. *International Dairy Journal*, **6**, 1.099-1.116.
- FREITAS, A.C. and MALCATA, F.X. (1998a). Lipolysis in Picante cheese: Influence of milk type and ripening time on free fatty-acid profile. *Le Lait*, **78**, 251-258.
- FREITAS, A.C. and MALCATA, F.X. (1998b). Effects of different ripening procedures on the final characteristics of Picante cheese. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, **207**, 281-291.
- FREITAS, A.C. and MALCATA, F.X. (1999). Technological optimisation of Picante cheese using microbiological, chemical and physical criteria. *Journal of Food Engineer*, **41**, 163-175.
- FREITAS, A.C., PAIS, C., MALCATA, F.X. and HOGG, T.A. (1996). Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. *Journal of Food Protection*, **59**, 155-160.
- FREITAS, A.C., FRESNO, J.M., PRIETO, B., MALCATA, F.X. and CARBALLO, J. (1997). Effects of ripening time and combination of ovine and caprine milks on proteolysis of Picante cheese. *Food Chemistry*, **60**, 219-229.
- FREITAS, A.C., PINTADO, A.E., PINTADO, M.E. and MALCATA, F.X. (1999) Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis. *International Dairy Journal*, **9**, 593-603.
- FREITAS, A.C., MACEDO, A.C. and MALCATA F.X. (2000). Review: Technological and organoleptic issues pertaining to cheese with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International*, **6**, 351-370.
- FRESNO, J.M., TORNADIJO, M.E., CARBALLO, J., GÓZALEZ-PRIETO, J. and BERNARDO, A. (1996). Characterization and biochemical-changes during the ripening of a Spanish craft goats milk cheese (Armada variety). *Food Chemistry*, **55**, 225-230.
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**, 365-368.
- FURTADO, M.M. and CHANDAN, R.C. (1985). Ripening changes in a blue-mould surface ripening cheese from goat's milk. *Journal of Food Science*, **50**, 545-546.
- GAINS, N. and THOMSON, D.M.H. (1990). The relation of repertory grid/generalised procrustes analysis solutions to the dimensional perception: Application to Musell color stimuli. *Journal of Sensory Studies*, **5**, 177-192.
- GALÁN, E. (2005). Estudio de las características físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales de quesos de oveja elaborados con mezcla de cuajo animal y *Cynara cardunculus*. Tesis Doctoral en fase experimental. Córdoba. España.
- GAMBELLI, L., BELLONI, P., INGRAO, G., PIZZOFERRATO, L. and SANTARONI, G.P. (1999). Minerals and trace elements in some Italian dairy products. *Journal of Food Composition and Analysis*, **12**, 27-35.
- GARCÍA-FONTÁN, M.C., MICHINEL, M., FRANCO, I., PRIETO, B., y CARBALLO, J. (1999). La calidad microbiológica de la leche destinada a la fabricación de queso. *Alimentaria*, **308**, 53-60.
- GARCÍA-OLMEDO, R. y COLL HELLÍN, L. (1976). Contribución al estudio de la grasa de leches de ovejas españolas. Departamento de Investigación Bromatológica (C.S.I.C). Madrid.
- GARCÍA-OLMEDO, R., CARBALLIDO, A. y ARMÁEZ, M. (1979). Contribución al estudio de la grasa de la leche de cabra. *Anales de Bromatología*, **31**, 227-270.
- GARCÍA-RUIZ, A. (1996). Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración del queso Manchego e identificación de la microbiota. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. Ciudad Real. España.
- GARCÍA-RUIZ, A., CABEZAS, L., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J. and CABEZUDO, M.D. (1998). Prediction of the ripening times of Manchego cheese using multivariate statistical analyse: A preliminary study. *Zeitschrift Lebensmittel Untersuchung Forschung A*, **206**, 382-386.
- GARDE, S., GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1997). Acceleration of flavor formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. *Biotechnology Letters*, **19**, 1.011-1.014.
- GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1983) Accelerated decrease of enterobacteriaceae counts during ripening of raw milk Manchego cheese by lactic culture inoculation. *Journal of Food Protection*, **46**, 305-308.
- GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1987). Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and *Salmonella* in raw ewes' milk. *Journal of Applied Bacteriology*, **62**, 321-326.
- GAYA, P., MEDINA, M., BAUTISTA, L. and NÚÑEZ, M. (1988). Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus*

## Bibliografía

- aureus* behaviour in Manchego cheese. *International of Food Microbiology*, **6**, 249-257.
- GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ-MARÍN, M. and NÚÑEZ, M. (1990). Accelerate ripening of ewe's milk Manchego cheese: The effect of elevated ripening temperatures. *Journal of Dairy Science*, **73**, 26-32.
- GAYA, P., CARRERA, E., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1999). Formation of hydrophobic and hydrophilic peptides during the manufacture of ewe's milk Manchego cheese using different milk coagulants. *Milchwissenschaft*, **54**, 556-558.
- GEURTS, T.J., WALSTRA, P. and MULDER, H. (1980). Transport of salt and water during salting of cheese. 2-Quantities of salt taken up and moisture lost. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **34**, 229-237.
- GHODDUSI, H.B. and ROBINSON, R.K. (1996). Enumeration of starter cultures in fermented milks. *Journal of Dairy Research*, **63**, 151-158.
- GINZINGER, W., JAROS, D., LAVANCHY, P. and ROHM, H. (1999). Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase. Physical and sensory properties, and conclusions. *Le Lait*, **79**, 411-421.
- GOBBETTI, M., FOX, P.F., SMACCHI, E., STEPANIAC, L. and DAMIANI, P. (1996). Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum*-2739. *Journal of Food Biochemistry*, **20**, 227-246.
- GÓMEZ, M.J., GAYA, P., NÚÑEZ, M. and MEDINA, M. (1996). Debiting activity of peptidases from selected *Lactobacilli* strains in models cheeses. *Milchwissenschaft*, **51**, 315-319.
- GÓMEZ, R., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. and MARCOS, A. (1987). Composición en ácidos grasos libres y combinados de algunas variedades de quesos comerciales. *Grasas y Aceites*, **38**, 23-26.
- GÓMEZ, R. (1992). Actividad de agua de los alimentos. Métodos de determinación. *Alimentaria*, **219**, 77-82.
- GÓMEZ, R., SÁNCHEZ, E., VIOQUE, M., MATA, C. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1996). Efecto de la conservación en aceite y al vacío sobre la composición química de los quesos de oveja artesanos. *I Congreso Nacional de Nutrición Básica y Aplicada*. Madrid. España.
- GÓMEZ, R., CARMONA, M.A., SÁNCHEZ, E., VIOQUE, M., MATA, C. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1998). Características Físico-químicas y bioquímicas de los quesos de oveja tradicionales de Andalucía. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **17**, 79-84.
- GÓMEZ, R., VIOQUE, M., SÁNCHEZ, E., MATA, C., TEJADA, L. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2000). Microbial study of farmhouse ewes cheese during storage in olive oil. *Acta Microbiologica Hungarica*, **47**, 53-61.
- GÓMEZ, R., SANCHEZ, E., VIOQUE, M., FERREIRA, J., TEJADA, L. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2001). Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara L.* *Milchwissenschaft*, **56**, 16-19.
- GONZÁLEZ DE LLANO, D. and SANTA-MARÍA, G. (1997a). Analysis of whey proteins during ripening of Afuega'l Pitu cheese by reversed phase HPLC. *Food Science and Technology International*, **3**, 445-449.
- GONZÁLEZ DE LLANO, D., RAMOS, M., POLO, C., SANZ, J. and MARTÍNEZ-CASTRO, I. (1990). Evolution of the volatile components of an artisanal blue cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, **73**, 1.676-1.683.
- GONZÁLEZ DE LLANO, D., RAMOS, M., RODRÍGUEZ, A., MONTILLA, A. and JUÁREZ, M. (1992). Microbiological and physicochemical characteristics of Gamonedo blue cheese during ripening. *International Dairy Journal*, **2**, 121-135.
- GONZÁLEZ, J., MAS, M. y LÓPEZ GALLEGO, F. (1991). Características de la leche de oveja merina y del queso de La Serena producidos en tres explotaciones tipo. *Revista de Investigaciones Agrarias: Producción y Sanidad Animal*, **6**, 143-155.
- GONZÁLEZ, J., LOZANO, M., MAS, M., MENDIOLA, J. y ROA, I. (1997). Características de las leches y quesos de la D.O. queso de La Serena. *Alimentaria*, **285**, 35-39.
- GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A., ESTEBAN, E.M. and CABEZAS, L. (1999). Physicochemical and sensory properties of Spanish ewe milk cheeses and consumer preferences. *Milchwissenschaft*, **54**, 326-329.
- GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A., POVEDA, J.M. and CABEZAS, L. (2001a). Sensory and chemical evaluation of Manchego cheese and other cheese varieties available in the Spanish market. *Journal of Food Quality*, **24**, 157-165.
- GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A., POVEDA, J.M., GARCÍA-RUIZ, A. and CABEZAS, L. (2001b). Changes in chemical sensory and rheological characteristics of Manchego cheeses during ripening. *Journal of Sensory Studies*, **16**, 361-371.
- GOURSAUD, J. (1991). Composición y propiedades físico-químicas de la leche. En: *Leche y productos lácteos, vaca, oveja y cabra*. 1. La leche de la mama a la lechería. Ed F.M. Luquet. Editorial Acribia. Zaragoza. España.



## Bibliografía

- GRAPPIN, R.T., RANK, T.C. and OLSON, N.F. (1985). Primary proteolysis during ripening. *Journal of Dairy Science*, **68**, 531-540.
- GRAPPIN, R., LEFIER, D., DASEN, A. and POCHET, S. (1993). Characterizing ripening of Gruyère de Comté: Influence of time, temperature and salting conditions on eye and slit formation. *International Dairy Journal*, **3**, 313-328.
- GRAPPIN, R. and BEUVIER, E. (1997). Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*, **7**, 751-761.
- GREEN, M.L. and GRANDINSON, A.S. (1987). Secondary non-enzymatic phase of rennet coagulation and post-coagulation phenomena. In *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology*, Vol. 1 (P.F. Fox Ed.) pp 97-134. Elsevier Applied Science, New York, USA.
- GRIPON, J.C., MONNET, V., LAMBERTE, G. and DESMAZEAUD, M.J. (1991). Microbial enzymes in cheese ripening. In: *Food Enzymes*. P.F. Fox Ed Elsevier Applied Science. London. UK.
- GROSCLAUDE, F., MAHER, M.F., MERCIER, J.C. et RIBADEAU-DUMAS, B. (1973). Structure primaire de la caseine  $\alpha_{s1}$  et de la caseine  $\beta$  bovine. *European Journal of Biochemistry*, **40**, 323-327.
- GROSCLAUDE, F. (1995). Genetic polymorphism of milk proteins. *Bulletin International Dairy Federation*, **304**, 2-3.
- GRUFFERTY, M.B. and FOX, P.F. (1988). Functional properties of casein hydrolysed by alkaline milk proteinase. *New Zealand Dairy Science and Technology*, **23**, 95-99.
- GUINDEO, M.J., ASTIASARÁN, I. y BELLO, J. (1990). Estudio del proceso de maduración del queso Urbasa elaborado de forma artesanal con leche de oveja de raza Latxa. *Revista Agroquímica y de Tecnología de los Alimentos*, **30**, 469-480.
- GUINEE, T.P. and FOX, P.F. (1993). Salt in cheese: Physical, chemical and biological aspects. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 1, P.F. Fox Ed. Chapman & Hall. London. UK.
- GUO, M.R. and KINDSTEDT, P.S. (1995). Age-related-changes in the water phase of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, **78**, 2.099-2.107.
- GUO, M.R., GILMORE, J.A. and KINDSTEDT, P.S. (1997). Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, **80**, 3.092-3.098.
- GUPTA, C.B. and ESKIN, N.A.M. (1977). Potential use of vegetable rennet in the production of cheese. *Food Technology*, **31**, 62-64.
- HARDY, I. (1997). L'activité de léau et le salage des fromages. In: *Le Fromage*. 3<sup>a</sup> Ed. (Coordinator, A. Eck), Technique et Documentation (Lavoisier). Paris, pp. 62-85.
- HASSAN, A.N. and FRANK, J.A. (1997). Modification of microstructure and texture of rennet curd by using a capsule-forming-non-ropy lactic culture. *Journal of Dairy Research*, **64**, 115-121.
- HEBERT, E.M., MURGA, M.L., DE VALDEZ, G.F. and DE GIORI, G.S. (1998). Proteolysis plays a key role the growth of *Lactobacillus acidophilus* in milk. *Milchwissenschaft*, **53**, 184-187.
- HEGAZY, F.Z. and ABO-ENAGA, I.G. (1987a). Factors affecting the caseinolytic activity of *Lactobacillus plantarum*. *Nahrung*, **31**, 199-206.
- HEGAZY, F.Z. and ABO-ENAGA, I.G. (1987b). Proteolytic activities of crude cell-free extract of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Nahrung*, **31**, 225-232.
- HEIMGARTNER, U., PIETRZAK, M., GEERTSEN, R., BRODELIUS, P. DA SILVA FIGUEIREDO, A.C. and PAIS, M.S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, **29**, 1.405-1.410.
- HELLEMAN, U., TUORILA, H., SALOVAARY, H. and TARKKONEN, L. (1987). Sensory profiling and multidimensional scaling of selected finish rye breads. *International Journal of Food Science and Technology*, **22**, 693-700.
- HEMME, D., BOUILLANE, C., METRO, F. and DESMAZEAUD, M.J. (1982). Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sciences des Aliments*, **2**, 113-123.
- HEYNEMANN, H. and NOBLE, A.C. (1987). Descriptive analysis of commercial Cabernet. Sauvignon wines from California. *American Journal Enology and Viticulture*, **38**, 41-44.
- HICKS, C.L., ONUORAH, C., O'LEARY J., and LAUGLOIS, B.E. (1986). Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield—a summation. *Journal of Dairy Science*, **69**, 649-657.
- HOLLAND, R. and COOLBEAR, T. (1996). Purification of tributyrin esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* E8. *Journal of Dairy Research*, **63**, 131-138.
- HOLLAR, C.M., PARRIS, N., HSIEH, A., and COCKLEY, K.D. (1995). Factors affecting the denaturation and aggregation of whey proteins in heated whey-protein concentrate mixtures. *Journal of Dairy Science*, **78**, 260-267.
- HOLSINGUER, V.H., SMITH, P.W. and TUNIK, M.H. (1995). Overview: Cheese

## Bibliografía

- chemistry and rheology. In: *Chemistry of Structure-Function: Relationships in cheese*, E. L. Malin & M. H. Tunik, Eds, Plenum Press, New York. USA.
- HOLT, C. (1992). Structure and stability of bovine casein micelles. *Advances in Protein Chemistry*, **43**, 63-113.
- HOO, J.K. and LINDASAY, R.C. (1991). Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian cheese flavors. *Journal of Food Science*, **56**, 1.241-1.247.
- HORT, J. (1996). The relationships between the texture, physical and chemical properties of Cheddar cheese developing a methodology. *Food Science and Technology*, **10**, 94-99.
- HORT, J., LEGRYS, G. and WOODMAN, J. (1997a). The relationships between the chemical, rheological and textural properties of Cheddar cheese. *Le Lait*, **77**, 587-600.
- HORT, J., LEGRYS, G. and WOODMAN, J. (1997b). Changes in the perceived textural properties of Cheddar cheese during maturation. *Journal of Sensory Studies*, **12**, 255-266.
- HOUGH, G., CALIFANO, A.N. BERTOLA, N.C., BEVILACQUA, A.E., MARTÍNEZ, E., JOSE VEGA, M. and ZARITZKY, N.E. (1995). Partial least squares correlations between sensory and instrumental measurements of flavor and texture for Reggiano grating cheese. *Food Quality and Preference*, **7**, 47-53.
- HUNTER, E.A. and MUIR, D.D. (1993). Sensory properties of fermented milks: Objective reduction of an extensive sensory vocabulary. *Journal of Sensory Studies*, **8**, 213-227.
- HYNES, E., DELACROIX-BUCHET, A., MEINARDI, C.A. and ZALAZAR, C.A. (1999). Relation between pH, degree of proteolysis and consistency in soft cheeses. *Australian Journal of Dairy Technology*, **54**, 24-27.
- IBÁÑEZ, F.C., TORRES, M.I., ORDÓÑEZ, A.I. and BARCINA, Y. (1995). Effect of composition and ripening on casein breakdown in Idiazábal cheese. *Chemical Microbiology Technology Lebensmittel*, **17**, 37-44.
- IBÁÑEZ, F.C., LOYGORRI, S., ORDÓÑEZ, A.I. y TORRE, P. (1998). Evaluación instrumental y sensorial de la textura en queso de oveja con denominación de origen. *Alimentaria*, **292**, 49-53.
- IBIAMA, E. and GRIFFITHS, M.W. (1987). Studies on a milk-coagulating enzyme, "Calotropain", obtained from sodom apple (*Calotropis procera*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1**, 157-162.
- ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1985) Ecología microbiana de los alimentos. Productos alimenticios. Vol 2. Ed. Acibia, S.A. Zaragoza. España.
- IDF. International Dairy Federation.(1966) Detection of vegetable fat in milk fat. Int. Standard 32. Bruselas.
- ISSANCHOU, S., SCHLICH, P., and LESSCHAEVE, I. (1997). Sensory analysis methodological aspects relevant to the study of cheese. *Le Lait*, **77**, 5-12.
- IVERSON, J.L. and SHEPPARD, A.J. (1989). Detection of adulteration in cow, goat and cheep cheese utilizing gas-liquid chromatographic fatty acid data. *Journal of Dairy Science*, **72**, 1.707-1.712.
- IWANCZAK, M., REPS, A., WISNIEWSKA, K., JARMUL, I. and KOLAKOWSKI, P. (1995). Possibility for increasing the potassium content in ripening cheeses. *Milchwissenschaft*, **60**, 619-622.
- JACK, F.R., PIGGOTT, J.R. and PATERSON, A. (1993). Discrimination of texture and appearance in Cheddar using consumer free-choice profiling. *Journal of Sensory Studies*, **8**, 167-176.
- JAMESON, G.W. (1990). Cheese with less fat. *Australian Journal of Dairy Technology*, **45**, 93-98.
- JAROS, D., GINZINGER, W., TSCHAGER, E., MAYER, H.K. and ROHM, H. (1997). Effects of water addition on composition and fracture properties of Emmental cheese. *Le Lait*, **77**, 467-477.
- JAROS, D., JENNY, B. and ROHM, H. (1998). Characteristics and description of Vorarlberger-Bergkase - 3 - sensory properties. *Milchwissenschaft*, **53**, 143-14.
- JARRET, W.D., ASTON, J.W. and DULLEY, J.R. (1982). A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, **37**, 55-58.
- JAY, M. (1994). Microbiología moderna de los alimentos. 3ª Ed. Ed. Acibia, S.A. Zaragoza. España.
- JOHNSON, E.A., NELSON, J.H. and JOHNSON, M. (1990). Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. *Journal of Food Protection*, **53**, 441-452, 519-533, 610-628.
- JORDAN, K.N. and COGAN, T.M. (1993). Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, **32**, 47-55.
- JUÁREZ, M., ALONSO, L. y RAMOS, M. (1983). Lipólisis y proteólisis del queso Cabrales durante la maduración. *Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **23**, 541-551.
- JUÁREZ, M., RAMOS, M., GOICOECHEA, A. and JIMÉNEZ-PÉREZ, S. (1984). Main components nitrogen fractions and mineral

## Bibliografía

- elements of Manchego ewe's milk. *M. Chem. Microbiol. Technol. Lebensmittel.*, **8**, 143-146.
- KALANTZOPOULOS, G.C. (1993). Cheese from ewes' and goats' milk. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 1, P.F. Fox, Ed Chapman & Hall, London. UK.
- KAMINOAWA, S., YAMAUCHI, K., MIYAZAWA, S. and KOYA, Y. (1980). Degradation of caseins components by acid protease of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, **63**, 701-709.
- KAMINOAWA, S., YAN, T.R., AZUMA, N. and YAMAUCHI, Y. (1986). Identification of low molecular weight peptides in Gouda-type cheese and evidence for the formation of these peptides from 23 N-terminal residues of  $\alpha_{s1}$ -casein by proteinases of *Streptococcus cremoris* H61. *Journal of Food Science*, **51**, 1.253-1.260.
- KANDARAKIS, I., MOSCHOPOULOU, E. and ANIFANTAKIS, E. (1999). Use of fermentation produced chymosin from *Escherichia coli* in the manufacture of Feta cheese. *Milchwissenschaft*, **54**, 24-26.
- KASPRZAK, K., WENDORFF, W.L. and CHEN, C.M. (1994). Freezing qualities of Cheddar-type cheeses containing varied percentages of fat, moisture, and salt. *Journal of Dairy Science*, **77**, 1.771-1.782.
- KATSIARI, M.C., VOUTSINAS, L.P., ALICHANIDIS, E. and ROUSSIS, I.G. (1997). Reduction of sodium content in Feta cheese by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, **7**, 465-472.
- KATSIARI, M.C., VOUTSINAS, L.P., ALICHANIDIS, E. and ROUSSIS, I.G. (1998). Manufacture of Kefalograviera cheese with less sodium by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chemistry*, **61**, 63-70.
- KHALID, N.M. and MARTH, E.H. (1990). Lactobacilli-their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *Journal of Food Processing and Preservation*, **21**, 379-393.
- KHAN, J.A., GIJS, L., BERGER, C., MARTÍN, N., PIRAPREZ, G., SPINLER, H.E., VULFSON, E.N. and COLLIN, S. (1999). Combinatorial approach to flavor analysis. 1. Preparation and characterization of a s-methyl thioester library. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3.269-3.273.
- KILIC, M., MUTHUKUMARAPPAN, K. and SUNSARAM, G. (1997). Kinetics of nonenzymatic browning in Cheddar cheese powder during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, **21**, 379-393.
- KIMURA, T., SAGARA, Y., FUKUSHIMA, M. and TANEYA, S. (1992). Effect of pH on submicroscopic structure of String cheese. *Milchwissenschaft*, **47**, 574-582.
- KINDSTEDT, P. (1993). Effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of Mozzarella cheese. *Food Science and Nutrition*, **33**, 167-187.
- KINSTEDT, P.S. and KOSIKOSWSKI, F.V. (1988). Calcium, phosphorus and sodium concentrations in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **71**, 285-289.
- KINSELLA, J.E. and HWANG, D.H. (1977). Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **8**, 191-228.
- KOSIKOWSKI, F.V. (1970). Cheese and fermented milk foods. 3<sup>rd</sup>, p. 340, Ed Edwards Brothers, Inc. Michigan. USA.
- KOSIKOWSKI, F.V. and MISTRY, V. (1997a). In: *Cheese and fermented milk foods*. Vol. 1. Origins and Principles. Ed. F.V. Kosikowski and Associates. Michigan. USA.
- KOSIKOWSKI, F.V. and MISTRY, V. (1997b). In: *Cheese and fermented milk foods*. Vol. 2. 3<sup>rd</sup> Edition. Procedures and Analysis. F.V. Kosikowski, L.L.C. Ed. Conn. USA.
- KOUBAA, I., DAMAK, M., MCKILLOP, A. and SIMMONDS, M. (1999). Constituents of *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia*, **70**, 212-213.
- KRAUSE, W., PARTZSCH, M. and KOCH, J. (1999). Chymosin catalysed hydrolysis of isolated beta-casein in diluted solution and in systems with reduced water content. *Milchwissenschaft*, **54**, 569-573.
- KUCHROO, C.N. and FOX, P.F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheeses: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, **37**, 331-335.
- KUMOSINSKI, T.F., UKNALIS, J.J., COOKE, P.H. and FARRELL, H.M.J.R. (1996). Correlation of refined models for casein submicelles with electron microscopic studies of casein. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **29**, 326-333.
- KUNGI, E.R.S., MIERAU, I., HAGTING, A., POOLMAN, B. and KONINGS, W.N. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek*, **70**, 187-221.
- LAAN, H. and KONINGS, L. (1989). Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied Environmental Microbiology*, **55**, 3.101-3.106.
- LABUZA, T. P. (1980). The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. *Food Technology*, **20**, 523-526.
- LACASA, A. (1986). Quesos de pasta prensada de oveja y cabra. *Revista Española de Lechería.*, **7**, 11-17.

## Bibliografía

- LAI, D.T., MACKENZIE, A.D., OCONNOR, C.J. and TURNER, K.W. (1997). Hydrolysis characteristics of bovine-milk fat and monoacid triglycerides mediated by pregastric lipase from goats and kids. *Journal of Dairy Science*, **80**, 2.249-2.257.
- LAMAS, E.M., BARROS, R.M., BALCAO, V.M. and MALCATA, F.X. (2001). Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme and Microbial Technology*, **28**, 642-652.
- LAMBERET, G., DEGAS, C., DELACROIX-BUCHET, and VASSAL, L. (1996). Effect of characters linked to A-caprine and F-caprine alpha(s1)-casein alleles on goat flavor –cheese-making with protein-fat exchange. *Le Lait*, **76**, 349-361.
- LANE, C.N. and FOX, P.F. (1997). Role of starter enzymes during ripening of Cheddar cheese made from pasteurized milk under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, **7**, 55-63.
- LANE, C.N. and FOX, P.F. (1999). The individual or combined action of chymosin and plasmin on sodium caseinate or beta-casein in solution: Effect of NaCl and pH. *Le Lait*, **79**, 423-434.
- LANE, C.N., FOX, P.F., JOHNSTON, D.E. and McSWEENEY, P.L.H. (1997). Contribution of coagulant to proteolysis and textural changes in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, **7**, 453-464.
- LANGSRUD, T., SORHAUG, T. and VEGARUD, G.E. (1995). Protein-degradation and amino-acid-metabolism by propionibacteria. *Le Lait*, **75**, 325-330.
- LARPENT, J. P. (1994). Leche y productos no fermentados en C.M. Bourgeois, J. F. Mesclé y J. Zucca. *Microbiología Alimentaria I. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Ed. Acribia, Zaragoza, pp 472-525.
- LARSEN, L.B., BENFELDT, C., RASMUSSEN, L.K. and PETERSEN, T.E. (1996). Bovine-milk procathepsin-D and cathepsin-D: Coagulation and milk protein-degradation. *Journal of Dairy Research*, **63**, 119-130.
- LARSSON, K.I., ANDREN, A., GEURTS, T.J., DEROOS, A.L. and WALSTRA, P. (1997). Association of chymosin with artificial casein micelles as influenced by micelle composition and pH. *International Dairy Journal*, **7**, 43-46.
- LAVANCHY, P., BÉRODIER, F., ZANNONI, M., NÔEL, Y., ADAMO, C., SQUELLA, J. et HERRERO, L. (1993). L'évaluation sensorielle de la texture des fromages à pâte dure ou semi-dure. Etude interlaboratoires. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **26**, 59-68.
- LAW, B.A. (1987). In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* – 1. Ed. P.F. Fox. Elsevier Applied Science, London. UK.
- LAW, B.A., SHARPE, M.E., MABBIT, L.A. and COLE, C.B. (1972). In: *Sampling Microbiological Monitoring of Environments*. Ed. R.G. Board and D.W. Lovelock. Academic Press. London. UK.
- LAWRENCE, R.C., CREAMER, L.K. and GILLES, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, **70**, 1.748-1.760.
- LAXMINARAYANA, H. and DASTUR, N.M. (1968). *Dairy Science Abstracts*, **30**, 177-231.
- LE GRAET, Y. and BRULÉ, G. (1988). Migration des macro et oligo-éléments dans un fromage à pâte molle de type Camembert. *Le Lait*, **68**, 219-234.
- LE GRAET, Y. and GAUCHERON, F. (1999). Ph-induced solubilization of minerals from casein micelles: Influence of casein concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, **66**, 215-224.
- LE GRAET, Y., LEPIENNE, A., BRULÉ, G. and DUCRUET, P. (1983). Migration du calcium et des phosphates inorganiques dans les fromages à pâte molle de type Camembert au cours de l'affinage. *Le Lait*, **68**, 317-332.
- LEMIEUX, L. and SIMARD, R.E. (1991). Bitter flavour in dairy products I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Le Lait*, **71**, 599-636.
- LENOIR, J. (1963). Note sur la composition en matières azotées des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. *Annals Technological Agricultural*, **12**, 51.
- LEUSCHNER, R.G.K., KURIHARA, R. and HAMMES, W.P. (1998). Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic-amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, **44**, 15-20.
- LEUSCHNER, R.G.K., KURIHARA, R. and HAMMES, W.P. (1999). Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, **79**, 1.141-1.144.
- LIMSOWTIN, G.K.Y. and POWELL, I.B. (1996). Milk quality for cheese-making. *Australian Journal of Dairy Technology*, **51**, 98-100.
- LIMA-COSTA, E., NOVAIS, J.M, PAIS, M.S and CABRAL, J.S. (1988). Effect of aeration on *Cynara cardunculus* plant cell cultures. *Plant Cell Biotechnology*, **18**, 343-350.
- LINDGREN, S.E. and DOBROGOSZ, W. (1990). Antagonistic activities of lactic acid

## Bibliografía

- bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiological Revision, **87**, 149-164.
- LINDEMANN, A.R., MEERDINK, G., MEULENBERG, M.T.G. and JONGEN, W.M.F. (1999). Consumer oriented technology development. *Trends in Food Science and Technology*, **9**, 409-414.
- LO, C.G. and BASTIAN, E.D. (1979). Chymosin activity against  $\alpha_{s1}$ -casein in model systems: influence of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, **80**, 615-619.
- LOBATO-CALLEROS, C., VERNON-CARTER, E.J., GUERRERO-LEGARRETA, I., SORIANO-SANTOS, J. and ESCALONA-BEUNDIA, H. (1997). Use of fat blends in cheese analogy: Influence on sensory and instrumental textural characteristics. *Journal of Texture Studies*, **28**, 619-632.
- LODES, A., KRAUSE, I., BUCHBERGER, J., AUMANN, J. and KLOSTERMEYER, H. (1996a). The Influence of genetic-variants of milk-proteins on the compositional and technological properties of milk. 1. Casein micelle size and the content of nonglycosylated kappa-casein. *Milchwissenschaft*, **51**, 368-373.
- LODES, A., KRAUSE, I., BUCHBERGER, J., AUMANN, J. and KLOSTERMEYER, H. (1996b). The influence of genetic-variants of milk-proteins on the compositional and technological properties of milk. 2. rennet coagulation time and firmness of the rennet curd. *Milchwissenschaft*, **51**, 543-548.
- LÓPEZ GALLEGO, F. (1996). Avance de estudios sobre la productividad quesera de la oveja merina. Caracterización general. Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto (FEAGAS). 9, año IV, **enero-junio**.
- LÓPEZ-DÍAZ, T.M., ALONSO, C., SANTOS, J., GARCÍA, M.L. and MORENO, B. (1995). Microbiological changes during manufactured and ripening of a naturally ripened blue cheese (Valdeón, Spain). *Milchwissenschaft*, **50**, 381-384.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G., AMIGO, L., and RAMOS, M. (1994). Genetic polymorphism of whey proteins in two ovine breeds. *Milchwissenschaft*, **49**, 123-125.
- LÓPEZ-GÁLVEZ, G., JUÁREZ, M. and RAMOS, M. (1995). Two dimensional electrophoresis and immunoblotting for the study of ovine whey protein polymorphism. *Journal of Dairy Research*, **62**, 311-320.
- LUCEY, J.A. and FOX, P.F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *Journal of Dairy Science*, **76**, 1.714-1.724.
- LUYTEN, H., VAN VLIET, T. and WALSTRA, P. (1987). Characterization of the consistency of Gouda cheese: Rheological properties. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **45**, 33-53.
- LYNCH, C.M., McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., COGAN, T.M. and DRINAN, F.D. (1997). Contribution of starter and nonstarter Lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with controlled microflora. *Le Lait*, **77**, 441-459.
- MACEDO, A.C., MALCATA, F.X. and HOGG, T.A. (1995). Microbiological profile in Serra ewes cheese during ripening. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**, 1-11.
- MACEDO, A.C. and MALCATA, F.X. (1997a). Changes of lactose, lactic-acid, and acetic-acid contents in Serra cheese during ripening. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, **204**, 453-455.
- MACEDO, A.C. and MALCATA, F.X. (1997b). Changes of mineral concentrations in Serra cheese during ripening and throughout the cheese-making season. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, **74**, 409-415.
- MACEDO, A.C. and MALCATA, F.X. (1997c). Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung A*, **205**, 25-30.
- MACEDO, A.C. and MALCATA, F.X. (1997d). Technological optimisation of the manufacture of Serra cheese. *Journal of Food Engineering*, **31**, 433-447.
- MACEDO, A C. and MALCATA, F.X. (1997e). Secondary proteolysis in Serra cheese during ripening and throughout the cheese-making season. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, **204**, 173-179.
- MACEDO, A.C. and MALCATA, F.X. (1997f). Hydrolysis of alpha(s) and beta-caseins during ripening of Serra cheese. *Food Chemistry*, **58**, 43-48.
- MACEDO, A., MALCATA, F.X. and OLIVEIRA, J.C. (1993a). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese. A review. *Journal of Dairy Science* **76**, 1.725-1.739.
- MACEDO, I., FARO, C. and PIRES, E.V. (1993b). Specificity and Kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L) toward bovine and kappa-casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 1.537-1.540.
- MACEDO, A.C., COSTA, M.L., and MALCATA, F.X. (1996a). Changes in the microflora of Serra cheese evolution throughout ripening time, lactation period and axial location. *International Dairy Journal*, **6**, 79-94
- MACEDO, A.C., FARO, C. and PIRES, E. (1996b). Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the

## Bibliografía

- cardo *Cynara cardunculus* L.. Action on bovine  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 42-47.
- MACEDO, A.C., COSTA, M.L. and MALCATA, F.X. (1996c). Assessment of proteolysis and lipolysis in Serra cheese effects of axial cheese location, ripening time and lactation season. *Le Lait*, **76**, 363-370.
- MACEDO, Q., JOVILET, P., and MEUNIER, J.C. (1999a). Capillary electrophoresis of casein-peptides: Influence of applied voltage and column temperature. *Biotechnology Techniques*, **13**, 647-651.
- MACEDO, Q., JOVILET, P. and MEUNIER, J.C. (1999b). Peptide mapping of  $\beta$ -casein by capillary zone electrophoresis. *Biotechnology Techniques*, **13**, 657-659.
- MACEDO, A., TAVARES, T.G. and MACATA, F.X. (2004). Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiology*, **21**, 233-240.
- MARCHESSEAU, S., GASTALDI, E., LAGAUE, A. and CUQ, J.L. (1997). Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *Journal of Dairy Science*, **80**, 1.483-1.489.
- MARCOS, A., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., MORA, M.T., ESTEBAN, M.A. y LEÓN, F. (1979a). Aminoácidos libres del queso Manchego. *Archivos de Zootecnia*, **28**, 29-37.
- MARCOS, A., ESTEBAN, M.A. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1979b). Actividad agua y pH del queso Manchego. *Anales de Bromatología*, **31**, 91-97.
- MARCOS, A., ESTEBAN, M.A., MARTÍNEZ, E., ALCALÁ, M. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1980). Inactivación térmica de las proteinasas del cardo *Cynara humilis* L.; constantes cinéticas y termodinámicas. *Archivos de Zootecnia*, **29**, 283-294.
- MARCOS, A., ALCALÁ, M., LEÓN, F., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. and ESTEBAN, M.A. (1981). Water activity and chemical composition of cheese. *Journal of Dairy Science*, **64**, 622-626.
- MARCOS, A., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., ESTEBAN, M.A., LEÓN, F., ALCALÁ, M., y BELTRÁN DE HEREDIA, F.H. (1985). Quesos españoles. Tablas de composición, valor nutritivo y estabilidad. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- MARCOS, A. and ESTEBAN, M.A. (1991). Estimation of water activity in mould ripening cheese from chemical composition. *International Dairy Journal*, **1**, 137-145.
- MARIACA, R. and BOSSET, J.O. (1997). Instrumental analysis of volatile (flavor) compounds in milk and dairy products. *Le Lait*, **77**, 13-40.
- MARSILLA, B. A. (1979). Principales componentes químicos y parámetros físicos del queso de La Serena. *Archivos de Zootecnia*, **28**, 255-269.
- MARTÍN, B., CHAMBA, J.F., COULON, J.B. and PERREARD, E. (1997). Effect of milk chemical-composition and clotting characteristics on chemical and sensory properties of Reblochon de Savoie cheese. *Journal of Dairy Research*, **64**, 157-162.
- MARTÍN, P., OLLIVIER-BOUSQUET, M. and GROSCLAUDE, F. (1999). Genetic polymorphism of caseins: A tool to investigate casein micelle organization. *International Dairy Journal*, **9**, 163-171.
- MARTÍNEZ-CASTRO, I., JUÁREZ, M. and MARTÍN ALVAREZ, P.J. (1979). The composition of fatty acids of milk fat in Spain. *Milchwissenschaft*, **34**, 207-210.
- MARTÍNEZ, E. (1979). Actividad coagulante del extracto de cardo *C. humilis*. Tesina de licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- MARTÍNEZ, P. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1978). Estudio de algunas floras microbianas del queso de la Serena. *Archivos de Zootecnia*, **27**, 93-97.
- MARTÍNEZ-MORENO, J.L. y NÚÑEZ, M. (1976). Flora microbiana del queso Manchego: II. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos industriales. *Anales del INIA, Serie General*, **4**, 33-40.
- MARTÍNS, A.P.L., DE VASCONCELOS, M.M.P. and DE SOUSA, R.B. (1996a). Thistle (*Cynara cardunculus*, L.) flowers as a coagulant agent for cheesemaking – Short characterization. *Le Lait*, **76**, 473-477.
- MARTÍNS, A.P.L., DE VASCONCELOS, M.M.P. and DE SOUSA, R.B. (1996b). A flor de cardo como agente coagulante para o fabrico de queijo. Influencia de alguns factores ligados á producao. *II Jornadas das Industrias Agro-alimentares. Instituto Superior de Agronomia*, 69-77.
- MATAIX, J., MAÑAS, M., LLOPIS, J. and MARTÍNEZ DE VICTORIA, E. (1995). Tabla de composición de alimentos españoles. Ed. J. Mataix. Granada. España.
- MATCHE, M. and FANNI, J. (1978). Rôle de la flore fongue dans l'accumulation du calcium et du phosphore à la surface des fromages de type Camembert. *Le Lait*, **58**, 336-354.
- MAYAYO, M., SANZ, B., LÓPEZ, P. y TORMO, J. (1976). Calidad microbiológica

## Bibliografía

- de la leche de oveja. *Alimentaria*, **77**, 49-56, 59-60.
- MAYER, H.K. (1997). Quality-Control of grated Parmesan products using an electrophoretic ripening index. *Milchwissenschaft*, **52**, 443-448.
- McCARNEY, T., MULLAN, W.M.A. and ROWE, M.T. (1995). Effect of carbonation of milk on cheddar cheese yield and quality. *Milchwissenschaft*, **50**, 670-674.
- McEWAN, J.A. and THOMSON, D.M.H. (1988). An investigation of the factors influencing consumer acceptance of chocolate confectionery using kelly repertory grid method. In: *Food Acceptability*. Thomson, D.M.H. (Ed.). Elsevier Applied Science Publisher. Ltd. London. UK.
- McKELLAR, R.C. (1981). Development of off-flavors in ultra high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science*, **64**, 2.138-2.145.
- McSWEENEY, P.L.H., OLSON, N.F., FOX, P.F, HEALY, A. and HOJRUP, P. (1993). Proteolytic specificity of chymosin on bovine  $\alpha_{s1}$ -casein. *Journal of Dairy Research*, **60**, 401-412.
- McSWEENEY, P.L.H., POCHE, S., FOX, P.F. and HEALY, A. (1994). Partial identification of peptides from the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, **61**, 597-590.
- McSWEENEY, P.L.H. and FOX, P.F. (1997). Indices of Cheddar cheese ripening, pp 73-89. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> Cheese Symposium*. Moorepark. Fermoy. Cork. Ireland.
- MEDINA, M., FERNÁNDEZ DEL POZO, B., RODRÍGUEZ-MARIN, M.A., GAYA, P. and NÚÑEZ, M. (1991). Effect of lactic starter inoculation on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Research*, **58**, 355-361.
- MEDINA, M., GAYA, P., GUILLÉN, A.M. and NÚÑEZ, M. (1992). Characteristics of Burgos and Hispánico cheeses manufactured either calf rennet or with recombinant chymosin. *Food Chemistry*, **45**, 85-89.
- MEHANNA, N.M., AL-AHWAL, R.I.H. and AL-KHAMY, A.F. (2002). The use of recombinant chymosin in making Domiati cheese. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **30**, 191-199.
- MENDIA, C. (1998). Cambios proteolíticos y organolépticos del queso Idiazabal elaborado en diferentes épocas del año: Influencia de la pasteurización de la leche y del cultivo iniciador. *Tesis Doctoral*. Universidad Pública de Navarra. Pamplona. España.
- MENDIA, C., IBÁÑEZ, F.C., TORRE, P. and BARCINA, Y. (1999). Effect of pasteurization on the sensory characteristics of a ewe's-milk cheese. *Journal of Sensory Studies*, **14**, 415-424.
- MENDIA, C., IBÁÑEZ, F.C., TORRE, P. and BARCINA, Y. (2000a). Influence of the season on proteolysis and sensory characteristics of Idiazabal cheese. *Journal of Dairy Science*, **83**, 1.899-1.904.
- MENDIA, C., IBÁÑEZ, F.J., TORRE, P. and BARCINA, Y. (2000b). Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis in a ewe's milk cheese. *Food Control*, **11**, 195-200.
- MENÉNDEZ, S., CENTENO, J.A., GODINEZ, J. y RODRÍGUEZ-OTERO, L. (1998). Propiedades tecnológicas y actividades enzimáticas de cepas de *Lactococcus lactis* aisladas del queso Arzúa-Ulloa. *Alimentaria*, **296**, 59-64.
- MENÉNDEZ, S., CENTENO, J.A. y RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. (1999). Micrococcos en quesos. *Alimentaria*, **308**, 65-68.
- MENTASTI, T., ALBERTINI, A., MORETTI, V.M., PALEARI, M.A., BELLAGAMBA, F., POLIDORI, P. and VALFRE, F. (1997). Isolation and identification of flavor volatile compounds in milk and a derived mountain cheese. *Milchwissenschaft*, **52**, 253-256.
- MERCIER, J.C., GROSCLAUDE, F. et RIBADEAU-DUMAS, B. (1971). Structure primaire de la caseine  $\alpha_s$  bovine. *European Journal of Biochemistry*, **25**, 41.
- MERCIER, J.C, BRIGNOU, G et RIBADEAU-DUMAS, B (1973). Structure primaire de la caséine  $\kappa$  bovine. *European Journal of Biochemistry*, **25**, 222.
- MEYRAND, A., BOUTRANDLOEI, S., RAYGUENIOT, S., MAZUY, C., GASPARD, C.E., JAUBERT, G., PERRIN, G., LAPEYRE, C. and VERNOZY-ROZAND, C. (1998). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goat's milk. *Journal of Applied Microbiology*, **85**, 537-544.
- MEYRAND, A. and VERNOZY-ROZAND, C. (1999). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in different cheeses. *Revue de Medecine Veterinaire*, **150**, 601-616.
- MIDJE, D.L., BASTIAN, E.D., MORIS, H.A., MARTIN, F.B., BRIDGEMAN, T. and VICKERS, Z.M. (2000). Flavor enhancement of reduced fat Cheddar cheese using an integrated culturing system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1.630-1.636.
- MILLÁN, R. (1981). Composición química y fracciones nitrogenadas de diversos quesos españoles: Estudio individual y comparativo. *Tesis Doctoral*. Facultad de

## Bibliografía

- Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- MILLÁN, R., ALCALÁ, M., CASTELO, M. y SANJÚAN, E. (1991). Contribución a la predicción de la actividad del agua ( $a_w$ ) en quesos españoles. *I Congreso Internacional de Alimentación, Nutrición y Dietética*. Toledo. España.
- MOHAMED, M.A. and O'CONNOR, C.B. (1999). *Calotropis procera* with emphasis on its use as milk coagulating agent. A review. *Egyptian Journal of Dairy Science*, **27**, 1-12.
- MOHEDANO, A.F., FERNÁNDEZ, J., GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1996). Hydrolysis of milk-proteins and formation of peptides by micrococci isolated from raw-milk and cheese. *Milchwissenschaft*, **51**, 70-73.
- MOIO, L. and ADDEO F. (1998). Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research*, **65**, 317-333.
- MONTILLA, A., CALVO, M.M. and OLANO, A. (1995). Manufacture of cheese made from CO<sub>2</sub>-treated milk. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, **200**, 289-292.
- MORA, M.T. (1979). Proteolisis del queso tipo Manchego. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- MORA, M.T. y MARCOS, A. (1982). Proteolisis del queso Manchego: cambios en la distribución del nitrógeno soluble. *Archivos de Zootecnia*, **119**, 27-35.
- MORENO, R., AMARO, M.A. and ZURERA, G. (1992). Mineral content modifications in Manchego-type cheese during ripening. *Food chemistry*, **45**, 319-322.
- MORENO, R., AMARO, M.A. and ZURERA, G. (1994a). Copper, iron and zinc variations in Manchego-type cheese during the traditional cheese-making process. *Food Chemistry*, **49**, 67-42.
- MORENO, R., POZO, R., ZURERA, G. and AMARO, M.A. (1994b). Calcium, magnesium, manganese, sodium and potassium variations in Manchego-type cheese during ripening. *Food Chemistry*, **50**, 373-378.
- MORENO, R., AMARO, M.A., GARCÍA, R.H. and ZURERA, G. (1995). Effects of Manchego-type cheese-making process on contents of mineral elements. *Food Chemistry*, **53**, 435-439.
- MOSKOWITZ, H.R. (1983). In: Products testing and sensory evaluation of foods. Food Nutrition Press. Westport. Connecticut. USA.
- MOSSEL, D.A. y MORENO, B. (1985). Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- MUIR, D., HUNTER, A., BANKS, J. and HORNE, D. (1995). Sensory properties of hard cheese: identification of key attributes. *International Dairy Journals*, **5**, 157-177.
- MUKHERJEE, K.K. and HUTKINS, R.W. (1994). Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, **77**, 2.839-2.849.
- MULET, A., ESCRICHE, I., ROSSELLO, C. and TARRAZO, J. (1999). Changes in the volatile fraction during ripening of Mahón cheese. *Food Chemistry*, **65**, 219-225.
- MURRAY, J.M. and DELAHUNTY, C.M. (2000a). Description of Cheddar cheese packaging attributes using an agreed vocabulary. *Journal of Sensory Studies*, **15**, 201-218.
- MURRAY, J.M. and DELAHUNTY, C.M. (2000b). Selection of standards to reference terms in a Cheddar type cheese flavor language. *Journal of Sensory Studies*, **15**, 179-199.
- NÁJERA, A.I., BARCINA, Y., DERENOBLES, M. and BARRÓN, L.J. R. (1998b). Determination of triacylglycerol composition of Idiazábal cheese. *Chromatographia*, **47**, 579-586.
- NÁJERA, A.I., BARCINA, Y., DE RENOBLES, M. and BARRÓN, L.J.R. (1999a). Influence of salt content on the triglyceride composition of Idiazábal cheese during ripening. *Le Lait*, **79**, 527-534.
- NÁJERA, A.I., PEREA, S., BARCINA, Y., DERENOBLES, M. and BARRÓN, L.J. R. (1999b). A reverse-phase high-performance liquid-chromatographic method for analysing complex-mixtures of triglycerides – application to the fat fraction of an aged cheese. *Journal of the American oil Chemists Society*, **76**, 399-407.
- NETHERLANDS STANDARD NEN 3059. (1969). Butyrometric determination of the fat content of cheese (Gerber-Van Gulik method). *Netherlands Milk Dairy*, **23**, 214.
- NOÉL, Y., ZANNONI, M. and HUNTER, E.A. (1996). Texture of Parmigiano Reggiano cheese: Statistical relationships between rheological and sensory varieties. *Le Lait*, **76**, 243-254.
- NOÉL, Y., ARDÖ, Y., POCHET, S., HUNTER, E.A., LAVANCHY, P., LUGINBUHL, W., LE BARS, D., POLYCHRONIADOU, A. and PELLEGRINO, L. (1998). Characterisation of protected denomination of origin cheeses: Relationships between sensory texture and instrumental data. *Le Lait*, **78**, 569-588.
- NORMA ESPAÑOLA UNE 34 105hl. (1969). Métodos de ensayo de queso:



## Bibliografía

- Obtención de muestras. IRANOR. Madrid. España.
- NORMA ESPAÑOLA UNE 55-118. (1979). Determinación de ácidos grasos de cadena corta y composición de la fracción de ácidos grasos de la grasa de mantequilla por cromatografía en fase gaseosa. IRANOR. Madrid. España.
- NORONHA, R.L., DAMASIO, M.H., PIVATTO, M.M. and NEGRILLO, B.G. (1995). Development of the attributes and panel screening for texture descriptive analysis of milk gels added by multivariate statistical procedures. *Food Quality and Preference*, **6**, 49-54.
- NÚÑEZ, M. (1976a). Flora microbiana del queso Manchego: IV. Lactobacilos. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), Serie General*, **4**, 57-65.
- NÚÑEZ, M. (1976b). Flora microbiana del queso Manchego: V. Leuconostoc. *Anales del INIA, Serie General*, **4**, 67-74.
- NÚÑEZ, M. (1976c). Flora microbiana del queso Manchego: VI. Pediococos. *Anales del INIA, Serie General*, **4**, 75-81
- NÚÑEZ, M. y MARTÍNEZ-MORENO, J.L. (1976). Flora microbiana del queso Manchego: I. Evolución de la flora microbiana de quesos Manchegos artesanales. *Anales del INIA, Serie General*, **4**, 11-31.
- NÚÑEZ, M., CHAVARRI, F.J. and NÚÑEZ, J.A. (1984). Psychrotrophic bacterial flora of raw ewe's milk with particular reference to gram negative rods. *Journal of Applied Bacteriology*, **53**, 23-29.
- NÚÑEZ, M., GARCÍA-ASER, C., RODRÍGUEZ-MARÍN, A. MEDINA, M. and GAYA, P.(1986a). The effect of ripening and cooking temperature on proteolysis and lipolysis in Manchego cheese. *Food Chemistry*, **21**, 115-123.
- NÚÑEZ, M., GAYA, P., MEDINA, M., RODRÍGUEZ MARÍN, M.A. and GARCÍA-ASER, C. (1986b). Changes on microbiological, chemical, rheological and sensory characteristics during ripening of vacuum packaged Manchego cheese. *Journal of Food Science*, **51**, 1.451-1.455.
- NÚÑEZ, M., BAUTISTA, L., MEDINA, M. and GAYA, P (1988). *Staphylococcus aureus*, thermonuclease and staphylococcal enterotoxins in raw ewes' milk Manchego cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, **65**, 29-34.
- NÚÑEZ, M., MEDINA, M. and GAYA, P. (1989). Ewe's milk cheese: Technology, microbiology and chemistry. *Journal of Dairy Research*, **56**, 303-321.
- NÚÑEZ, M., FERNÁNDEZ DEL POZO, B., RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A., GAYA, P. and MEDINA, M. (1991a). Effect of vegetable animal rennet on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Research*, **58**, 511-519.
- NÚÑEZ, M., GUILLÉN, A.M., RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A., MARCILLA, A.M., GAYA, P. and MEDINA, M. (1991b). Accelerated ripening of ewe's milk Manchego cheese: The effect of neutral proteinase. *Journal of Dairy Science*, **74**, 4.108-4.118.
- NÚÑEZ, M., MEDINA, M., GAYA, P., GUILLÉN, A.M. and RODRÍGUEZ-MARÍN, A. (1992). Effect of recombinant chymosin on ewe's milk coagulation and Manchego cheese characteristics. *Journal of Dairy Research*, **59**, 81-87.
- O'KEEFFE, A.M., FOX, P.F. and DALY, C. (1978). Proteolysis in Cheddar cheese: Role of coagulant and starter bacteria. *Journal of Dairy Research*, **45**, 465-477.
- O'MAHONY, J.A., SOUSA, M.J. and McSWEENEY, P.L.H. (2003). Proteolysis in miniature Cheddar-type cheeses made using blends of chymosin and *Cynara cardunculus* proteinases as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*, **56**, 234-242.
- OBERG, C.J., KHAYAT, F.A. and RICHARSOND, G.H. (1990). Proteinase profiles of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Science*, **73**, 1.465-1.471.
- OHREN, J.A. and TUCKEY, S.L. (1967). Relation of flavour development in Cheddar cheese to chemical changes in the fat of the cheese. *Journal of Dairy Science*, **52**, 598.
- OJEDA, E. (1973). Calidad de la leche obtenida por ordeño mecánico. Raza Manchega. *Revista Española de Lechería*, **90**, 207-210.
- OLIARO, J. (1969). Lineamenti di una storia del carciofo. *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Congress of Carciofo*. Minerva Medica (Ed) Torino. Italy
- OLIVECRONA, T. and BENGTTSSON-OLIVECRONA, G. (1991). Indigenous enzymes in milk. Lipase. *Food Enzymology*, vol 1. P.F. Fox (Ed). Elsevier Applied Science. London. UK.
- OLIVECRONA, T., VILARÓ, S. and BENGTTSSON-OLIVECRONA, G. (1992). Indigenous enzymes in milk II. Lipases in milk. *Advances Dairy Chemistry*, 1-proteins. P.F. Fox (Ed). Elsevier Applied Science. London. UK.
- OLSON, M.F. and JOHNSON, M.E. (1990). Low-fat cheese technology. *Food Engineering International*, **25**, 31-37.
- OLSON, N., BOGENRIEF, D., CHEN, C. and JOHNSON, M. (1997). Impact of lactic acid bacteria on the physical and flavor characteristics of Cheddar cheese of

## Bibliografía

- different fat contents. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, **7**, 40.
- ORDÓÑEZ, J.A., MASSO, J.A., MÁRMOL, M.P. and RAMOS, M. (1980). Contribution to the study of Roncal cheese. *Le Lait*, **60**, 283-294.
- ORDÓÑEZ, J.A. (1987). Aspectos microbiológicos y bioquímicos de la maduración del queso. *Industrias Lácteas Españolas*, **106**, 48-51.
- ORDÓÑEZ, A.I. (1995). Compuestos nitrogenados y características sensoriales del queso Idiazábal: Incidencia de cultivos iniciadores autóctonos y pasteurización. *Tesis Doctoral*. Universidad Pública de Navarra. Pamplona. España.
- ORDÓÑEZ, A.I., IBÁÑEZ, F.C., TORRE, P. and BARCINA, Y. (1997). Formation of biogenic-amines in Idiazábal ewes-milk cheese - Effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal of Food Protection*, **60**, 1.371-1.375.
- ORDÓÑEZ, A.I., IBÁÑEZ, F.C., TORRE, P., BARCINA, Y. and PÉREZ-ELORTONDO, F.J. (1998a). Application of multivariate-analysis to sensory characterization of ewes' milk cheese. *Journal of Sensory Studies*, **13**, 45-55.
- ORESKOWICH D.C., KLEIN, B.P. and SUTHERLAND, J.W. (1991). Procluster analysis and its application to free-choice and other sensory profiling. In: *Sensory Science. Theory and Applications in Food*. Lawless, H.T. and Klein, B.P. (Ed). Marcel Dekker, Inc. New York. USA.
- ORLA-JENSEN, S. (1919). The lactic acid bacteria. Copenhagen: Host and Son. Citado por Kosikowski and Mistry (1997).
- ORTIGOSA, M., BÁRCENAS, P., ARIZCUN, C., PÉREZ ELORTONDO, F.J., ALBISU, M. and TORRE, P. (1999). Influence of the starter culture on the microbiological and sensory characteristics of ewe's cheese. *Food Microbiology*, **16**, 237-247.
- ORTIZ DE APOCADA, M.J., SELGAS, M.D. and ORDÓÑEZ, J.A. (1993). Lipolytic and proteolytic activities of Micrococci isolated from cheese. *International Food Research*, **26**, 319-325.
- ORTIZ DE APOCADA, M.J., AMIGO, L. and RAMOS, M. (1994). Study of the milk-clotting and proteolytic activity of calf rennet, fermentation-produced chymosin, vegetable and microbial coagulants. *Milchwissenschaft*, **49**, 13-16.
- OSBORNE, D.R. y VOOGT, P. (1986). Análisis de los nutrientes de los alimentos pp. 54. Ed. Acribia. Zaragoza.
- OUMER, A., GARDE, S., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1999). Defined starter system including a bacteriocin producer for the enhancement of cheese flavour. *Biotechnology Techniques*, **13**, 267-270.
- PADMANABHAN, S., CHITRE, A. and SHASTRI, N.V. (1993). Milk clotting protease isolated from *Dieffenbachia maculata*. *Nahrung -Food*, **37**, 99-101.
- PAGLIARINI, E., LEMBO, P. and BERTUCCIOLI, M (1991). Recent advancements in sensory analysis of cheese. *Italian Journal of Food Science*, **2**, 85-99.
- PAGLIARINI, E., MONTELEONE, E. and WAKELING, I. (1997). Sensory profile description of Mozzarella cheese and its relationship with consumer preference. *Journal of Sensory Studies*, **12**, 285-301.
- PARDO-GONZÁLEZ, J.E., CALCERRADA-MARTÍNEZ, A., GALLEGO-SORIA, R., ARIAS-SÁNCHEZ, R., SERRANO-MARTÍNEZ, C.E., MONTORRO-ANGULO, V. y ALTAREZ-LÓPEZ, S. (1995). Estudio de la calidad de la leche utilizada en queserías industriales inscritas en la denominación de origen queso Manchego. *Alimentaria*, **266**, 19-23
- PARODI, P.W. (1979). Stereospecific distribution of fatty acids in bovine milk fat triglycerides. *Journal of Dairy Research*, **46**, 75-81.
- PAROLARI, G., VIRGILI, R., PANARI, G. and ZANNONI, M. (1994). Development of a vocabulary of terms for sensory evaluation of Parmigiano-Reggiano cheese by freechoice profiling. *Italian Journal of Food Science*, **3**, 317-324.
- PARRIS, N., HOLLAR, C.M., HSIEH, A. and COCKLEY., H. (1997). Thermal stability of whey protein concentrate mixtures: Aggregate formation. *Journal of Dairy Science*, **80**, 19-28.
- PARTIDARIO, A. (1999). Comparison of free fatty acids, volatile compounds and sensory characteristics of Serra da Estrela cheese at different ripening-stages. *Milchwissenschaft*, **54**, 381-385.
- PASCUAL, M.R. (1984). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas. *Ministerio de Sanidad y Consumo*. Madrid. España.
- PATTON, S. (1963). Volatile acids and the aroma of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **46**, 856-858.
- PAVIA, M., GUAMIS, B. and FERRAGUT, V. (1999a). Effects of ripening time and salting method on glicolisis in Manchego-type cheese. *Milchwissenschaft*, **54**, 379-381.
- PAVIA, M., GUAMIS, B., TRUJILLO, A.J., CAPELLAS, M. and FERRAGUT, V. (1999b). Changes in microstructural, textural and colour characteristics during ripening of Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal*, **9**, 91-98.
- PAVIA, M., TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B. and FERRAGUT, V. (2000a). Proteolysis in

## Bibliografía

- Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *Journal of Dairy Science*, **83**, 1.441-1.447.
- PAVIA, M., TRUJILLO, A.J., GUAMINS, B. and FERRAGUT, V. (2000b). Ripening control of salt-reduced Manchego-type cheese obtained by brine vacuum-impregnation. *Food Chemistry*, **70**, 155-162.
- PELÁEZ, C. (1985). Control microbiológico de productos lácteos. *Alimentaria*, **161**, 11-18.
- PELISSIER, J.P. and MANCHON, P. (1976). Comparative study of the bitter taste of enzymic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. *Journal Food Science*, **41**, 231-242.
- PELLEGRINI, O., REMEUF, F. and RIVEMALE, M. (1994). Evolution des caractéristiques physico-chimiques et des paramètres de coagulation du lait de brevis collecté dans la région de Roquefort. *Le Lait*, **74**, 425-442.
- PEÑA, A., NERVÁEZ, L., LABASTIDA, C. and CAPELLA, S. (1997). Triglyceride characterization of different Mexican cheeses by high temperature capillary gas chromatography (HT-CGC). *Journal of High Resolution Chromatography*, **20**, 572-574.
- PÉREZ-ELORTONDO, F.J., ALBISU, M. and BARCINA, Y. (1993a). Changes in the microflora of Idiazábal cheese with the addition of commercial lactic starters. *The Australian Journal of Dairy Technology*, **48** 10-14.
- PÉREZ-ELORTONDO, F.J., ALBISU, M. and BARCINA, Y. (1993b). Microbiological changes with brining time and smoking during the ripening of Idiazábal cheese. *Chemical Microbiological Technology Lebensmittel*, **15**, 14-20.
- PÉREZ-ELORTONDO, F.J., ECHEBARRIA, P.A., ALBISU, M., and BARCINA, Y. (1998). Indigenous lactic acid bacteria in Idiazábal ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, **8**, 725-732.
- PÉREZ ELORTONDO, F.J., ALBISU, M., and BARCINA, Y. (1999a). Brining time effect on physicochemical and microbiological parameters in Idiazábal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **49**, 139-149.
- PÉREZ-ELORTONDO F.J., ALBISU, M. and BARCINA, Y. (1999b). Physicochemical properties and secondary microflora variability in the manufacture and ripening of Idiazábal cheese. *Le Lait*, **79**, 281-290.
- PÉREZ-ELORTONDO, F.J., BÁRCENAS, P., CASAS, C., SALMERÓN, J. and ALBISU, M. (1999c). Development of standardized sensory methodologies: Some applications to protected designation of origin cheeses. *Science Aliments*, **19**, 543-558.
- PERREIRA DE MANTOS, A.A. and VIERA DE SÁ, F. (1948). O coagulante vegetal e animal na fabricacao do queijo de ovelha. *Boletim Pecuário*, **16**, 25-30.
- PETERSON, S.D. and MARSHALL, R.T. (1990). Nonstarter Lactobacilli in Cheddar cheese. A review. *Journal of Dairy Science*, **73**, 1.395-1.340.
- PETROVA, M. (1981). Microbial quality of machine milked ewes' milk. *Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, **3**, 303-305.
- PICÓN, A., GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1994). The effect of liposome encapsulation of chymosin derived by fermentation on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, **77**, 16-23.
- PICÓN, A., GAYA, M., MEDINA, M and NÚÑEZ, M. (1995). The effect of liposome-encapsulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, **78**, 1.238-1.247.
- PICÓN, A., SERRANO, C., GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1996). The effect of liposome-encapsulated cyprosinos on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, **79**, 1.699-1.705.
- PICÓN, A., GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1997). Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for cheese ripening. *Biotechnology Letters*, **19**, 345-348.
- PIGGOT, J.R. and MOWAT, R.G. (1991). Sensory aspects of maturation of Cheddar cheese by descriptive analysis. *Journal of Sensory Studies*, **6**, 49-62.
- PIGGOT, J.R. and SHARMAN, K. (1986). Methods for multivariate dimensionality reduction: In: *Statistical Procedures in Food Research*. Piggot, J.R. (Ed.) Elsevier Applied Science. London. United Kingdom.
- PINHO, O., MENDES, E., ALVES, M.M. and FERREIRA, I.M.P.V.L.O. (2004). Chemical, physical and sensorial characteristics of "Terrincho" ewe cheese: Changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal of Dairy Science*, **87**, 249-257.
- PINTADO, A.I., MACEDO, A.C., TEIXEIRA, G., PAIS, M.S., CLEMENTE, A. and MALCATA, F.X. (2001). Caseinolytic activity of fruit extract from *Opuntia ficus-indica* on bovine, caprine and ovine sodium caseinates. *Biotechnology Progress*, **17**, 643-646.
- PIRES, E. FARO, C. MACEDO, I., ESTEVES, C., MORGADO, J., VERISSIMO, P., PEREIRA, D. and GÓMES, D. (1994). Flor do cardo versus quimosina no fabrico de queijos artesanais. *Revista da Sociedade Portuguesa de Química*, **54**, 66-68.

## Bibliografía

- PLANTA, R.J., CALIXTO, F., and PAIS, M.S. (2000). Production by yeast of aspartic proteinases from plant origin with sheep's, cow's, goat's milk, etc. Clotting and proteolytic activity. **Patent Number EP1196542 (WO0075283)**. Lisboa. Portugal.
- POLYCHRONIADOU, A. (1994). Objective indices of maturity of Feta and Teleme cheese. *Milchwissenschaft*, **49**, 376-379.
- POMPEI, C., CASIRAGHI, E., LUCISANO, M. and DELLEA, C. (1991). Multivariate statistical methods for the characterization of Provolone cheese. I. Selection of variables. *Italian Journal of Food Science*, **3**, 99-107.
- POULLET, B., HUERTAS, M., SÁNCHEZ, A., CÁCERES, P. and LARRIBA, G. (1991). Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, **58**, 231-238.
- POVEDA, J.M., CABEZAS, L. and GARCÍA, A. (1999a). Changes in physicochemical properties and proteolysis in Manchego cheese preserved in olive oil. *Milchwissenschaft*, **54**, 252-255.
- POVEDA, J.M., PÉREZ-COELLO, M.S. and CABEZAS, L. (1999b). Evolution of the free fatty acid fraction in Manchego cheese during ripening. *Milchwissenschaft*, **54**, 685-687.
- POVEDA, J.M., PÉREZ-COELLO, M.S. and CABEZAS, L. (2000). Seasonal variations in the free fatty acid composition of Manchego cheese and changes during ripening. *European Food Research and Technology*, **210**, 314-317.
- POVEDA, J.M. (2001). Efecto de la utilización de distintos cultivos iniciadores en la proteólisis del queso Manchego. Otros aspectos de la maduración. *Tesis Doctoral* Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Castilla La Mancha. Ciudad Real. España.
- POVEDA, J.M., SOUSA, M.J., CABEZAS, L., McSWEENEY, P.L.H., (2003). Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *International Dairy Journal*, **13**, 169-178.
- POVEDA, J.M., GARCÍA, A., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J. and CABEZAS, L. (2004). Application of partial least squares (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese. *Food Chemistry*, **84**, 29-33.
- PRADOS, F., VIOQUE, M., ZURERA, G., MEDINA, M., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. y GÓMEZ, R. (2002a). Efecto de la congelación sobre la composición química y la proteólisis en queso de leche de oveja madurado, elaborado con un coagulante vegetal en polvo y con renina. *II Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*. Septiembre. Lérida. España.
- PRADOS, F., VIOQUE, M., PINO, A., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. y GÓMEZ, R. (2002b). Efecto de la congelación sobre las características sensoriales en queso de leche de oveja madurado, elaborado con un coagulante vegetal en polvo y con renina. *II Congreso Español de Ingeniería de Alimentos*. Septiembre. Lérida. España.
- PRADOS, F., PINO, A., VIOQUE, M. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2004). Influence of the frozen storage on some characteristics of ripened Manchego-type cheese manufactured with a powdered vegetable coagulant and rennet. *Food Chemistry*. Submitted.
- PRENTICE, J.H. (1987). *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology*. Vol. 1. New York. Elsevier Applied. Science. pp 299.
- PUCHADES, R., LEMIEUX, L. and SIMARD, R.E. (1989). Evolution of free amino acids during ripening of Cheddar cheese containing added Lactobacilli strains. *Journal of Food Science*, **54**, 885-888, 946.
- RAFECAS, M., BOATELLA, J. y DE LA TORRE, M. C. (1985). Determinación y evolución de los ácidos grasos libres y totales durante la maduración de un queso tipo Parmesano. *Anales de Bromatología*, **37**, 229-241.
- RAMALHO-SANTOS, M., PISSARRA, J., VERISSIMO, P., PERREIRA, S., SALEMA, R., PIRES, E. and FARO, C. (1996). Action on bovine  $\alpha_s$ -casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1297**, 83-89.
- RAMOS, M. et MARTÍNEZ-CASTRO, I. (1976). Etude de la protéolyse du fromage type "Manchego" au cours de l'affinage. *Le Lait*, 553-554, 164-176.
- RAMOS, M., MARTÍNEZ-CASTRO, I. and JUÁREZ, M. (1977). Detection of cow's milk in Manchego cheese. *Journal of Dairy Science*, **60**, 870-877.
- RAMOS, M., BARNETO, R. and ORDÓÑEZ, J.A. (1981). Evaluation of a specific starter for Manchego cheese production. *Milchwissenschaft*, **36**, 528-531.
- RANK, T.C., GRAPPIN, R.T. and OLSON, N.F. (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening: A review. *Journal of Dairy Science*, **68**, 801-812.
- RECIO, I., FERNÁNDEZ-FOURNIER, A., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J. and RAMOS, M. (1997). Beta-lactoglobulin polymorphism in ovine breeds: Influence on cheese making properties and milk composition. *Le Lait*, **77**, 259-265.

## Bibliografía

- RENNER, E. (1983). Milk and dairy products in human nutrition. *Volkswirtschaftlicher Verlag*. London.
- REPS, A., DAJNOWIEC, F. and KOLAKOWSKI, P. (1997). Chymax preparation in industrial cheese manufacture. *Milchwissenschaft*, **52**, 32-35.
- REQUENA, T. y PELÁEZ, C. (1993). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, **35**, 19-44.
- RICE, W.H. and McMAHON, D.J. (1998). Chemical, physical and sensory characteristics of Mozzarella cheese fortified using protein-chelated iron or ferric-chloride. *Journal of Dairy Science*, **81**, 318-326.
- RICHARDSON, B.C. (1974). Comparative micelle structure. V. Isolation and characterization of mayor caseins. *Journal of Dairy Research*, **41**, 239-247.
- RICHARDSON, B.C. and ELSTON, P.D. (1984). Plasmin activity in commercial casein and caseinates. *New Zealand Journal of Dairy Technology*, **19**, 63-70.
- ROA, I., MENDIOLA, F.J., GONZÁLEZ, J. y MAS, M. (1997). Efecto de la innovación tecnológica en la elaboración del queso de La Serena. *Alimentaria*, **285**, 45-49.
- ROA, I., LÓPEZ, M.B. and MENDIOLA, F.J. (1999). Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*, **32**, 413-419.
- ROBERTS, A.K. and VICKERS, Z.M. (1994). Cheddar cheese aging: Changes in sensory attributes and consumer acceptance. *Journal Food Science*, **59**, 329-334.
- ROBINSON, R.K. (1979). A method for the objective assessment of cheese flavour. *Milk Industry*, **81**, 34-35.
- RODRÍGUEZ, M., TORNADIJO, M., CARBALLO, J. and MARTÍN, R. (1994). Microbial study of León raw cow-milk cheese, a Spanish craft variety. *Journal of Food Protection*, **57**, 998-1006.
- RODRÍGUEZ, F. y JUÁREZ, M. (1995). Técnicas analíticas para garantizar la calidad de los productos lácteos. *Revista Española de Lechería*, **3**, 30-39.
- ROHM, H., LEDERER, K. and GINZINGER, W. (1992). Relationship between rheological properties and composition of Swiss-type cheese. 1. Multiple regression analysis. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **25**, 253-260.
- ROHM, H., JAROS, D., FISHER, U. and LAILACH, S. (1994). Food associated with descriptive texture terms. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **27**, 406-414.
- ROHM, H., GINZINGER, W., JAROS, D. and TSCHAGER, E. (1996). Composition and fracture properties of Emmentaler cheese as affected by seasonal-variations. *Milchwissenschaft*, **51**, 680-683.
- ROHM, H. and JAROS, D. (1997a). Colour of hard cheese .1. description of colour properties and effects of maturation. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, **203**, 241-244.
- ROHM, H. and JAROS, D. (1997b). Colour of hard cheese .2. Factors of influence and relation to compositional parameters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, **204**, 259-264.
- ROHM, H., JAROS, D. and RIEDLERHELLRIGL, M. (1997). A simple distillation in hard cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, **30**, 767-769.
- ROLLEMAN, H.S., MCKELLAR, R.C., SORHAUG, T., SURHEN, G., ZADOW, J.G., LAW, B.A., POLL, J.K., STEPANIAK, L. and VAGIAS, G. (1989). Comparison of different methods for the detection of bacterial proteolytic enzymes in milk. *Milchwissenschaft*, **44**, 491-496.
- ROMÁN ESTEBAN, M.L. (1990). Relaciones físico-químicas durante la maduración del queso Manchego. *Tesis doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- ROSEIRO, M.L.B., BARBOSA, M., AMES, J.M. and WILBEY, R.A. (2003a). Cheesemaking with vegetable coagulants: The use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, **56**, 76-85.
- ROSEIRO, L., WILBEY, A. and BARBOSA, M. (2003b). Serpa cheese: Technological, biochemical and microbiological characterisation of a PDO ewe's milk cheese coagulated with *Cynara cardunculus L. Le Lait*, **83**, 469-481.
- ROSS, R.P., STANTON, C., HILL, C., FITZGERALD, G.F. and COFFEY, A. (2000). Novel cultures for cheese improvement. *Trends in Food Science & Technology*, **11**, 96-104.
- RUAS-MADIEDO, P., BADAGANCEDO, J.C., FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., DE LLANO, D.G., DE LOS REYES GAVILÁN, C.G. (1996). Preservation of the microbiological and biochemical quality of raw-milk by carbon-dioxide addition - a pilot-scale study. *Journal of Food Protection*, **59**, 502-508.
- RUAS-MADIEDO, P., ALONSO, L., DE LLANO, D.G. and DE LOS REYES GAVILÁN, C.G. (1998a). Growth and metabolic-activity of a cheese starter in CO<sub>2</sub>-acidified and non-acidified refrigerated

## Bibliografía

- milk. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, **206**, 179-183.
- RUAS- MADIEDO, P., BADA-GANCEDO, J.C., ALONSO, L. and DE LOS REYES GAVILÁN C.G.(1998b). Afuega'l Pitu cheese quality: Carbon dioxide addition to refrigerated milk in acid-coagulated cheesemaking. *International Dairy Journal*, **8**, 951-958.
- RUEGG, M. and BLANC, B. (1977). Beziehungen zwischen wasser aktivitat, wasser sorptionsvermögen und zusammensetzung von käse. *Milchwissenschaft*, **32**, 193-200.
- RUIZ-ÍÑIGUEZ, J., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., ESTEBAN, M.A. y MARCOS, A. (1984). Principales parámetros que definen la composición del queso Torta del Casar. *Archivos de Zootecnia*, **33**, 301-312.
- SÁNCHEZ, E., CARMONA, M.A., GÓMEZ, R. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1993). Efecto de la adición de cultivos iniciadores sobre la microbiología del queso de Los Pedroches a lo largo de la maduración. *IX Congreso Nacional de Química (Química Agrícola y Alimentaria)*. Sevilla. España.
- SÁNCHEZ, E., CARMONA, M.A., GÓMEZ, R. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1995). Evolución de algunos grupos microbianos durante la maduración del queso de Los Pedroches. *Alimentaria*, **263**, 87-90.
- SÁNCHEZ, E. (1997). Efecto de la congelación sobre las características de quesos de oveja artesanos: Aspectos microbiológicos. *Tesina de Licenciatura*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- SÁNCHEZ, E., MATA, C., VIOQUE, M., GÓMEZ, R. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1998a). Cambios microbiológicos en quesos de oveja artesanos durante el almacenamiento en congelación. I. Flora indicadora y patógena. *Alimentaria*, **291**, 77-82.
- SÁNCHEZ, E., MATA, C., VIOQUE, M., GÓMEZ, R. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1998b). Cambios microbiológicos en quesos de oveja artesanos durante el almacenamiento en congelación. II. Flora láctica. *Alimentaria*, **296**, 65-69.
- SÁNCHEZ, E. (1999). Evolución de la flora microbiana durante la maduración de quesos de oveja artesanos en diferentes condiciones de elaboración. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- SÁNCHEZ, P.J. (1999). Composición de quesos artesanos españoles. Constituyentes inorgánicos. *Tesis doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- SANJUÁN, E. (1992). Elaboración del queso de Los Pedroches con diferentes tipos de cuajo. Cambios químicos durante la maduración. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- SANJUÁN, E. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1994). Influencia de algunos factores sobre el tiempo de coagulación por cuajo vegetal (*Cynara* sp.). *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **13**, 69-73.
- SANJUÁN, E., MILLÁN, R., GÓMEZ, R. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1995). Estudio comparado de la fracción lipídica del queso de Los Pedroches obtenidos a partir de cuajo animal y vegetal. *Grasas y Aceites*, **46**, 304-307.
- SANJUÁN, E., SAAVEDRA, P., MILLÁN, R., CASTELO, M. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1998). Effects of ripening and type of rennet on the mineral content of Los Pedroches cheese. *Journal of Food Quality*, **21**, 187-200.
- SANJUÁN, E., MILLÁN, R., SAAVEDRA, P., CARMONA, M.A., GÓMEZ, R. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2002). Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry*, **78**, 281-289.
- SANTOS, J.A., LÓPEZ-DÍAZ, T.M., GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C., GARCÍA-LÓPEZ, M.L. and OTERO, A. (1995). Antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Aeromonas hydrophila* and psychrotrophs during the manufacturing of the Spanish sheep fresh cheese Villalon. *Milchwissenschaft*, **50**, 690-692.
- SCHLEIFER, K.H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPER-BÄLZ, R., COLLINS, M.D. and FISCHER, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related *Streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. Nov. *System Applied of Microbiology*, **6**, 183-188.
- SCHLEIFER, K.H. and KILPER-BÄLZ, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A review. *Systematic Applied Microbiology*, **10**, 1-19.
- SCHLESSER, J.E., SCHMIDT, S.J. and SPECKMAN, R. (1992). Characterization of chemical and physical changes in Camembert cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, **75**, 1.753-1.760.
- SCHLIMME, E. and BUCHHEIM, W. (2004). La Leche y sus componentes. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- SCHWARTZ, D.P., PARKS, O.W. and BOYD, E.D. (1963). Methyl ketones in Roquefort cheese. *Journal of Dairy Science*, **46**, 1.422-1.423.
- SCOTT, R. (1981). Cheesemaking practice. Ed. Elsevier Applied Science Publishers. London. UK.

## Bibliografía

- SCOTT, R. (1991). Fabricación de queso. Editorial Acibia, S.A. Zaragoza. España.
- SERRANO, E. (1979). Actividad proteolítica del extracto del cardo *C. humilis*. Tesina de Licenciatura. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- SERRANO, C.E. (1995). Estudio de la microflora del queso Manchego con Denominación de Origen. *Tesis doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- SERRANO, C.E., PARDO, J.E., SERRANO, E. y GARCÍA, C. (1997b). Importancia del crecimiento de mohos en quesos y medidas de control. *Alimentaria* **281**, 75-78.
- SERRANO, B. GARZÓN, A., FIGUEROA, A. y MARTÍNEZ, J. (1998). Efectos del pH y el contenido de células somáticas sobre las características químicas y de producción de leche de oveja Merina. *Alimentaria*, **289**, 57-60.
- SERRANO, B. GARZÓN, A.I., GARRO, G., CHIANESE, L. y MATÍNEZ, J. (1999). Variabilidad genética de caseínas en la raza ovina Merina. *Archivos de Zootecnia*, **48**, 197-206.
- SETSER, C.S. (1994). Descriptive methods: Knowing your product's profile. *Cereal Foods World*, **39**, 815-821.
- SHAO, W.L., YUKSEL, G.U., DUDLEY, E.G., PARKIN, K.L. and STEELE, J.L. (1997). Biochemical and molecular characterization of PEPR, a dipeptidase, from *Lactobacillus helveticus* Cnrz32. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3.438-3.443.
- SILVA, S.V. and MALCATA, F.X. (1998). Proteolysis of ovine caseins by cardosin A, an aspartic acid proteinase from *Cynara cardunculus* *Le Lait*, **78**, 513-519.
- SILVA, S.V. and MALCATA, F.X. (1999). On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chemistry*, **67**, 373-378.
- SILVA, S.V. and MALCATA, F.X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides: A review. *International Dairy Journal*, **15**, 1-15.
- SINESIO, F., RISVIK, E. and RODBOTTEN, M. (1990). Evaluation of panellist performance in descriptive profiling of rancid sausages: A multivariate study. *Journal of Sensory Studies*, **5**, 33-52.
- SKEIE, S., NARVHUS, J.A., ARDÖ, Y., THORVALDSEN, K. and ABRAHAMSEN, R. K. (1997). The effect of reduced salt content on the function of liposome-encapsulated neutrase and heat-treated lactobacilli in rindless low-fat cheese. *Le Lait*, **77**, 575-585.
- SORHAUG, T. and STEPANIAK, L. (1977). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, **8**, 35-41.
- SORYAL, K.A. (2002). Thirst and ewe's milk processing. *Small Ruminant Research*, **45**, 95-99.
- SOUSA, M.J. and MALCATA, F.X. (1996a). Effects of processing conditions on the caseinolytic activity of crude extracts of *Cynara cardunculus* L. *Food Science and Technology International*, **2**, 255-263.
- SOUSA, M.J. and MALCATA, F.X. (1996b). Influence of pasteurization of milk and addition of starter cultures on protein breakdown in ovine cheeses manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, **57**, 549-556.
- SOUSA, M.J. and MALCATA, F.X. (1997a). Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical, and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 74-81.
- SOUSA, M.J. and MALCATA, F.X. (1997c). Comparative biochemical evolution during ripening of bovine, ovine and caprine cheeses manufactured with extracts of flowers of *Cynara cardunculus*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **205**, 97-103.
- SOUSA, M.J. and MALCATA, F.X. (1998a). Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of *Cynara cardunculus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 305-314.
- SOUSA, M.J. and MALCATA, F.X. (1998b). Identification of peptides from ovine milk cheese manufactured with animal rennet or extracts of *Cynara cardunculus* as coagulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4.034-4.041.
- SOUSA, M.J., ARDÖ, Y. and McSWEENEY, P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, **11**, 327-345.
- SOUSA, M.J. and MALCATA, F.X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, **82**, 151-170.
- STATSOFT, INC. STATISTICAL v. 6.0 (2001). Statistical for Windows. Computer program manual. Tulsa. Oklahoma. USA.
- STAMPANONI, C.R. and NOBLE, A.C. (1991). The influence of fat acid and salt on the perception of selected taste and texture attributes of cheese analogs: A scalar study. *Journal of Texture Studies*, **22**, 367-380.
- STEFFEN, C., FLUECKIGER, E., BOSSET, J.O. and RUEGG, M. (1987). In: *Cheese: Chemistry, Physics and*

## Bibliografía

- Microbiology*, Volume 2. pp 93-120. P.F. Fox Ed. Elsevier Applied Science Publishers. London. UK.
- STEPANIAK, L., TOBIASSEN, R.O., CHUKWU, I., PRIPP, A.H. and SORHAUG, T. (1998). Purification and characterization of a 33 kDa subunit oligopeptidase from *Propionibacterium freudenreichii* ATCC-9614. *International Dairy Journal*, **8**, 33-37.
- STONE, H. and SIDEL, J.L. (1985). *Sensory Evaluation Practices*. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press. Inc. Orlando, pp 194-225. USA.
- STONE, H., SIDEL, J., OLIVER, S., WOOLSEY, A. and SINGLETON, R.C. (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology*, **28**, 224-234.
- SUÁREZ, J.A., BARNETO, R. and IÑIGO, B. (1984). Microbiological study of Torta del Casar cheese. *Industrias Lacteas Españolas*, **67**, 25-26.
- SZCZESNIAK, A.S. (1975). General foods texture profile revised-ten years perspective. *Journal of Texture Studies*, **6**, 5-17.
- TABORDA, G., MOLINA, E., MARTÍNEZ-CASTRO, I., RAMOS, M. and AMIGO, L. (2003). Composition of the water-soluble fraction of different cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 270-276.
- TAN, P.S.T. and KONINGS, W.N. (1990). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 256-261.
- TAN, P.S.T., POOLMAN, B. and KONINGS, W.N. (1991). Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied Environmental Microbiology*, **57**, 3.593-3.599.
- TAN, P.S.T., POOLMAN, B. and KONINGS, W.N. (1993). Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*, **60**, 269-277.
- TATINI, S.R., JEZESKI, J.J., MORRIS, H.A., OLSON, J.C. and CASMAN, E.P. (1971). Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. *Journal of Dairy Science*, **54**, 815-825.
- TAVARIA, F.K., SOUSA, M.J., DOMINGOS, A., MALCATA, F.X., BRODELIUS, P., CLEMENTE, A. and PAIS, M.S. (1997). Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3.760-3.765.
- TEJADA, L. (1999a). Efecto de la congelación sobre las características de quesos de oveja artesanos: aspectos físico-químicos y organolépticos. *Tesina de Licenciatura*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- TEJADA, L., VIOQUE, M., GÓMEZ, R., MATA, C., SÁNCHEZ, E. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1999b). Características físico-químicas, bioquímicas y sensoriales de queso artesano de oveja durante el almacenamiento en congelación. Simposio Internacional: Caracterización de los Productos Ganaderos de la Dehesa. Mérida. España.
- TEJADA, L., GÓMEZ, R., VIOQUE, M., SÁNCHEZ, E., MATA, C. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2000). Effect of freezing and frozen storage on the sensorial characteristics of Los Pedroches, a Spanish ewe cheese. *Journal of Sensory Studies*, **15**, 251-262.
- TEJADA, L., GÓMEZ, R., VIOQUE, M., PRADOS, F. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2001a). Microbiological and chemical characteristics of ewes' milk cheeses made with a powdered vegetable coagulant and rennet. *XVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología*. Alicante. España.
- TEJADA, L., GÓMEZ, R., VIOQUE, M., PRADOS, F. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2001b). Microbiological and sensory characteristics of ewes' milk cheeses made with a powdered vegetable coagulant and rennet. *V Congreso Internacional de Alimentación, Nutrición y Dietética*. Madrid. España.
- TEJADA, L. (2001). Propuesta de mejora de la calidad, tecnología y seguridad del queso artesano de oveja. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- TEJADA, L., SANCHEZ, E., GÓMEZ, R., VIOQUE, M. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2002). Effect of freezing and frozen storage on chemical and microbiological characteristics in ewes' milk cheese. *Journal of Food Science*, **67**, 126-129.
- TEJADA, L., PRADOS, F., VIOQUE, M. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2003a). Evolución de los ácidos grasos libres y esterificados en quesos de Los Pedroches. *Industrias Lácteas Españolas*, **290**, 36-41.
- TEJADA, L., GÓMEZ, R., VIOQUE, M., SÁNCHEZ, E., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J., PINO CAMPOS, A. y PRADOS SILES, F. (2003b). Influencia de la congelación en las características físico-químicas, bioquímicas y sensoriales del queso. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **177**, 61-66.
- TEJADA, L. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2003). Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf



## Bibliografía

- rennet. *Italian Journal of Food Science*, **15**, 125-132.
- TEJADA, L., GÓMEZ, R., VIOQUE, M., PRADOS, F. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2005). Influencia de algunos factores sobre la actividad coagulante de extractos liofilizados de cardos de las especies *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*. *Alimentaria*. Pendiente de publicación.
- THIERRY, A., MAILLARD, M.B. and LE QUERE, J.L. (1999). Dynamic headspace analysis of Emmental aqueous phase as a method to quantify changes in volatile flavour compounds during ripening. *International Dairy Journal*, **9**, 453-463.
- THOMAS, T.D. and PRITCHARD, G.G. (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Reviews*, **46**, 245-268.
- TOBIASSEN, R.O., PRIPP, A.H., STEPANIAK, L. and SORHAUG, T. (1996). Purification and characterization of an endopeptidase from *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Dairy Science*, **79**, 2.129-2.136.
- TORNADIJO, M.E., MARRA, A.I. y CARBALLO, J. (1998). Alteraciones y defectos de los quesos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **17**, 67-77.
- TRUJILLO, A.J., CARRETERO, C. y GUAMIS, B. (1994). Los coagulantes en la industria quesera. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **13**, 91-97.
- TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B. and CARRETERO, C. (1997a). Proteolysis of goat casein by calf rennet. *International Dairy Journal*, **7**, 579-588.
- TUNICK, M., MACKEY, K.L., SMITH, P.W. and HOLSINGUER, V.H. (1991). Effects of composition and storage on the texture of Mozzarella cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **45**, 117-125.
- TUNICK, M.H., COOKE, P.H., MALIN, E.L., SMITH, P.W. and HOLSINGUER, V.H. (1997). Reorganization of casein submicelles in Mozzarella cheese during storage. *International Dairy Journal*, **7**, 149-155.
- UCEDA, R., GUILLÉN, A.M., GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1994a). Chemical and rheological characteristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw-milk preserved by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft*, **49**, 494-499.
- UCEDA, R., PICÓN, A., GUILLEN, A.M., GAYA, P., MEDINA, M. and NÚÑEZ, M. (1994b). Characteristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw-milk preserved by addition of carbon-dioxide or by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft*, **49**, 678-683.
- URBACH, G. (1991). Butter flavour in food systems. *Food Research Quality*, **51**, 50-54.
- USTUNOL, Z., KAWACHI, K. and STEFFE, J. (1995). Rheological properties of Cheddar cheese as influenced by fat reduction and ripening time. *Journal of Food Science*, **60**, 1.208-1.210.
- USTUNOL, Z. and ZECKER, T. (1996). Relative proteolytic action of milk-clotting enzyme preparations on bovine alpha-casein, beta-casein and kappa-casein. *Journal of Food Science*, **61**, 1.136-1.144.
- VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A. (1999). Influence of pH and NaCl on proteolytic and esterolytic activity of intracellular extract of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* K(1)G(8) strain. *Milchwissenschaft*, **54**, 314-316.
- VANBOEKEL, M.A.J.S. and CRIJNS, C.L. (1994). Behavior of the proteose peptone fraction during renneting of milk. Netherlands. *Milk and Dairy Journal*, **48**, 117-126.
- VARNAM, H. and SUTHERLAND, J. (1995). In: *Technology, chemistry and microbiology*. Vol 1. Food Product series. Milk and milk products. Ed Chapman y Hall. London UK.
- VEMA, A. and ANAND, S.R. (1987). Biochemical changes associated with ripening of Cheddar cheese from buffalo milk: The lipid composition of buffalo milk and zero-day curd. *Journal of Food Science and Technology*, **24**, 116-120.
- VERISSIMO, P., ESTEVES, C., FARO, C. and PIRES, E.V. (1995). The vegetable rennet on *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology letter*, **17**, 621-626.
- VERISSIMO, P., FARO, C., MOIR, A. J., LIN, Y., TANG, J. and PIRES, E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry*, **235**, 762-768.
- VERNOZY-ROZAND, C., MEYRAND, A., MAZUY, C., DELIGNETTEMULLER, M.L., JAUBERT, G., PERRIN, G., LAPEYRE, C. and RICHARD, Y. (1998). Behavior and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats milk lactic cheeses. *Journal of Dairy Research*, **65**, 273-281.
- VICENTE, M.S., RODRIGUEZ, L.J. and BARCINA, Y. (1992). Características del queso Idiazabal elaborado con adición de fermentos y diferentes tipos de cuajo. *Sustrai*, **26**, 43-44.
- VIEIRA DE SÁ, F. and BARBOSA, M. (1972). Cheesemaking with a vegetable

## Bibliografía

- rennet from cardo (*Cynara cardunculus*). *Journal of Dairy Research*, **39**, 335-343.
- VIOQUE, M. (1997). Conservación de quesos de oveja artesanos envasados en aceite y a vacío. Características físico-químicas, organolépticas y microbiológicas. Tesina de Licenciatura. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.
- VIOQUE, M., TEJADA, L., GÓMEZ, R., MATA, C., SÁNCHEZ, E. y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (1999). Efecto de la conservación en aceite y a vacío sobre los atributos sensoriales de queso artesano de oveja. *Simposio Internacional: Caracterización de los Productos Ganaderos de la Dehesa*. Mérida. España.
- VIOQUE, M., GÓMEZ, R., SÁNCHEZ, E., MATA, C., TEJADA, L. and FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2000). Physico-chemical, biochemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *C. cardunculus* and *C. humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 451-456.
- VIOQUE, M. (2002). Estudio de los parámetros físico-químicos y organolépticos implicados en la calidad de los quesos de oveja elaborados con enzimas coagulantes de plantas. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- VIRTO, M., CHAVARRI, F., BUSTAMANTE, M.A., BARRON, L.J.R., ARAMBURU, M., VICENTE, M.S., PÉREZ-ELORTONDO, F.J., ALBISU, M. and DE RENOBALLES, M. (2003). Lamb rennet paste in ovine cheese manufactured. Lipolysis and flavour. *International Dairy Journal*, **13**, 391-399.
- VISSER, S.K.J. and SLANGEN, A.C. (1977). On the specificity of chimosin (rennin) in its action on bovine  $\beta$ -casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **31**, 16-22.
- VISSER, F.M.W. and GROOT-MOSTERT, A.E.A. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. IV. Protein breakdown: A gel electrophoretic study. *New Zealand Milk Dairy Journal*, **31**, 247.
- VISSER, S.K.J. (1991). Factors affecting rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. Rheological and fracture properties of cheese. *Bulletin International Dairy Federation*, **268**, 49-61.
- VISSER, S. (1993). Symposium: Proteolytic enzymes and cheese ripening. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *Journal of Dairy Science*, **76**, 329-350.
- WALLACE, J.M. and FOX, P.F. (1997). Effect of adding free amino-acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavor and texture development. *International Dairy Journal*, **7**, 157-167.
- WALSH, C.D., GUINEE, T.P., HARRINGTON, D., MEHRA, R., MURPHY, J., CONNOLLY, J.F. and FITZGERALD, R.J. (1995). Cheddar cheese-making and rennet coagulation characteristics of bovine milks containing kappa-casein AA or BB genetic-variants. *Milchwissenschaft*, **50**, 492-496.
- WALSH, C.D., GUINEE, T.P., HARRINGTON, D., MEHRA, R., MURPHY, J. and FITZGERALD, R.J. (1998a). Cheese-Making, compositional and functional characteristics of low-moisture part-skim mozzarella cheese from bovine milks containing kappa-casein AA, Ab or BB genetic-variants. *Journal of Dairy Research*, **65**, 307-315.
- WALSH, C.D., GUINEE, T.P., REVILLE, W.D., HARRINGTON, D., MURPHY, J., O'KENNEDY, B.T. and FITZGERALD, R.J. (1998b). Influence of kappa-casein genetic variant on rennet gel microstructure Cheddar cheesemaking properties and casein micelle size. *International Dairy Journal*, **8**, 707-714.
- WALSH, C.D., GUINEE, T.P., HARRINGTON, D., MURPHY, J. and FITZGERALD, R.J. (1999). Ripening characteristics of Cheddar cheese made from bovine milk containing kappa-casein AA or BB genetic variants. *Milchwissenschaft*, **54**, 323-326.
- WALSTRA, P. y JENNESS, R. (1987). Química y física lactológica. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- WALSTRA, P., GEURTS, T.J., NOOMEN, A., JELLEMA, A. y VAN BOEKEL, M.A.J.S. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- WEIMER, B., DIAS, B., UMMADI, M., BROADBENT, J., BRENNAND, C., JAEGGI, J., JOHNSON, M., MILANI, F., STEELE, J. and SISSON, D.V. (1997). Influence of NaCl on pH on intracellular enzymes that influence Cheddar cheese during ripening. *Le Lait*, **77**, 383-398.
- WEINSTEIN, M.J. and DOOLITTLE, R.F. (1972). Differential specificities of thrombin plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **258**, 577.
- WIJESUNDERA, C., DRURY, L., MUTHUKU-MARAPPAN, K., GUNASEKARAN, S. and EVERETT, D.W. (1998). Flavour development and distribution of fat globule size and shape in Cheddar-type cheeses made from skim milk homogenized with AMF or its fractions. *Australian Journal of Dairy Technology*, **53**, 107.
- WILKINSON, M.G., GUINEE, T.P., O'CALLAGHAN, D.M. and FOX, P.F. (1993). Effect of commercial enzymes on

## Bibliografía

- proteolysis and ripening in Cheddar cheese. *Le Lait*, **72**, 449-459.
- WILLIAMS, A.A. and LANGRON, S.P. (1984). The use of free-choice profiling for the evaluation of commercial ports. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **35**, 558-568.
- WILLIAMS, A.G., FELIPE, X. and BANKS, J.M. (1998). Aminopeptidase and dipeptidyl peptidase activity of *Lactobacillus* spp. An non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, **8**, 255-266.
- WIUM, H. and QVIST, K.B. (1998). Prediction of sensory texture of Feta cheese made from ultrafiltered milk by uniaxial compression and shear testin. *Journal of Texture Studies*, **29**, 215-232.
- WOOLEY, L. and HALL, H.R. (1931). Ur of the Chaldees. Ernest Benn Ltd London.
- YAMASHITA, T., HIGASHI, S., HIGASHI, T., MACHIDA, H., IWASAKI, S., NISHIYAMA, M. and BEPPU, T. (1994). Mutation of a fungal aspartic proteinase, *Mucor pusillus* rennin, to decrease thermostability for use as a milk coagulant. *Journal of Biotechnology*, **32**, 17-28.
- YAN, T.R., AZUMA N., KAMINOGAWA, S. and YAMAUCHI, K. (1987a). Purification and characterization of a substrate-size-recognizing metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 2.296-2.301.
- YAN, T.R., AZUMA, N., KAMINOGAWA, S. and YAMAUCHI, K. (1987b). Purification and characterization of a novel metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris*. *European Journal of Biochemistry*, **163**, 259-265.
- YANG, S.T. and SILVA, E.M. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate milk lactose. *Journal of Dairy Science*, **78**, 2.541-2.562.
- YOUNIS, M.F., TAMINE, A.Y., DAVIES, G., HUNTER, E.A. and ABO EL-HADY, S. M. (1991). Production of processed cheese using Cheddar cheese and cheese base. 5. Rheological properties. *Milchwissenschaft*, **46**, 701-705.
- YOUSIF, B.H., McMAHON, D.J. and SHAMMET, K.M. (1996). Milk-clotting enzyme from *Solanum dobium* plant. *International Dairy Journal*, **6**, 637-644.
- YUN, J.J., BARBANO, D.M. and KINDSTEDT, P.S. (1993). Mozzarella cheese - impact of coagulant type on chemical composition and proteolysis. *Journal of Dairy Science*, **76**, 3.648-3.656.
- YVON, M., THIROUIN, S., RIJNEN, L., FROMENTIER, D. and GRIPON, J.C. (1997). An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino-acids to cheese flavor compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 414-419.
- YVON, M., CHAMBELLON, E., BOLOTIN, A. and ROUDOT-ALGARON, F. (2000). Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 571-577.
- ZANNONI, M., BERTOZZI, L. and HUNTER, E.A. (1994). Comparison of Parmigiano-Reggiano and American Parmesan cheeses by sensory analysis of texture. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, **45**, 505-518.
- ZANNONI, M. (1995). Preliminary results of employ of an artificial nose for the evaluation of cheese. *Science Tecnological Lait Casearia*, **46**, 277-289.
- ZANNONI, M. and PIGONNI, S. (1997). Evolution of sensory texture characteristics during the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero. Casearia*, **48**, 181-188.
- ZHANG, D. and MAHONEY, A.W. (1991). Iron fortification of process Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **74**, 353-358.
- ZORILLA, S.E. and RUBIOLO, A.C. (1999). Sensory analysis during ripening of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine. *Food Science and Technology International*, **6**, 251-254.

