

Capítulo 3. Estrategias tecnológicas para acelerar la maduración y diversificar el flavor en quesos duros

En el presente capítulo se indagará en la identificación de estrategias tecnológicas destinadas a acelerar la maduración y/o diversificar el flavor de quesos duros. En primer lugar, se expondrán los estudios del impacto de distintos tratamientos físicos aplicados a la leche de elaboración (homogeneización, tratamiento térmico) o aplicados al producto final (HPH) en la maduración de los quesos. En particular, se analizará el efecto de los mismos sobre las actividades enzimáticas (plasmina y coagulante) y la bioquímica de la maduración: proteólisis, lipólisis, flavor y sus características sensoriales. En segundo lugar, se presentarán resultados referidos al diseño de fermentos primarios y adjuntos y su impacto en la maduración, ofreciendo la posibilidad de diseñar productos a medida.

3.1. Tratamientos físicos aplicados durante el proceso de elaboración

M. Ayelén Vélez, M. Cristina Perotti, Luciana Costabel, Mario Candiotti, Leila Pozza, Susana Palma, Carlos Meinardi, Verónica Wolf, Carina Bergamini y Erica Hynes.

3.1.1. Pre-tratamiento de la leche de quesería: agitación mecánica y homogeneización

La manufactura del queso consiste básicamente en un proceso de deshidratación, donde la grasa y las caseínas de la leche se concentran, y prosigue con la etapa de maduración que conduce al producto final, con características únicas de aroma, textura y flavor (McSweeney, 2004). La transformación de la cuajada en queso es consecuencia de cambios físicos y complejas reacciones químicas y bioquímicas, todos ellos de gran influencia en las características finales de los productos que involucran la difusión de sales, la evaporación del agua, los equilibrios químicos del calcio, metabolismo del lactato y citrato, degradación de las proteínas y lípidos y catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos libres (McSweeney y Sousa, 2000).

En particular, la lipólisis es la hidrólisis enzimática de los triacilglicerol (TAG) para dar ácidos grasos libres (AGL, desde C4:0 hasta C 18:2), glicerol, mono y diacilglicéridos. En algunos tipos de quesos la lipólisis es indeseable, pero en quesos

duros italianos o en el queso Reggiano, una lipólisis moderada es deseable ya que contribuye al desarrollo del flavor genuino (Candiotti y col., 2002; Collins y col., 2003). En este tipo de queso los agentes lipolíticos son la lipasa nativa de la leche, lipoproteína lipasa (LPL), y las enzimas de los fermentos lácticos y bacterias lácticas no pertenecientes al fermento (non- starter lactic acid bacteria, NSLAB). En la leche cruda la hidrólisis enzimática no se produce espontáneamente debido a que las enzimas lipolíticas y su sustrato se encuentran compartimentalizados: los TAG dentro de glóbulos rodeados por una membrana (milk fat globule membrane, MFGM) y la LPL asociada a la fase proteica (Collins y col., 2003). Sin embargo, los procesos físicos aplicados a la leche antes de la elaboración de quesos (agitación mecánica, bombeo, homogeneización) pueden disminuir la acción protectora de la membrana del glóbulo graso y favorecer la lipólisis (Evers, 2004).

Con el objeto de incrementar las reacciones de lipólisis en quesos actuando sobre la compartimentalización sustrato graso – enzimas lipolíticas, es decir, incrementando la accesibilidad de las enzimas lipolíticas a su sustrato, en el INLAIN se realizaron experiencias aplicando un tratamiento físico de agitación mecánica y bombeo a la leche de quesería (Vélez y col., 2011). No existen reportes previos de la aplicación de este tipo de pre-tratamientos a la leche para elaboración de quesos. Es por ello que, con el fin de seleccionar un protocolo adecuado, se estudiaron mezclas de leche y crema de distintos porcentajes de grasa (5%, 15% y 30%) a distintas temperaturas (5, 15 y 45°C). El daño a la membrana del glóbulo graso se estimó mediante la medida de la grasa liberada y observación microscópica. Las condiciones más apropiadas fueron 5°C y 30% de contenido graso y agitación mecánica a 2800 rpm durante 2 min. Este tratamiento se aplicó a la elaboración de cuajadas miniatura donde se evaluó la retención de materia grasa, humedad y lipólisis. El protocolo llevado a cabo no incrementó la pérdida de grasa en el suero ni causó detrimento alguno en la coagulación y en la sinéresis de la cuajada, por lo que no hubo modificaciones en los valores de humedad; la lipólisis determinada por cromatografía de gases no se vio incrementada respecto a cuajadas controles. El pre-tratamiento de la leche se aplicó luego a la elaboración de quesos Reggiano miniatura (5L), donde además se evaluó la influencia de la pasteurización sobre la lipólisis y producción de compuestos volátiles durante la maduración (12°C/ 90 días) (Vélez y col., 2010). Para ello, se realizó un diseño

experimental en el que se evaluaron dos factores: el tratamiento térmico a dos niveles (pasteurizado y no pasteurizado; en este último se empleó una sanitización no-térmica mediante un descremado natural) y el tratamiento físico (crema agitada y no agitada). Los factores estudiados no influyeron sobre el contenido de ácidos grasos libres totales ya que el nivel de lipólisis global se incrementó de manera similar durante la maduración en todos los quesos, hayan sido elaborados con leche cruda o pasteurizada, y con tratamiento mecánico de agitación o no. En cuanto al perfil de AGL, los ácidos de cadena corta (C4:0 – C8:0) fueron significativamente afectados siendo mayor la proporción en los quesos elaborados con leche cruda. Este incremento puede ser atribuido tanto a la acción de la LPL como a las enzimas lipolíticas microbianas y reviste importancia ya que estos ácidos grasos tienen una influencia directa en el flavor. Además, en ausencia de tratamiento térmico y en algunos casos bajo condiciones que favorecieron la descompartimentalización enzima-sustrato, se produjeron cantidades incrementadas de compuestos volátiles derivados de la grasa como 2-heptanona y 2-nonanona, hexanoato de etilo, butanoato de etilo y butanoato de isoamilo. De esta experiencia, pudo apreciarse que el pre-tratamiento de la leche de elaboración por agitación tuvo un impacto bajo en la lipólisis ya que sólo en algunos casos fue significativo y siempre interaccionando con el tratamiento térmico; además, quedó en evidencia que los cambios favorables en lipólisis y producción de aromas derivados de la grasa se obtuvieron sólo en presencia de leche cruda.

Frente a los resultados obtenidos se decidió profundizar el estudio acerca de la accesibilidad enzima-sustrato mediante una nueva experiencia de elaboración de miniquesos, en los que el tratamiento de desestabilización del glóbulo graso fuera más energético. Esta consistió en la aplicación de una etapa de homogeneización de la fracción grasa de la leche de elaboración, utilizando en todos los casos leche cruda (Vélez y col., 2017). El principio básico de la homogeneización consiste en provocar la disrupción de los glóbulos grasos mediante el pasaje de la leche a presión por un orificio de pequeño diámetro. La brusca descompresión posterior provoca torbellinos que generan un esfuerzo de corte elevado y eventualmente cavitación, fenómenos que conllevan la disrupción de las gotas de grasa y reducción del tamaño, con el concomitante aumento de la superficie o área total de la interfase grasa/agua, lo que implica la formación de una nueva membrana - membrana artificial o de reposición -, que consiste en restos de

membrana nativa y otros componentes (micelas de caseínas, proteínas del suero) que se adsorben en la interfase. Por lo tanto, este proceso favorecería la accesibilidad a la grasa a las enzimas lipolíticas (Walstra y col., 1999; Kelly y col., 2008).

A diferencia del tratamiento mecánico, existen antecedentes de la aplicación de homogeneización a la leche de quesería en algunas tecnologías particulares con el fin de acelerar la lipólisis para mejorar el flavor, como en el caso de los quesos madurados con hongos (Johnson, 2011). Por otro lado, también se ha utilizado para variedades de quesos con bajo contenido de grasa con el fin de mejorar la textura, obteniendo mayor humedad y quesos de cuerpo más suave o cremoso. Sin embargo, no hay informes previos de este procedimiento aplicado en quesos duros.

En los ensayos desarrollados en el INLAIN se observó un aumento inicial significativo de la concentración total promedio de los ácidos grasos libres en quesos elaborados con crema homogeneizada (H) con respecto a los quesos sin aplicar homogeneización (controles, C). En efecto, en los quesos elaborados con leche homogeneizada se alcanzaron niveles máximos de lipólisis en los primeros días, mientras que en los quesos controles dichos niveles se incrementaron gradualmente durante la maduración. En cuanto al perfil de ácidos grasos cortos y medios, a los 3 días las concentraciones de los ácidos grasos fueron superiores en los quesos H, siendo el C10:0 el más abundante. En los quesos las concentraciones de estos ácidos fueron similares entre sí. A los 90 días, se observó una diferenciación en el perfil con respecto al inicial, ya que el ácido graso más abundante en los quesos C y H fue el C4:0. Mientras que C4:0, C6:0 y C8:0 presentaron valores similares en C y H, y C10:0 y C12:0 mostraron concentraciones significativamente superiores en H. Al igual que el aumento inicial de lipólisis encontrado en los quesos homogeneizados, estas diferencias en los ácidos grasos en particular se explican con la mayor accesibilidad lograda para las enzimas lipolíticas a su sustrato, especialmente la LPL que se encuentra activa en quesos de leche cruda. Al final de la maduración, los niveles de ácidos grasos libres totales eran similares en todos los productos. Estos resultados indican que la estrategia de aumento de contacto grasa – enzimas lipolíticas fue exitosa para acelerar las reacciones enzimáticas de lipólisis. En cuanto a los compuestos volátiles, se observó que algunos derivados del catabolismo de los AGL, tales como hexanal, heptanal, nonanal y metilcetonas (C5 a C9), se formaron

preferentemente en quesos elaborados con leche homogeneizada, en diferentes tiempos de maduración.

3.1.2. Modificaciones en la tecnología de elaboración: lavado, tipo de enzima coagulante y cocción de la cuajada

La proteólisis es el conjunto de reacciones de hidrólisis que tiene lugar sobre las caseínas intactas y sobre los péptidos derivados de ellas, y confieren a los quesos propiedades únicas de sabor, textura y aroma. Durante la maduración de quesos, la hidrólisis inicial de las caseínas es producida por el coagulante y por la enzima nativa plasmina, lo cual resulta en la formación de péptidos largos que luego son degradados por enzimas de la microflora perteneciente y no perteneciente al fermento (Chitpinyol y Crabbe, 1998). La formación de péptidos y de aminoácidos libres contribuye al flavor, por actuar como precursores de compuestos de gran impacto (Upadhyay y col., 2004a).

La plasmina (EC 3.4.21.7) es una serina proteinasa derivada de la sangre; su pH y temperatura óptimos son 7,5 y 37 ° C, respectivamente. En la leche, preferentemente hidroliza la β -caseína en γ -caseínas, pero también puede hidrolizar α S2-caseína (Rampilli y Raja, 1998). La plasmina pertenece a un sistema complejo que incluye la enzima activa, su precursor inactivo plasminógeno, activadores de plasminógeno y 2 inhibidores: el inhibidor de la plasmina y los inhibidores de los activadores del plasminógeno. Mientras que los inhibidores de la plasmina están localizados en la fracción de suero de leche, la plasmina está predominantemente unida a las micelas de caseína (Grufferty y Fox, 1988). La estabilidad térmica de la plasmina es relativamente alta dado que se requiere de un tratamiento térmico a 80 ° C durante 10 minutos para completar la inactivación de la misma; por el contrario, los inhibidores son termolábiles (Somers y Kelly, 2002). De esta manera, la contribución de la plasmina a la hidrólisis primaria de las caseínas es más pronunciada en quesos de pasta cocida (Sousa y col., 2001; Somers y Kelly, 2002).

Debido a la importancia de la plasmina en la maduración de diversos tipos de quesos, varios grupos de investigación han desarrollado estudios basados en el incremento de la concentración de la misma para acelerar este proceso. Entre distintas alternativas, se destaca el agregado de plasmina exógena a la leche de elaboración. Farkye y Fox (1992) consiguieron al final de la maduración de queso Cheddar un 20% más de nitrógeno

soluble. Somers y col. (2002) observaron una mayor hidrólisis de la β -caseína en queso Mozzarella y O'Farrell y col. (2002) verificaron una mayor proteólisis primaria en quesos madurados en superficie. Otra estrategia consiste en lograr un aumento de la concentración de plasmina en el queso por medio de la activación del plasminógeno agregando uroquinasa. Esta técnica ha sido ensayada sobre quesos Suizos (Bastian y col., 1997) y Cheddar (Barrett y col., 1999; Milesi y col., 2008), conduciendo a un aumento de la proteólisis primaria. La estreptoquinasa, una proteasa exocelular producida por *Streptococcus uberis*, forma un complejo con el plasminógeno que induce a un cambio conformacional que activa la plasmina sin mediar una escisión proteolítica (Johnsen y col., 2000). Según Upadhyay y col. (2004b), la estreptoquinasa adicionada a la leche de elaboración de queso Cheddar activó la mayor parte del plasminógeno, lo que derivó en una aceleración de la proteólisis, como lo indicaron el aumento de nitrógeno soluble a pH 4,6 y la hidrólisis de la β caseína. Somers y Kelly (2002) estudiaron el efecto del tratamiento térmico de la leche y de la temperatura de cocción sobre quesos miniatura, concluyendo que la cocción tiene un efecto positivo importante sobre la actividad de la plasmina pero que no sucede lo mismo con la temperatura de tratamiento térmico previo de la leche. Exceptuando este trabajo, existe escasa información sobre las operaciones de la fabricación del queso que puedan llevar a un incremento de la actividad de la plasmina.

En cuanto al coagulante, consiste principalmente en quimosina pura, que es una proteinasa aspártica ácida (E.C. 3.4.23.4) con un pH óptimo de aproximadamente 4,0 y una actividad de coagulación de la leche altamente específica a pH 6,7. La cantidad residual de enzima coagulante que permanece en la cuajada después del drenaje del suero es de hasta el 15%, ya que el resto se pierde en el suero (Sousa y col., 2001). La retención de la actividad coagulante en la cuajada depende de factores tecnológicos como el pH de drenaje, la temperatura de cocción y la humedad del queso (Jacob y col., 2010). Durante la maduración del queso, la acción proteolítica de la quimosina sobre la caseína α S1 libera los péptidos α S1 (f1-23) y α S1-I (f24-199) que se observan en una etapa temprana de la maduración en quesos blandos ya que retienen grandes cantidades de suero y la cuajada no se somete a tratamiento térmico (Hynes y col., 2001; Bansal y col., 2007). Existe cierta incertidumbre con respecto al grado de inactivación de la quimosina en los quesos cocidos. Se sabe que cantidades más bajas de cuajo se retienen

en los quesos duros debido a su menor contenido de humedad y a la desnaturalización causada por la temperatura. A pesar de estos hechos, se ha informado que la inactivación del coagulante en los quesos cocidos es parcial o reversible (Hayes y col., 2002; Hynes y col., 2004; Costabel y col., 2015).

Con el fin de planear estrategias para intensificar las reacciones de proteólisis, en el INLAIN se realizaron ensayos para evaluar las siguientes variables: pH de drenado de suero, temperatura de cocción de la cuajada e incorporación de una etapa de lavado de la cuajada (Vélez y col., 2015b; Vélez y col., 2016). Estos parámetros se evaluaron, en una primera etapa, en pseudocuajadas modelo mediante el análisis de la actividad de las enzimas plasmina y coagulante y su contribución a la proteólisis. El aumento del pH y el lavado de la cuajada afectaron positivamente la actividad de la enzima plasmina y aumentaron su impacto en la proteólisis, lo que fue evidenciado en un incremento de péptidos solubles en la zona del cromatograma donde eluyen los péptidos hidrofóbicos. Por el contrario, no se detectó una influencia de la temperatura de cocción en la acción de la enzima. En cuanto al plasminógeno, su actividad no se modificó. Además, se detectó que la acción del coagulante se incrementó por la disminución del pH de drenado de suero y de la temperatura de cocción, y que el lavado no modificó significativamente su acción. Estos resultados se correspondieron con incrementos en la proteólisis detectados tanto por perfiles de péptidos solubles como por electroforesis y fracciones nitrogenadas. El tiempo de almacenamiento de las pseudocuajadas, establecido en 7 días, fue suficiente para realizar un *screening* preliminar de los tratamientos favorables a la acción de la enzima plasmina y coagulante. En una segunda etapa, se evaluaron estrategias para intensificar los niveles de proteólisis en queso duro utilizando un modelo de queso miniatura, madurado 90 días a 12°C. Se estudió la influencia de la temperatura de cocción (50 y 56 °C) y el tipo de enzima coagulante recombinante utilizada (quimosina bovina y quimosina de camello) (Costabel y col., 2015). Se verificó que la actividad coagulante residual fue significativamente menor en los quesos sometidos a una temperatura de cocción más alta mientras que la actividad de la plasmina fue similar a las dos temperaturas, corroborándose lo observado en el modelo de las pseudocuajadas. Los perfiles electroforéticos de los quesos de 50°C mostraron la fracción $\alpha 1$ -I desde el inicio de la maduración, mientras que en los de 56°C recién se apreció a los 50 días. Estos resultados se correlacionaron con los

obtenidos para los perfiles peptídicos. A medida que avanzó la maduración de los quesos, se observó un incremento de la proteólisis, que fue mayor en los quesos de 50°C. Asimismo, también se verificó que la actividad coagulante tendió a igualarse al final de la maduración en los quesos obtenidos a diferentes temperaturas de cocción lo que sugiere, como ya fue mencionado anteriormente, una reactivación de la enzima. El tipo de enzima coagulante tuvo un impacto diferente en la proteólisis de los quesos únicamente cuando se utilizó una cocción a 56°C. A esta temperatura la quimosina bovina mostró una mayor actividad proteolítica, evidenciada en los perfiles peptídicos y en los niveles de las fracciones nitrogenadas.

Los efectos de la temperatura y lavado verificados en los estudios descriptos anteriormente también se observaron en quesos de distintos tipos: Cremoso (blando), Pategrás (semiduro) y Reggianito (duro), elaborados a escala industrial y que se maduraron en nuestro Instituto. (Vélez y col., 2015a). Los resultados registrados se relacionaron principalmente con la temperatura de cocción, ya que su disminución incrementó la actividad coagulante, siendo superior en Cremoso, intermedia en Pategrás y baja en Reggianito. En cuanto al sistema plasmina / plasminógeno, se observó una mayor actividad del plasminógeno inactivo en los quesos Reggianito y Cremoso mientras que en el queso Pategrás el nivel del zimógeno fue muy bajo, probablemente porque la activación del mismo se llevó a cabo durante la elaboración del queso cuya tecnología incluye un paso de lavado de cuajada. Tal como se mencionó anteriormente, este procedimiento eliminaría los inhibidores de los activadores del plasminógeno. De hecho, la mayor actividad de la plasmina se encontró en el queso Pategrás lo que indica que el lavado de la cuajada combinado con el tratamiento térmico suave de la misma favoreció la activación del plasminógeno. Sin embargo, el ambiente definido por la matriz de queso Reggianito resultó más adecuado para mantener la estabilidad de la actividad de la plasmina a lo largo de la maduración. Los resultados fueron consistentes con la proteólisis registrada en los perfiles de electroforesis y las fracciones nitrogenadas.

3.1.3. Validación de la estrategia tecnológica seleccionada a escala piloto

Finalmente, se diseñó una tecnología modificada teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los modelos, que se validó a escala piloto. Se seleccionaron los cambios

que resultaron más favorables para incrementar las actividades enzimáticas de interés y se evaluó su influencia sobre la proteólisis, lipólisis y la calidad sensorial de los quesos obtenidos. Se realizaron dos elaboraciones en paralelo, una siguiendo la tecnología tradicional para quesos duros de pasta cocida (leche pasteurizada, temperatura de cocción 52°C y sin aplicación de lavado a la cuajada) y otra aplicando la tecnología modificada (leche cruda, fracción grasa -20%- homogeneizada, temperatura de cocción 50°C e incluyendo una etapa de lavado). Los quesos obtenidos con la tecnología modificada mostraron una maduración acelerada, basada tanto en un incremento en la velocidad de lipólisis como en la velocidad de hidrólisis de las caseínas, especialmente debido a la acción del coagulante. En el perfil de compuestos volátiles de estos quesos predominaron aquellos derivados del catabolismo de la grasa, lo cual se correspondió con el análisis sensorial. Los quesos no mostraron rancidez, y el flavor genuino y picante se desarrolló más rápido y sin defectos. Los quesos se retiraron de la cámara de maduración (12°C) a los 60 días, tiempo al que ya alcanzaron un flavor completamente maduro.

Referencias

- Bansal, N., Fox, P. F. y McSweeney, P. L. H. (2007). Factors affecting the retention of rennet in cheese curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9219-9225.
- Barrett, F. M., Kelly, A. L., McSweeney, P. L. H. y Fox, P. F. (1999). Use of exogenous urokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 9(7), 421-427.
- Bastian, E. D., Lo, C. G. y David, K. M. M. (1997). Plasminogen Activation in Cheese Milk: Influence on Swiss Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 80(2), 245-251.
- Candioti, M. C., Hynes, E., Quiberoni, A., Palma, S. B., Sabbag, N. y Zalazar, C. A. (2002). Reggianito Argentino cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *International Dairy Journal*, 12(11), 923-931.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. y Wilkinson, M. G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13(11), 841-866.

- Costabel, L. M., Bergamini, C. V., Pozza, L., Cuffia, F., Candiotti, M. C. y Hynes, E. (2015). Influence of chymosin type and curd scalding temperature on proteolysis of hard cooked cheeses. *Journal of Dairy Research*, 82(3), 375-384.
- Chitpinyol, S. y Crabbe, M. J. C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61(4), 395-418.
- Evers, J. M. (2004). The milkfat globule membrane - Compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *International Dairy Journal*, 14(8), 661-674.
- Farkye, N. y Fox, P. F. (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research*, 59(2), 209-216.
- Grufferty, M. B. y Fox, P. F. (1988). Milk alkaline proteinase. *Journal of Dairy Research*, 55(4), 609-630.
- Hayes, M. G., Oliveira, J. C., McSweeney, P. L. H. y Kelly, A. L. (2002). Thermal inactivation of chymosin during cheese manufacture. *Journal of Dairy Research*, 69(2), 269-279.
- Hynes, E., Delacroix-Buchet, A. y Zalazar, C. (2001). Influence of milk-clotting enzyme in proteolysis during ripening of Cremoso Argentino cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56(3), 208-212.
- Hynes, E. R., Aparo, L. y Candiotti, M. C. (2004). Influence of residual milk-clotting enzyme on α s1 casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino cheese. *Journal of Dairy Science*, 87(3), 565-573.
- Jacob, M., Jaros, D. y Rohm, H. (2010). The effect of coagulant type on yield and sensory properties of semihard cheese from laboratory-, pilot- and commercial-scale productions. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 370-380.
- Johnsen, L. B., Rasmussen, L. K., Petersen, T. E., Etzerodt, M. y Fedosov, S. N. (2000). Kinetic and structural characterization of a two-domain streptokinase: Dissection of domain functionality. *Biochemistry*, 39(21), 6440-6448.
- Johnson, M. E. (2011). Preparation of cheese milk. En Roginski H. F. y Fox P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science* (pp. 544-551). Londres: Elsevier Academic Press.
- Kelly, A. L., Huppertz, T. y Sheehan, J. J. (2008). Pre-treatment of cheese milk: Principles and developments. *Dairy Science and Technology*, 88(4-5), 549-572.

- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 127-144.
- McSweeney, P. L. H. y Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80(3), 293-324.
- Milesi, M. M., McSweeney, P. L. H. y Hynes, E. R. (2008). Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3), 884-892.
- O'Farrell, I. P., Sheehan, J. J., Wilkinson, M. G., Harrington, D. y Kelly, A. L. (2002). Influence of addition of plasmin or mastitic milk to cheesemilk on quality of smear-ripened cheese. *Lait*, 82(3), 305-316.
- Rampilli, M. y Raja, V. (1998). Osservazioni sull'attività di plasmina e plasminogeno nel formaggio. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 49(6), 341-350.
- Somers, J. M., Guinee, T. P. y Kelly, A. L. (2002). The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of mozzarella-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 55(1), 5-11.
- Somers, J. M. y Kelly, A. L. (2002). Contribution of plasmin to primary proteolysis during ripening of cheese: Effect of milk heat treatment and cheese cooking temperature. *Lait*, 82(2), 181-191.
- Sousa, M. J., Ardö, Y. y McSweeney, P. L. H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 327-345.
- Upadhyay, V. K., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A. y Fox, P. F. (2004a). Proteolysis in cheese during ripening. En Fox P., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Timothy P. (Coords.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 1 (pp. 391-433, VIII).
- Upadhyay, V. K., Sousa, M. J., Ravn, P., Israelsen, H., Kelly, A. L. y McSweeney, P. L. H. (2004b). Use of exogenous streptokinase to accelerate proteolysis in Cheddar cheese during ripening. *Lait*, 84(6), 527-538.
- Vélez, M. A., Bergamini, C. V., Ramonda, M. B., Candioti, M. C., Hynes, E. R. y Perotti, M. C. (2015a). Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 282-288.

- Vélez, M. A., Hynes, E. R., Meinardi, C. A., Wolf, V. I. y Perotti, M. C. (2017). Cheese milk low homogenization enhanced early lipolysis and volatiles compounds production in hard cooked cheeses. *Food Research International*, 96, 215-225.
- Vélez, M. A., Perotti, M. C., Candiotti, M. C., Bergamini, C. V. y Hynes, E. R. (2016). Plasmin and coagulant activities in a minicurd model system: Study of technological parameters. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 7053-7062.
- Vélez, M. A., Perotti, M. C., Rebecchi, S. R. y Hynes, E. R. (2015b). Short communication: A new minicurd model system for hard cooked cheeses. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3679-3683.
- Vélez, M. A., Perotti, M. C., Rebecchi, S. R., Meinardi, C. A., Hynes, E. R. y Zalazar, C. A. (2011). Effect of mechanical treatments applied to milk fat on fat retention and lipolysis in minicurds. *International Journal of Dairy Technology*, 64(2), 227-231.
- Vélez, M. A., Perotti, M. C., Wolf, I. V., Hynes, E. R. y Zalazar, C. A. (2010). Influence of milk pretreatment on production of free fatty acids and volatile compounds in hard cheeses: Heat treatment and mechanical agitation. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4545-4554.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. y van Boekel, M. A. (1999). Homogenization. En Fennema, O.R., Karel M., Sanderson G.W., tannenbaum S.R., Walstra P., Whitaker, J.R. (Eds.), *Dairy Technology* (pp. 245-264). Nueva York: Marcel Dekker.

3.2. Tratamientos físicos aplicados durante el proceso de maduración

Luciana Costabel, Carina Bergamini, Erica Hynes y Sergio Vaudagna

3.2.1. Tratamiento con APH en quesos

El tratamiento con alta presión hidrostática (APH) a los quesos se plantea como una estrategia innovadora. El objetivo fundamental de la aplicación de este tratamiento a los mismos es acelerar el extenso período de maduración en el cual se producen las transformaciones bioquímicas de las proteínas, las grasas y los glúcidos que darán lugar a la textura, flavor y funcionalidad de las diferentes variedades de quesos (San Martín González y col., 2007; O'Reilly y col., 2001).

El interés del estudio del efecto del tratamiento con APH sobre quesos se inicia por la prometedora patente de Yokoyama y col. (1992) en la cual se evidencia que quesos Cheddar que fueron expuestos a presiones de 50 MPa durante tres días a 25 °C presentaron una concentración de aminoácidos libres y un flavor comparable a quesos comerciales con seis meses de maduración. A partir de este estudio comienzan a realizarse otras investigaciones en quesos Cheddar (O'Reilly y col., 2000, O'Reilly y col., 2001), Gouda (Messens y col., 1999) y queso duro de cabra (Saldo y col., 2001), utilizando tratamientos similares a los aplicadas por Yokoyama y col.. En general, estos estudios concluyeron que la aplicación de esas combinaciones presión-tiempo tuvo relativamente poco efecto sobre la maduración de los quesos. Esto en parte fue atribuido a que en el estudio de Yokohama y col. se utilizaron niveles 10 veces mayor del fermento que los utilizados comúnmente para la elaboración de queso Cheddar, lo que seguramente influyó en la aceleración de la maduración observada. Comienzan entonces a plantearse otros estudios en diferentes variedades de queso variando las combinaciones presión-tiempo y evaluando el impacto en diversos aspectos relacionados a la maduración (Martínez-Rodríguez y col., 2012).

Dentro de los quesos duros, numerosos estudios se han enfocado en queso Cheddar y quesos de oveja. Sin embargo, en el caso de quesos duros de pasta cocida, los cuales tienen los períodos de maduración más largos, son escasos los estudios publicados.

3.2.2. Tratamiento con APH en queso Reggianito. Impacto en los recuentos microbiológicos y perfiles de maduración

En un estudio realizado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN) en queso Reggiano, se evaluó el impacto de la aplicación del tratamiento con APH y el tiempo de maduración sobre la composición, el pH, los recuentos microbiológicos, la actividad de enzimas proteolíticas que intervienen en la maduración, la proteólisis primaria y secundaria, la textura, los parámetros cromáticos y los atributos sensoriales del queso (Costabel, 2015; Costabel y col., 2016). Para ello, se elaboraron quesos Reggiano miniatura a los cuales se les aplicó presiones de 100 ó 400 MPa durante 5 ó 10 min a 20 °C el día posterior a la elaboración. Algunos quesos no fueron tratados con APH, los que se consideraron como controles. Todos los quesos se maduraron durante 90 días a 12 °C.

3.2.2.1. Composición química, pH y recuentos microbiológicos

La composición química y el pH de los quesos a lo largo de la maduración no resultaron afectados por el tratamiento con APH. Los recuentos de lactobacilos termófilos inmediatamente luego de la aplicación del tratamiento con APH fueron inferiores en los quesos tratados a 400 MPa, con independencia del tiempo de tratamiento. Se informaron resultados similares en quesos Cheddar al aplicar tratamientos con APH utilizando presiones a partir de 400 MPa (Wick y col., 2004; Rynne y col., 2008; Ozturk y col., 2013) en quesos madurados por hongos (Voigt y col., 2010; Calzada y col., 2014), en quesos de cabra (Saldo y col., 2000) y en quesos de oveja (Moschopoulou y col., 2010). La disminución de los recuentos microbiológicos por el tratamiento con APH puede estar asociada a una lisis celular durante la cual se produce la liberación del pool enzimático intracelular, lo que puede tener un efecto en los perfiles de maduración (Wick y col., 2004).

El efecto del tratamiento con APH sobre los microorganismos depende de las condiciones de proceso (nivel de presión aplicada, tiempo de mantenimiento a la presión de trabajo, temperatura), de las características del alimento (composición, pH y actividad de agua) y del tipo de microorganismo (género, especie y cepa) (Cheftel y col., 1995; Huppertz y col., 2006). A diferencia de los sistemas modelos, en los alimentos las bacterias pueden recuperarse luego del tratamiento con APH, lo que frecuentemente es atribuido a un efecto protector por parte de la matriz alimentaria (Wick y col., 2004).

3.2.2.2. Actividad de enzimas proteolíticas y nivel de proteólisis

Se ha informado que la aplicación de un tratamiento APH en etapas tempranas de la maduración puede afectar los parámetros de maduración de los quesos a través de la modulación de las reacciones enzimáticas (Messens y col., 1999; O'Reilly y col., 2000). El rango en el cual la presurización puede pasar de mostrar efectos positivos a negativos en la actividad neta de una enzima depende no sólo de las características moleculares de la enzima y de la matriz alimentaria en la que se encuentra sino también de los otros componentes del sistema enzimático de interés (por ejemplo, de la presencia de precursores e inhibidores enzimáticos en la matriz alimentaria). En queso Reggiano, la actividad de la plasmina se incrementó por la aplicación de APH a 400 MPa durante 10 min. Esto no había sido informado previamente en ningún estudio. En cuanto a la actividad de la enzima coagulante residual, ésta no se vio afectada por el tratamiento con APH, lo que coincide con lo informado en trabajos previos (Messens y col., 1999; Rynne y col., 2008).

Los indicadores de proteólisis evaluados demostraron que esta transformación bioquímica fue afectada por el tratamiento con APH. La fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6 se incrementó en los quesos tratados a 400 MPa, independientemente del tiempo de tratamiento. Asimismo, en los perfiles de electroforesis estos quesos mostraron una mayor intensidad de las fracciones de α_{s1} -I y γ -caseínas especialmente a los 45 días de maduración. El aumento de la proteólisis primaria por efecto del tratamiento con APH también fue observado por otros autores en diferentes variedades de queso. En este sentido, Rynne y col. (2008) encontraron un comportamiento similar al observado en este trabajo en quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min. También en otros trabajos, a presiones próximas a 400 MPa, se ha observado un incremento en la velocidad de la proteólisis primaria en queso de cabra (Saldo y col., 2000), queso de oveja (Juan y col., 2007) y queso Gouda (Messens y col., 2001). Asimismo, los perfiles peptídicos de las muestras tratadas a mayor presión se diferenciaron del resto, lo que evidenció una mayor proteólisis secundaria en los quesos tratados a 400 MPa. También se detectó un leve incremento en los niveles de aminoácidos libres totales con el aumento de la presión aplicada. Los resultados observados en los quesos tratados a 400 MPa sugieren una mayor actividad de peptidasas microbianas, lo que se correlaciona

con la disminución de los recuentos iniciales y probable autólisis de los lactobacilos termófilos del fermento.

3.2.2.3. Textura, parámetros cromáticos y atributos sensoriales

La aplicación del tratamiento con APH a quesos Reggianito tuvo una influencia significativa en los parámetros deformación y esfuerzo a la fractura. Ambos presentaron un valor mayor en los quesos tratados a 400 MPa al inicio de la maduración (independientemente del tiempo de mantenimiento de la presión). El efecto fue reversible ya que con el avance de la maduración no se conservó este efecto del tratamiento. En quesos Cheddar tratados a 400 MPa durante 10 min (Rynne y col., 2008) y en quesos de oveja tratados a 300 MPa durante 10 min (Juan y col., 2008) se observó el mismo incremento en estos parámetros. Sin embargo, sólo en los quesos Cheddar el efecto se mantuvo a lo largo de toda la maduración. Los mayores valores en los parámetros evaluados en los quesos inmediatamente luego del tratamiento a 400 MPa pueden deberse a un cambio conformacional en ese momento puntual que se revierte con el avance de la maduración, durante la cual se produce una re-orientación y/o formación de nuevas uniones lo que resulta en similares valores de los parámetros de textura en los quesos presurizados que en los controles. En este sentido, algunos investigadores plantearon que durante el tratamiento con APH se producen cambios en el equilibrio entre el calcio libre (soluble) y el calcio unido a las caseínas (coloidal). Cuando los quesos se someten a presión, las asociaciones calcio-caseína se rompen y el calcio migra a la fase soluble. Cuando se libera la presión, el equilibrio se restablece pero las asociaciones entre las caseínas no resultan las mismas que las iniciales aunque, con el tiempo, las diferencias en textura entre los quesos tratados y no tratados disminuyen (Saldo y col., 2000).

Con respecto al análisis del perfil de textura (TPA), se observó un efecto en los parámetros elasticidad y cohesividad, presentando todos los quesos tratados a 400 MPa menores valores de estos parámetros a todos los tiempos de maduración analizados. Es probable que la disminución de estos parámetros en los quesos tratados con APH a la mayor presión, se relacione con la mayor proteólisis evidenciada en los mismos. Similar efecto en la elasticidad fue observado en quesos semiduros cuando se aplicaron

presiones de 200 y 400 MPa (Koca y col., 2011) y en quesos de cabra tratados a 50 MPa durante 3 días (Saldo y col., 2001).

El tratamiento con APH no modificó los parámetros cromáticos. Del análisis de la literatura existente y de los resultados del trabajo realizado en queso Reggiano, surge que el efecto del tratamiento con APH sobre el color depende de las características particulares de cada tipo de queso y del tiempo de mantenimiento durante el cual se aplica el tratamiento.

Con respecto a la evaluación sensorial se observó que a los 45 días de maduración los quesos Reggiano tratados a 400 MPa durante 5 y 10 min tuvieron mayor intensidad para los atributos gusto salado y flavor típico y presentaron una menor intensidad para el atributo olor característico en comparación con el control y con las muestras tratadas a 100 MPa. En un estudio previo, en el cual se evaluaron los atributos sensoriales que caracterizan a un queso Reggiano maduro, se encontró que el flavor genuino y gusto salado fueron los más importantes (Ceruti, 2014). Por lo tanto, los atributos que caracterizan a un queso maduro fueron más intensos en los quesos tratados a 400 MPa a los 45 días de maduración que en los controles y los tratados a 100 MPa.

A través de este estudio, se puede concluir que la aplicación de un tratamiento con APH a 400 MPa a quesos Reggiano al inicio de la maduración permitió acelerar la maduración de los mismos, lo cual fue demostrado por un incremento de la proteólisis y peptidólisis en los quesos. Además, los quesos tratados a esa presión mostraron una aceleración en el desarrollo de los atributos sensoriales característicos de un queso maduro.

Referencias

- Calzada J.; del Olmo, A.; Picon, A.; Gaya, P. and Nuñez, M. (2014). Effect of high-pressure-processing on the microbiology, proteolysis, texture and flavour of Brie cheese during cheese ripening and refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 37, 64-73.
- Ceruti, R. J ; Zorrilla, S. E. ; Sabbag, N. G. ; Costa, S. C. and Sihufe, G. A. (2014). Effect of increased initial ripening temperature on the sensory characteristics of Reggiano cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 1-8.
- Costabel, L.M. (2015). *Estrategias tecnológicas para el incremento de la proteólisis y peptidólisis de quesos duros* (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional del Litoral.

- Costabel, L.M.; Bergamini, C.; Vaudagna, S.; Cuatrin, A.; Audero, G. and Hynes, E. (2016). Effect of high-pressure treatment on hard cheese proteolysis. *Journal of Dairy Science*, *99*, 4220-4232.
- Cheftel, J. C. (1995). High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology*, *1*, 75-90.
- Huppertz, T.; Smiddy, M.; Upadhyay, V. K. and Kelly, A. L. (2006). High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. *International Journal of Dairy Technology*, *59*, 58-66.
- Hynes, E. R.; Aparo, L. and Candiotti, M. C. (2004). Influence of residual milk-clotting enzyme on α -s1 casein hydrolysis during ripening of Reggianito Argentino cheese. *Journal of Dairy Science*, *87*, 565-573.
- Juan, B.; Ferragut, V.; Buffa, M.; Guamis, B. and Trujillo, A. J. (2007). Effects of high pressure on proteolytic enzymes in cheese: relationship with the proteolysis of ewe milk cheese. *Journal of Dairy Science*, *90*, 2113-2125.
- Juan, B.; Ferragut, V.; Guamis, B. and Trujillo, A. J. (2008). The effects of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewe's milk cheese. *International Dairy Journal*, *18*, 129-138.
- Koca, N.; Balasubramaniam, V. M. and Harper, W. J. (2011). High-Pressure Effects on the Microstructure, Texture, and Color of White-Brined Cheese. *Journal of Food Science*, *76*, 399-404.
- Martínez-Rodríguez, Y.; Acosta-Muñiz, C.; Olivas, G. I.; Guerrero-Beltrán, J.; Rodrigo-Aliaga, D. and Sepúlveda, D. R. (2012). High Hydrostatic Pressure processing of cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *11*, 399-416.
- Messens, W.; Estepas-Garcia, J.; Dewettinck, K. and Huyghebaert, A. (1999). Proteolysis of high-pressure-treated Gouda cheese. *International Dairy Journal*, *9*, 775-782.
- Messens, W.; Foubert, I.; Dewettinck, K. and Huyghebaert, A. (2001). Proteolysis of high-pressure-treated mould-ripened cheese. *Milchwissenschaft*, *56*, 201-204.
- Moschopoulou, E.; Anisa, T.; Katsaros, G.; Taoukis, P. and Moatsou, G. (2010). Application of high-pressure on ovine brined cheese: Effect on composition and microflora throughout ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, *11*, 543-550.

- O'Reilly, C. E.; Kelly, A. L.; Murphy, P. M. and Beresford, T. P. (2001). High-pressure treatment: applications to cheese manufacture and ripening. *Trends Food Science and Technology*, *12*, 51-59.
- O'Reilly, C. E.; O'Connor, P. M.; Murphy, P. M.; Kelly, A. L. and Beresford, T. P. (2000). The effect of exposure to pressure of 50 MPa on Cheddar ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, *1*, 109-107.
- Ozturk, M.; Govindasamy-Lucey, S.; Jaeggi J. J.; Houck, K.; Johnson, M. E. and Lucey, J. A. (2013). Effect of various high-pressure treatments on the properties of reduced-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, *96*, 6792-6806.
- Rynne, N. M.; Beresford, T. P.; Guinee, T. P.; Sheehan, E.; Delahunty, C. M. and Kelly, A.L. (2008). Effect of high-pressure treatment of 1 day-old full-fat Cheddar cheese on subsequent quality and ripening. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, *9*, 429-440.
- Saldo, J.; Sendra, E. and Guamis B. (2000). High hydrostatic pressure for accelerating ripening of Goat's milk cheese: proteolysis and texture. *Journal of Food Science*, *65*, 636-640
- Saldo, J.; Sendra, E. and Guamis B. (2001). Hard cheese structure after a high hydrostatic pressure treatment at 50 MPa for 72 h applied to cheese after brining. *Lait*, *81*, 625-635.
- San Martín-González, M. F.; Rodríguez, J. J.; Gurram, S.; Clark, S.; Swanson, B. G. and Barbosa-Cánovas, G. V. (2007). Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. *LWT -Food Science and Technology*, *40*, 697-705.
- Voigt, D. D.; Chevalier, F.; Qian, M. C. and Kelly, A. L. (2010). Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, *11*, 68-77.
- Wick, C.; Nienaber, U.; Anggraeni, O.; Shellhammer, T. H. and Courtney, P. D. (2004). Texture proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial Cheddar cheeses treated with high pressure. *Journal of Dairy Research*, *71*, 107-115.
- Yokohama, H.; Sawamura, N. and Motobayashi, N. (1992). Method for accelerating cheese ripening. European patent application EP 0 469 857 A1.

Zalazar, C.A.; Candiotti, M.; Mercanti, D.J.; Bergamini, C.V. and Meinardi, C. (2006).
Maduración acelerada. En Reinheimer J., Zalazar C. (Eds.), *Avances en Microbiología,
Bioquímica y Tecnología de quesos* (pp.267-284). Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL.