



UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, DE LA
ACTIVIDAD FÍSICA Y DEL DEPORTE.

Departamento de Tecnología de la
Alimentación y Nutrición.

Caracterización del queso de Murcia al Vino. Efecto
de la utilización de diferentes coagulantes

Adela Abellán Guillén

Directores: Dr. Luis Tejada Portero
Dr. José M^a Cayuela García

Murcia, Marzo de 2010



UCAM

**Universidad Católica
San Antonio**

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Luis Tejada Portero y el Dr. D. José M^a Cayuela García como Directores⁽¹⁾ de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización del queso de Murcia al Vino. Efecto de la utilización de diferentes coagulantes” realizada por Dña. Adela Abellán Guillén en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS REALES DECRETOS 56/2005 Y 778/98, EN MURCIA A 9 DE MARZO DE 2010.

Dr. Luis Tejada Portero

Jose M^a Cayuela García

- (1)** Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar ambos.

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación.
Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia).
Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78 - C. e.: tercerciclo@pdi.ucam.edu

AGRADECIMIENTOS

Expresar mis agradecimientos es algo que considero en cierto modo, injusto, porque siempre habrá alguien que se pueda sentir excluido, y no es esa mi intención. Por tanto, mi primer gesto de gratitud es para todo aquel, que me dió una idea, una nueva forma de ver las cosas, una manera de hacer una gráfica, una recomendación, réplica,...que de éstos ha habido muchos.

Pero bien es cierto, que hay personas a las que hay que hacer una mención especial.

En primer lugar, a mis directores, José M^a Cayuela y Luis Tejada. Gracias José M^a por darme la oportunidad de volver a reencontrarme con el Queso de Murcia al Vino, y facilitar que pudiera dedicar parte del tiempo a este trabajo. Gracias Luis, por todo. Gracias por tu disponibilidad, por tu paciencia, por tu ejemplo, por tu sentido del humor, por todo lo que me has enseñado, por tu manera de corregir intentando no molestar, por tener siempre buena cara...ese "ya queda poco", "ya esta todo hecho", por fín llegó.

A Gabi, Carmen y Alfonso, porque ellos siempre han estado ahí. Han sido muchas las conversaciones, los agobios, las risas, las lágrimas, los desayunos, en definitiva el día a día, que sin duda, gracias a ellos, han sido mucho más llevaderos. Gracias Carmen por estar siempre pendiente de todo, por la compañía, las coca-colas, por el ordenador... Gracias a Alfonso, por estar siempre dispuesto a lo que hiciera falta, el formato, las gráficas, o la bibliografía, entre otros. Gracias a los tres por empujar siempre hacia delante.

A las nuevas incorporaciones al departamento, Fernando, Eva y Paco, con los que renovamos las ilusiones que a veces se perdían.

Al Departamento de Nutrición, por aguantarme día a día, sin reproches, ni malas caras, y en dónde siempre había y hay, un comentario de ánimo.

A Paco Prados y Antonio Pino del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, por su ayuda en el desarrollo de la tesis.

A la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, la financiación del proyecto (PPC/ 01497/03A).

Al Consejo Regulador de la Denominación de Origen del queso de Murcia al Vino, especialmente a Antonio Luna por su colaboración con el proyecto.

A Juan Carlos y todos los trabajadores de la quesería Villavieja de Calasparra, por permitirnos utilizar sus instalaciones y haber elaborado las partidas de queso utilizadas.

A mi familia, especialmente a mis padres, que sirven de apoyo en cualquier momento en el que se les necesita. A mis hijos, por el tiempo que les he quitado y que han tenido que compartir con esta tesis. Y sobre todo, a Santi, que ha soportado el gran peso de este trabajo, intentando siempre facilitar las cosas y mantener la cotidianidad del día a día. Ha sido mucho el sacrificio y sin ti, esto no hubiese sido posible, muchas gracias.

Y a la UCAM por su colaboración.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

- Tejada, L., **Abellán, A.**, Cayuela, J.M. & Martínez-Cachá, A. (2006). Sensorial characteristics during ripening of the Murcia al Vino goat's milk cheese. The effect of the type of coagulant used and the size of the cheese. *Journal of Sensory Studies* 21, 333-347.
- **Abellán, A.**, Tejada, L., Cayuela, J.M. & Martínez-Cachá, A. (2007). Comparación de varios métodos de determinación del valor calórico en queso (Murcia al Vino). Efecto del tamaño del queso. *Alimentaria* 382, 97-99.
- Tejada, L., **Abellán, A.**, Prados, F. & Cayuela, J.M. (2008). Compositional characteristics of Murcia al Vino goat's cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Journal of Dairy Technology* 60, 1-7.
- Tejada, L., **Abellán, A.**, Cayuela, J.M., Martínez-Cachá, A. & Fernández-Salguero, J. (2008). Proteolysis in goat's milk cheese made with calf rennet and plant coagulant. *International Dairy Journal* 18, 139-146.
- **Abellán, A.**, Tejada, L., Pérez-Garrido, A. & Cayuela J.M. Effects of cheese size on composition and proteolysis of the Murcia al Vino goat's milk cheese. *Journal of Food Quality* (en prensa).

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	17
ÍNDICE DE FIGURAS.....	23
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	31
1. INTRODUCCIÓN.....	33
1.1. QUESOS DE CABRA.....	34
1.1.1. Tecnología de la elaboración del queso.....	37
1.1.2. Coagulantes vegetales.....	40
1.1.3. Quesos de cabra con Denominación de Origen.....	45
1.1.3.1. <i>Queso Majorero</i>	45
1.1.3.2. <i>Queso de los Ibores</i>	46
1.1.3.3. <i>Queso Palmero</i>	46
1.1.3.4. <i>Quesos de Murcia</i>	47
1.1.3.4.a) Queso de Murcia, variedades fresco y curado.....	47
1.1.3.4.b) Queso de Murcia al Vino.....	48
1.1.4. Queso de cabra de Murcia al Vino	48
1.2. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL QUESO.....	53
1.2.1. pH.....	53
1.2.2. Lactosa / ácido láctico.....	54
1.2.3. Agua.....	55
1.2.4. Grasa.....	57
1.2.5. Proteína	58
1.2.6. Sal.....	60
1.2.7. Minerales.....	61
1.2.8. Valor calórico	62
1.3. BIOQUÍMICA DE LOS QUESOS DE CABRA. CAMBIOS DURANTE LA MADURACIÓN.....	64
1.3.1. Glucolisis.....	64

1.3.2. Lipolisis	66
1.3.3. Proteolisis	68
1.3.3.1. <i>Proteolisis primaria</i>	69
1.3.3.2. <i>Proteolisis secundaria</i>	71
1.4. MICROBIOLOGÍA DEL QUESO.....	76
1.4.1. Calidad microbiológica de la leche destinada a la elaboración de queso	76
1.4.2. Características microbiológicas del queso	78
1.4.2.1. <i>Bacterias aerobias mesófilas</i>	78
1.4.2.2. <i>Bacterias ácido-lácticas (BAL)</i>	79
1.4.2.3. <i>Enterococcus (Streptococcus del grupo D de Lancefield)</i>	82
1.4.2.4. <i>Lactobacillus</i>	82
1.4.2.5. <i>Coliformes</i>	83
1.4.2.6. <i>Levaduras y Mohos</i>	83
1.5. ANÁLISIS SENSORIAL.....	85
1.5.1. Aplicación del análisis sensorial en queso	86
CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	89
2. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS	91
2.1. PLANTEAMIENTOS.....	91
2.2. OBJETIVOS.....	94
CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS	97
3. MATERIAL Y MÉTODOS	99
3.1. ELABORACIÓN DEL QUESO.....	99
3.2. OBTENCIÓN DEL COAGULANTE VEGETAL LIOFILIZADO.....	102
3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	102
3.4. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO.....	103
3.4.1. Análisis físico-químico	103
3.4.2. Análisis microbiológico	104
3.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	105
3.5.1. pH	105
3.5.2. ST	105
3.5.3. Grasa	106

3.5.4. Cenizas	106
3.5.5. Proteína	106
3.5.6. Cloruro sódico	106
3.5.7. Acidez titulable	106
3.5.8. Determinación del valor calórico	106
3.5.9. Análisis de la composición mineral	107
3.5.10. Análisis de los ácidos grasos	110
3.6. EVALUACIÓN DE LA PROTEOLISIS EN EL QUESO.....	110
3.6.1. Determinación de las fracciones nitrogenadas	110
3.6.1.1. <i>Nitrógeno soluble (NS)</i>	112
3.6.1.2. <i>Nitrógeno no proteico (NNP)</i>	112
3.6.1.3. <i>Nitrógeno aminoacídico (NAA)</i>	113
3.6.1.4. <i>Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)</i>	114
3.6.1.5. <i>Cálculo del nitrógeno de las proteínas (NP), nitrógeno de las caseínas (NC), nitrógeno de los polipéptidos (Npp), y nitrógeno de los péptidos (Np)</i>	115
3.6.2. Determinación de los péptidos hidrófobos e hidrófilos	115
3.6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida	117
3.6.4. Determinación de aminoácidos libres	119
3.7. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.....	124
3.7.1. Recogida de muestras	124
3.7.2. Preparación de las diluciones decimales	124
3.7.3. Determinaciones microbiológicas	124
3.7.3.1. <i>Crecimiento en PCA</i>	124
3.7.3.2. <i>PetrifilmTM para Coliformes totales</i>	125
3.7.3.3. <i>Crecimiento en agar KF</i>	125
3.7.3.4. <i>Crecimiento en agar Rogosa</i>	125
3.7.3.5. <i>Crecimiento en agar M₁₇</i>	125
3.7.3.6. <i>Crecimiento en agar MSE</i>	126
3.7.3.7. <i>PetrifilmTM para Levaduras</i>	126
3.8. EVALUACIÓN DE LOS ATRIBUTOS SENSORIALES.....	126
3.8.1. Análisis descriptivo	126
3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	129

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	133
4.1. CARACTERIZACIÓN DEL QUESO DE MURCIA AL VINO DURANTE SU MADURACIÓN. EFECTO DEL TIPO DE COAGULANTE	133
4.1.1. Composición y características físico-químicas	133
4.1.1.1. <i>Composición general</i>	133
4.1.1.1.a) pH y Acidez Titulable (AT)	133
4.1.1.1.b) Sólidos totales (ST)	138
4.1.1.1.c) Grasa	140
4.1.1.1.d) Proteína	142
4.1.1.1.e) Cenizas	143
4.1.1.1.f) NaCl	145
4.1.1.1.g) Análisis multivariante	146
Análisis discriminante (AD)	146
4.1.1.2. <i>Composición mineral</i>	150
4.1.1.2.a) Macrominerales	150
4.1.1.2.b) Microminerales	157
4.1.1.2.c) Análisis multivariante	162
Análisis discriminante (AD)	162
4.1.1.3. <i>Ácidos grasos esterificados</i>	165
4.1.1.4. <i>Valor calórico</i>	169
4.1.2. Proteolisis	173
4.1.2.1. <i>Proteolisis primaria, cambios en la fracción insoluble a pH 4,6, PAGE de caseínas</i>	173
4.1.2.1.a) Gamma-caseínas (γ -CN)	175
4.1.2.1.b) Beta-caseínas (β -CN)	179
4.1.2.1.c) Alfa-caseínas (α_s -CN)	182
4.1.2.1.d) Pre-alfa-caseínas (pre- α_s -CN)	185
4.1.2.1.e) Análisis multivariante	188
Análisis de componentes principales (ACP)	188
4.1.2.2. <i>Proteolisis secundaria, cambios en los componentes del nitrógeno</i>	189
4.1.2.2.a) Nitrógeno soluble en agua a pH 4,6 (NS)	190
4.1.2.2.b) Nitrógeno no proteico (NNP)	193
4.1.2.2.c) Nitrógeno aminoacídico (NAA)	196

4.1.2.2.d) Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃).....	199
4.1.2.2.e) Fracciones nitrogenadas calculadas.....	201
4.1.2.2.f) Análisis multivariante.....	205
Análisis discriminante (AD).....	205
Análisis de componentes principales (ACP).....	209
4.1.2.3. <i>Cambios en los péptidos hidrófobos e hidrófilos</i>	211
4.1.2.3.a) Análisis multivariante.....	219
Análisis de componentes principales (ACP).....	219
4.1.2.4. <i>Cambios en el contenido en aminoácidos libres</i>	220
4.1.2.4.a) Análisis multivariante.....	230
Análisis discriminante (AD).....	230
Análisis de componentes principales (ACP).....	233
4.1.3. Microbiología	236
4.1.3.1. <i>Características microbiológicas de la leche utilizada en la fabricación del queso de Murcia al Vino</i>	236
4.1.3.2. <i>Características microbiológicas del queso de Murcia al Vino durante la maduración</i>	237
4.1.3.2.a) Recuentos en medios de cultivo PCA.....	238
4.1.3.2.b) Recuentos en medios de cultivo M ₁₇	240
4.1.3.2.c) Recuentos en medios de cultivo KF.....	243
4.1.3.2.d) Recuentos en medios de cultivo RA.....	244
4.1.4. Sensorial	247
4.1.4.1. <i>Percepciones olfativas</i>	252
4.1.4.2. <i>Percepciones visuales: apariencia de la pasta</i>	256
4.1.4.3. <i>Percepciones de textura</i>	259
4.1.4.4. <i>Percepciones gustativas</i>	262
4.1.4.5. <i>Análisis multivariante</i>	266
4.1.4.5.a) Análisis componentes principales.....	266
4.1.4.5.b) Análisis discriminante.....	268
4.2. EFECTO DEL TAMAÑO DEL QUESO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS COMPOSICIONALES	272
4.2.1. Composición	272
4.2.1.1. <i>Composición general</i>	272
4.2.1.2. <i>Valor calórico</i>	276

4.2.1.3. <i>Análisis multivariante</i>	278
4.2.1.3.a) Análisis componentes principales (ACP).....	278
4.2.1.3.b) Análisis discriminante (AD).....	280
4.2.2. Proteolisis	281
4.2.2.1. <i>Proteolisis primaria, cambios en la fracción insoluble a pH 4.6, PAGE de caseínas</i>	281
4.2.2.2. <i>Proteolisis secundaria, cambios en los componentes del nitrógeno</i>	283
4.2.2.2.a) Análisis multivariante.....	285
Análisis de componentes principales (ACP).....	285
4.2.2.3. <i>Cambios en los péptidos hidrófobos e hidrófilos</i>	286
4.2.2.4. <i>Cambios en el contenido en aminoácidos libres</i>	288
4.2.2.4.a) Análisis multivariante.....	294
Análisis discriminante (AD).....	294
Análisis de componentes principales (ACP).....	297
4.2.3. Microbiología	299
4.2.4. Sensorial	303
4.2.2.4. <i>Análisis multivariante</i>	307
4.2.4.1.a) Análisis de componentes principales (ACP).....	307
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	311
5. CONCLUSIONES	313
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA	317
6. BIBLIOGRAFÍA	319

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evolución de la producción láctea en España entre 1990 y 2008 de las principales especies productoras expresada en millones de litros.....	34
Tabla 2. Evolución de la producción de leche en (1000 Tm) y queso (en 1000 Tm) en España desde el año 2002 al 2005 para las principales especies productoras.....	35
Tabla 3. Condiciones instrumentales para espectrofotometría de absorción atómica.....	108
Tabla 4. Validación de la determinación simultánea de aminoácidos en una curva de calibrado.....	121
Tabla 5. Cambios en las características físico-químicas y composicionales de las muestras de queso de Murcia al Vino (media \pm SD) obtenidas con coagulante vegetal en polvo (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración.	134
Tabla 6. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	146
Tabla 7. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis.....	147
Tabla 8. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación	147
Tabla 9. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Quesos elaborados con CV correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.....	148
Tabla 10. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tipo de coagulante.....	149
Tabla 11. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.....	149
Tabla 12. Valores medios y desviaciones estándar de macrominerales (mg/100g ST) y microminerales (μ g/ 100g ST) en las muestras de Queso de Murcia al Vino obtenidas con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración.....	151
Tabla 13. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	162
Tabla 14. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis.....	162

Tabla 15. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación	163
Tabla 16. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	164
Tabla 17. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.....	164
Tabla 18. Evolución de los ácidos grasos esterificados (g/100g ácidos grasos) de muestras de queso de Murcia al Vino obtenidas con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración.	166
Tabla 19. Concentraciones relativas de los ácidos grasos (% de los valores totales) de los quesos de Murcia al Vino obtenidos con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración.....	167
Tabla 20. Energía total (ET), energía metabolizable (EM) y de energía total digerible (ETD) (valores de Kcal/100g queso) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV	169
Tabla 21. Cambios en las fracciones caseínicas (valores medios y desviaciones standard), expresadas como % de densidad óptica total, de muestras de queso de Murcia al Vino obtenidos con CA y CV a lo largo de la maduración.....	174
Tabla 22. Análisis de componentes principales de datos a lo largo de la maduración del porcentaje de las fracciones de caseínas de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con CV.....	188
Tabla 23. Cambios en las fracciones nitrogenadas de las muestras de quesos al vino de Murcia elaborados con CV y CA lo largo de la maduración, expresados como g/100 g de NT.....	190
Tabla 24. Evolución de las fracciones nitrogenadas calculadas de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA lo largo de la maduración, expresados como g/100 g de NT	201
Tabla 25. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	206
Tabla 26. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis.....	206
Tabla 27. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación	207
Tabla 28. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	208
Tabla 29. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	208
Tabla 30. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tipo de coagulante.....	209

Tabla 31. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación	209
Tabla 32. Análisis de componentes principales de datos de las fracciones nitrogenadas de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y CV a lo largo de la maduración.....	210
Tabla 33. Cambios en los péptidos hidrófobos (HO) e hidrófilos (HI) en fracciones de NS de queso de Murcia al Vino, elaborados con CV y CA. (Resultados expresados como uac/g ST) a lo largo de la maduración.....	214
Tabla 34. Análisis de componentes principales de péptidos HO e HI de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con CV a lo largo de la maduración.....	219
Tabla 35. Evolución de los aminoácidos libres totales del queso de Murcia al Vino elaborado con coagulante animal y vegetal a lo largo de la maduración	223
Tabla 36. Niveles de significación ANOVA y coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de aminoácidos libres, tiempo de maduración y tipo de coagulante	227
Tabla 37. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	230
Tabla 38. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis.....	231
Tabla 39. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.....	231
Tabla 40. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.	233
Tabla 41. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.....	233
Tabla 42. Análisis de componentes principales del contenido de los aminoácidos de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y CV a lo largo de la maduración.....	234
Tabla 43. Recuento bacterianos (log ufc/ml) en leche cruda y pasteurizada utilizada en la elaboración de los quesos de Murcia al Vino.....	236
Tabla 44. Recuento de bacterias (ufc/g queso), en los distintos medios de cultivo, presentes en el queso de Murcia al vino, elaborado con CA y CV, a lo largo de su maduración.....	238
Tabla 45. Atributos utilizados en el análisis sensorial de las muestras de quesos.....	247
Tabla 46. Características sensoriales del queso de Murcia al Vino elaborado con CV y CA durante su maduración. Medias y desviaciones estándar.....	249
Tabla 47. Análisis de componentes principales de los atributos sensoriales de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y CV a lo largo de la maduración.....	267

Tabla 49. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis.....	269
Tabla 50. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación	270
Tabla 51. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	271
Tabla 52. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones	271
Tabla 53. Características composicionales del queso de Murcia al Vino (valores medios y desviaciones estándar) de tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP) a lo largo de la maduración.	273
Tabla 54. Kilocalorías de Energía total (ET), Energía metabolizable (EM) y de energía total determinada con la bomba calorimétrica (ETB)/100g queso de los quesos de tamaño grande y pequeño.....	277
Tabla 55. Análisis de componentes principales de datos de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con dos tamaños, pequeño y grande, a lo largo de la maduración.....	279
Tabla 56. Cambios a lo largo de la maduración de las fracciones de caseína de quesos de Murcia al Vino elaborados con distinto tamaño. Valores expresados como porcentaje de densidad óptica total.....	282
Tabla 57. Efecto del tamaño del queso sobre las fracciones nitrogenadas y los componentes nitrogenados calculados del queso de Murcia al Vino a lo largo de la maduración (valores medios y desviaciones estándar).....	284
Tabla 58. Análisis de componentes principales de datos de las fracciones nitrogenadas de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con dos tamaños, pequeño y grande.....	285
Tabla 59. Evolución de los péptidos hidrófobos (HO) e hidrófilos (HI)(valores medios y desviaciones estándar) durante la maduración de quesos de Murcia al Vino de tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP).....	287
Tabla 60. Evolución de los aminoácidos libres totales del queso de Murcia al Vino elaborado con coagulante animal y con dos tamaños.....	291
Tabla 61. Niveles de significación ANOVA y coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de aminoácidos libres, el tiempo de maduración y el tamaño del queso.....	293
Tabla 62. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración.....	295
Tabla 63. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis.....	295

Tabla 64. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación.....	295
Tabla 65. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tamaño del queso.....	297
Tabla 66. Análisis de componentes principales de datos del contenido de los aminoácidos de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con CV a lo largo de la maduración.....	298
Tabla 67. Recuento de bacterias ufc/g queso presentes en el queso de Murcia al Vino, con dos tamaños (CAP) y (CAG), a lo largo de su maduración. Valores medios y desviaciones estándar.....	300
Tabla 68. Puntuaciones medias y desviaciones estándar obtenidas para los atributos sensoriales de quesos con tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP) durante la maduración.....	303
Tabla 69. Análisis de componentes principales de datos a lo largo de la maduración de los atributos sensoriales de muestras de quesos de Murcia al Vino CAG y CAP.....	308

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de las producciones de leche y queso en España, para las principales especies productoras.....	35
Figura 2. Distribución geográfica de los quesos de cabra elaborados en España.....	36
Figura 3. Esquema de elaboración de las distintas partidas de queso.....	99
Figura 4. Diagrama de elaboración del Queso de Murcia al Vino.....	100
Figura 5. Curvas de calibrado de los microminerales.....	109
Figura 6. Curvas de calibrado de los macrominerales.....	109
Figura 7. Esquema de los métodos utilizados para determinar las fracciones nitrogenadas de los quesos a lo largo de la maduración.....	111
Figura 8. Curva patrón para la determinación de leucina.....	114
Figura 9. Cromatograma RP-HPLC de los patrones para la determinación simultánea de los aminoácidos necesarios para la elaboración de curvas de calibrado.....	123
Figura 10. Modelo de ficha de evaluación sensorial.....	128
Figura 11. Evolución del pH a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	135
Figura 12. Evolución de la AT a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	135
Figura 13. Evolución de los sólidos totales a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	139
Figura 14. Evolución de la grasa a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	141
Figura 15. Evolución de la proteína a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	143
Figura 16. Comparación de la evolución del contenido de cenizas y NaCl a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	144
Figura 17. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.....	148

Figura 18. Evolución del contenido en Ca (en mg/100 g ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	152
Figura 19. Evolución del contenido en P (en mg/100g ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	152
Figura 20. Evolución de la relación Ca/P a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	154
Figura 21. Evolución del contenido en Na (en mg/100g ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal y cuajo animal.....	155
Figura 22. Evolución del contenido en K (en mg/100g ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	157
Figura 23. Evolución del contenido de Cu (en $\mu\text{g}/100\text{g}$ ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	158
Figura 24. Evolución del contenido de Mn (en $\mu\text{g}/100\text{g}$ ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	158
Figura 25. Evolución del contenido de Fe (en $\mu\text{g}/100\text{g}$ ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	159
Figura 26. Evolución del contenido en Zn (en $\mu\text{g}/100\text{g}$ ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA).....	159
Figura 27. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.....	163
Figura 28. Porcentaje de ácidos grasos esterificados en el queso de Murcia al Vino.....	168
Figura 29. Evolución del contenido calórico (en kilocalorías/100g queso) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con cuajo animal (CA).....	170
Figura 30. Evolución del contenido calórico (en kilocalorías/100g queso) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV).....	170
Figura 31. Evolución del contenido calórico (en kilocalorías ET/100g queso) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con CA y con CV.....	172
Figura 32. Urea-PAGE de las fracciones insolubles de extractos de quesos de Murcia al Vino obtenidos con CV y CA a lo largo de la maduración.....	175

Figura 33. Evolución de las γ -caseínas (γ -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.....	177
Figura 34. Evolución de las γ_2 -caseínas (γ_2 -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.....	177
Figura 35. Evolución de las γ_1 -caseínas (γ_1 -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.....	178
Figura 36. Evolución de las γ_3 -caseínas (γ_3 -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.....	178
Figura 37. Evolución de las β -caseínas (β -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.....	180
Figura 38. Evolución de las β -CN (f_{1-192}) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.....	180
Figura 39. Evolución de las α -caseínas (α -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.	184
Figura 40. Evolución del ratio α -CN / β -CN del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.....	184
Figura 41. Evolución de las pre- α -caseínas (pre- α -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración.	186
Figura 42. Representación en el plano definido por los 2 componentes principales, extraídos con los valores de las fracciones caseínicas, de los quesos elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración.....	189
Figura 43. Evolución del NS de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración.....	191
Figura 44. Evolución del NNP (medias y desviaciones estándar) de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración.....	194
Figura 45. Evolución del NAA (medias y desviaciones estándar) de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración..	197
Figura 46. Evolución del N-NH ₃ (medias y desviaciones estándar) de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración..	200
Figura 47. Evolución del Nitrógeno de las Proteínas (NP) expresado en porcentaje de NT de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración.....	203
Figura 48. Evolución del Nitrógeno de las Caseínas (NC) expresado en porcentaje de NT de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración.....	203
Figura 49. Evolución del Nitrógeno de los Polipéptidos (Npp) expresado en porcentaje de NT de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración.....	204

Figura 50. Evolución del Nitrógeno de los péptidos (Np) expresado en porcentaje de NT de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración.....	204
Figura 51. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.....	207
Figura 52. Representación en el plano definido por los 2 componentes principales extraídos con los valores de las fracciones nitrogenadas, de los quesos elaborados con CV y CA, a lo largo de la maduración.....	211
Figura 53. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción NS de las muestras de quesos elaborados con CA a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. Detección a 214 nm.....	212
Figura 54. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción NS de las muestras de quesos elaborados con CV a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. Detección a 214 nm.....	213
Figura 55. Evolución de los péptidos HO de muestras de queso de Murcia al Vino elaboradas con CA y CV a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. (Datos expresados como uac/gST).....	216
Figura 56. Evolución de los péptidos HI de muestras de queso de Murcia al Vino elaboradas con CA y CV a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. (Datos expresados como uac/gST).....	216
Figura 57. Evolución de la relación HO/HI de queso de Murcia al Vino elaboradas con CA y CV en los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.....	217
Figura 58. Representación en el plano definido por los 2 componentes principales extraídos con los valores de los péptidos HO e HI de los quesos elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración.....	220
Figura 59.a) Cromatograma RP-HPLC de los aminoácidos CA.....	221
Figura 59.b) Cromatograma RP-HPLC de los aminoácidos CV.....	221
Figura 60. Evolución de los aminoácidos libres totales (mg AAT/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA.....	222
Figura 61.a) Evolución de los aminoácidos libres individuales (mg AAL/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CA.....	226
Figura 61.b) Evolución de los aminoácidos libres individuales (mg TFAA/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CV.....	226
Figura 62. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.....	232
Figura 63. Representación en el plano definido por los 2 componentes principales extraídos con los valores del contenido de los aminoácidos de los quesos elaborados con CV y CA, a lo largo de la maduración.....	235

Figura 64. Evolución de los recuentos de RAMT en PCA, a lo largo de la maduración	239
Figura 65. Evolución de los recuentos de <i>Lactococcus en M17</i> , a lo largo de la maduración.....	241
Figura 66. Evolución de los recuentos de <i>Streptococcus</i> en KF, a lo largo de la maduración.....	243
Figura 67. Evolución de los recuentos de <i>Lactobacillus</i> , en RA, a lo largo de la maduración	244
Figura 68. Perfil sensorial de los quesos de Murcia al Vino elaborado con CA a los 30, 45 y 60 días de maduración.....	250
Figura 69. Perfil sensorial de los quesos de Murcia al Vino elaborado con CV a los 30, 45 y 60 días de maduración.....	250
Figura 70. Perfil sensorial de los quesos elaborados con CA y CV a los 30 días de maduración.....	251
Figura 71. Perfil sensorial de los quesos elaborados con CA y CV a los 45 días de maduración.....	251
Figura 72. Perfil sensorial de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración.....	252
Figura 73. Atributos sensoriales del olor para quesos CA a lo largo de la maduración.....	253
Figura 74. Atributos sensoriales olfativos de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración	255
Figura 75. Atributos de apariencia para quesos CA a lo largo de la maduración	257
Figura 76. Atributos sensoriales de apariencia interna de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración	258
Figura 77. Atributos de textura para quesos CA a lo largo de la maduración	259
Figura 78. Atributos sensoriales de textura de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración.....	261
Figura 79. Atributos de sabor para quesos CA a lo largo de la maduración	262
Figura 80. Atributos sensoriales de sabor de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración	264
Figura 81. Representación de los quesos elaborados con CV y CA en el plano definido por los 2 CP extraídos de los valores de los atributos sensoriales a lo largo de la maduración.....	268
Figura 82. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.....	270

Figura 83. Evolución del ST lo largo de la maduración de los quesos con tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP).....	274
Figura 84. Evolución del NaCl en los quesos grandes (CAG) y pequeños (CAP a lo largo de la maduración.....	275
Figura 85. Evolución del contenido calórico (en kilocalorías/100g queso) a lo largo de la maduración de los quesos de tamaño grande (CAG).....	278
Figura 86. Análisis de componentes principales. Representación en el plano de las puntuaciones obtenidas por regresión para los distintos tipos de queso.....	280
Figura 87. Electroforesis en gel de Urea-poliacrilamida (urea-PAGE) del extracto insoluble en agua de quesos de Murcia al Vino con diferentes tamaños.....	281
Figura 88. Representación en un plano definido por los dos componentes principales de las fracciones nitrogenadas de los quesos de Murcia al Vino con dos tamaños.....	286
Figura 89. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción NS de las muestras de quesos de Murcia al Vino de tamaño grande (CAG) a los 2, 30, 45 y 60 días de maduración. Detección a 214 nm.....	288
Figura 90.a) Cromatograma RP-HPLC de los aminoácidos libres del queso de Murcia al Vino de tamaño pequeño (CAP).....	289
Figura 90.b) Cromatograma RP-HPLC de los aminoácidos libres del queso de Murcia al Vino de tamaño grande (CAG).....	289
Figura 91. Evolución de los aminoácidos totales (mg AAT/100g ST) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino con dos tamaños (CAG) y (CAP).....	290
Figura 92.a) Evolución de los aminoácidos libres individuales (mg AAL/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino con tamaño grande (CAG).....	292
Figura 92.b) Evolución de los aminoácidos libres individuales (mg AAL/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino con tamaño pequeño (CAP).....	292
Figura 93. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2.....	296
Figura 94. Representación en un plano definido por los dos componentes principales de los aa de los quesos de Murcia al Vino con dos tamaños.....	299
Figura 95. Evolución de los recuentos de <i>Lactococcus</i> a lo largo de la maduración...	302
Figura 96. Evolución de los recuentos de <i>Lactobacillus</i> a lo largo de la maduración.	302
Figura 97. Perfil sensorial del queso de Murcia al Vino de tamaño grande.....	304

Figura 98. Perfiles sensoriales de los quesos CAP y CAG a los 30 días de maduración.....	304
Figura 99. Perfiles sensoriales de los quesos CAP y CAG a los 45 días de maduración.....	305
Figura 100. Perfiles sensoriales de los quesos CAP y CAG a los 60 días de maduración.....	305
Figura 101. Representación gráfica del análisis de componentes principales de las muestras de quesos en función de los datos de las características sensoriales.....	309

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

“Actualmente, la quesería sigue siendo una mezcla de “arte y ciencia” en la que, aunque mucho queso se produce en industrias controladas por ordenador, basándose en la estricta normalización para manipular los grandes volúmenes de leche utilizada, la producción de queso de máxima calidad, aún yace en la innata destreza del maestro quesero” (Robinson y Wilbey, 2002).

El arte de la quesería es casi tan antiguo como la civilización. Se estima que este producto tiene su origen fortuito en la costumbre mediterránea de transportar la leche en odres hechos con las pieles de animales o con sus estómagos y vejigas. Más tarde, a medida que fueron pasando los siglos, la elaboración del queso se fue modificando y refinando, manteniéndose como una actividad artesanal hasta que a principios del siglo XX se empezaron a aplicar las bases científicas permitiendo su fabricación a gran escala.

Hoy en día existe una gran diversidad de variedades de queso, que a pesar de que comparten una tecnología básica común, experimentan pequeños cambios en sus condiciones de elaboración dando lugar a importantes diferencias en el producto final (Varnam y Sutherlan, 1995).

Consecuentemente, el objetivo del fabricante de queso no debe centrarse solamente en mantener y mejorar la calidad de las variedades existentes y diseñar nuevos métodos de manufactura, sino también en adquirir nuevos conocimientos básicos, al objeto de expresar su creatividad y desarrollar tecnológicamente nuevas variedades que satisfagan los hábitos alimentarios cambiantes (Scott, 2002).

1.1. QUESOS DE CABRA

La producción de leche de cabra está limitada por los escasos medios tecnológicos disponibles en muchos países. Esto dificulta su industrialización a gran nivel, por la reducida gama de productos elaborados con este tipo de leche (Juárez *et al.*, 1991).

El 20,76% de la producción mundial de leche de cabra en 2005 se produjo en la zona occidental de Europa, siendo España el tercer país productor (con 465.000 Tm) por detrás de Francia (587.000 Tm) y Grecia (495.000 Tm). En cuanto a la evolución de la producción mundial de leche de cabra se observa que en los últimos 30 años ha experimentado una evolución ascendente, siendo la producción actual casi el doble que hace 30 años.

Tabla 1. Evolución de la producción láctea en España entre 1990 y 2008 de las principales especies productoras expresada en millones de litros

	Año				
	1990	1995	2000	2005	2008
Leche vaca	5650	6017	6107	6370	6157
Leche oveja	320	226	392	408	427
Leche cabra	473	316	439	472	490
TOTAL	6442	6559	6937	7250	7074

MARM, 2009

En España la producción de leche de cabra se encuentra en segundo lugar, por detrás de la leche de vaca, y ha experimentado un aumento de su producción en los últimos años, contrariamente al descenso sufrido por la primera (**Tabla 1**). Del total de queso producido en España en el año 2004 sólo el 4,9% correspondió a queso de cabra. El escaso desarrollo en la fabricación de este tipo de queso se debe a factores como la estacionalidad en la producción de leche, la desconfianza sanitaria de muchos consumidores hacia los productos elaborados con leche de cabra así como, a la utilización de esta leche en la fabricación de los denominados quesos de mezcla (Pino, 2007). Sin embargo este hecho está cambiando, tal y como se puede observar en la **Tabla 2** y **Figura 1**. La producción de queso de cabra ya supera a la producida con leche de oveja, siendo sin embargo similares las

producciones de ambos tipos de leche. El destino de la leche de cabra en España es casi exclusivamente la industria transformadora para la fabricación de queso, aunque sólo unas pocas variedades de éstos presentan niveles de producción y comercialización apreciables, suponiendo alrededor del 3% del total de quesos consumidos (Franco *et al.*, 2001).

Tabla 2. Evolución de la producción de leche en (1000 Tm) y queso (en 1000 Tm) en España desde el año 2002 al 2005 para las principales especies productoras

	Año							
	2002		2003		2004		2005	
	Leche	Queso	Leche	Queso	Leche	Queso	Leche	Queso
Vaca	5967.0	125.6	5914.9	134.4	5921.5	130.0	6361.8	83.9
Cabra	375.9	15.5	369.0	13.1	378.0	14.9	468.6	41.8
Oveja	348.6	35.4	351.3	36.8	357.3	37.3	409.2	19.6
TOTAL	6691.5	289.1	6635.2	298.4	6656.8	303.7	7239.6	145.3

MARM, 2009

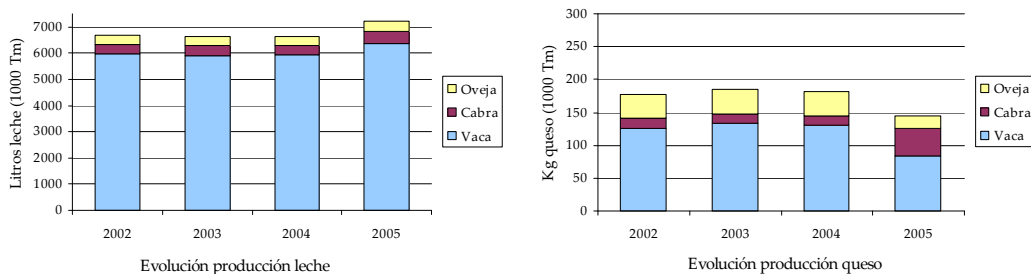


Figura 1. Evolución de las producciones de leche y queso en España para las principales especies productoras

España, además de producir en sus queserías quesos con tecnologías de elaboración adaptadas de quesos extranjeros de gran difusión, se precia de poseer una amplia variedad de quesos tradicionales distribuidos a lo largo de su geografía (Carballo *et al.*, 1994).

En el Catálogo de Quesos del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación de 1990, se recogen las casi cien variedades de quesos existentes en España, de las cuales 27 se elaboran con leche pura de cabra.

De todos ellos, sólo unos pocos poseen Denominación de Origen o Denominación de Calidad, mientras que el resto pertenecen al grupo de los llamados quesos artesanos o tradicionales, con tecnología poco conocida, y que se tratan de producciones artesanas (Yubero, 1985).

Últimamente se están desarrollando tecnologías para la obtención de quesos curados o semicurados. Es el caso del queso de Murcia al Vino, que es un tipo de queso que no proviene de una elaboración tradicional sino que se empieza a elaborar hace aproximadamente dos décadas.

En la **Figura 2**, se muestran las variedades de quesos de cabra que se elaboran en España, diferenciando aquéllos que poseen Denominación de Origen, Denominación de Calidad o que son quesos tradicionales.

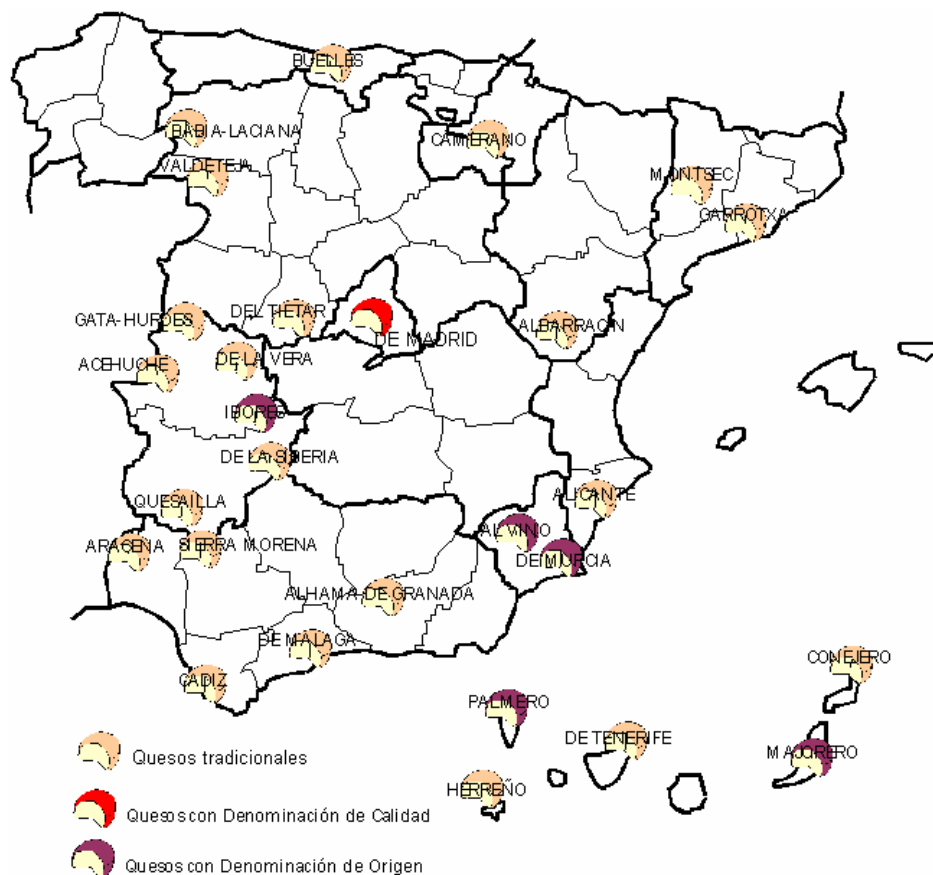


Figura 2. Distribución geográfica de los quesos de cabra elaborados en España

La industrialización y el desarrollo de la tecnología quesera favorecen que las producciones de queso se extiendan, manteniendo, al mismo tiempo, los criterios de calidad y la personalidad de cada variedad (Carretero *et al.*, 1992).

Otro de los motivos por el cual se elaboran pocos quesos de leche de cabra de manera industrial puede ser la falta de publicaciones con información técnica sobre ellos, en contraste con la abundancia de datos sobre aspectos tecnológicos y la bioquímica de la maduración de los quesos de leche de vaca y oveja (Fresno *et al.*, 1997).

Un mejor conocimiento de las características bioquímicas y de la microbiología de los quesos podría favorecer la mejora de la tecnología de elaboración, y ayudar a obtener una calidad constante del producto capaz de ser introducido satisfactoriamente en los mercados nacionales e internacionales (Fresno *et al.*, 1997).

1.1.1. Tecnología de la elaboración del queso

Desde el punto de vista tecnológico, la transformación de la leche en queso, tradicionalmente se puede dividir en varias etapas comunes, si bien, según la variedad de queso, estas etapas se pueden ver sometidas a pequeñas modificaciones en intensidad, duración, número y orden.

Las fases de elaboración del queso se pueden resumir en las siguientes etapas:

1. Tratamientos previos. Son el conjunto de operaciones a las que se somete la leche que se va a utilizar en la fabricación del queso. Se realizan antes de la elaboración de queso, y básicamente están destinadas a la limpieza (tamizado, filtrado y clarificación por centrifugación), normalización o estandarización (desnatado, adición de caseína en polvo, concentración y ultrafiltración), conservación e higienización de la leche (refrigeración, termización, pasteurización, bactofugado, microfiltración y tratamiento por altas presiones). En esta fase es también importante la adición de cultivos iniciadores, sales cálcicas (Cl_2Ca) y otros aditivos, que intervendrán de manera decisiva en la elaboración y posterior maduración del queso.

El cultivo iniciador se añade a la leche previamente calentada antes de añadir el coagulante, de tal manera que produzca una acidificación de la leche. La intensidad de esta acidificación determina la naturaleza y evolución de la cuajada, así como su grado de mineralización.

Por tanto, la acidificación de la leche afecta: a la actividad coagulante del cuajo, al grado de retención del coagulante en la cuajada, a la consistencia de la cuajada y grado de sinéresis de la misma, al grado de solubilización del fosfato cálcico en la cuajada y a la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables (bacterias lácticas no pertenecientes al cultivo iniciador, patógenas o productoras de gas).

2. Coagulación. Se trata de la desestabilización de la fase micelar por adición de enzimas y/o ácidos que determinan la gelificación de la leche, atrapando en su interior el agua, los glóbulos grasos y las bacterias.

La acidificación (coagulación láctica) o la acción del coagulante (coagulación enzimática) rompen el equilibrio coloidal en el que se encuentran las partículas de fosfocaseinato cálcico de la leche. Este último precipita y da lugar a la formación de un gel tridimensional llamado cuajada.

A pesar de que la coagulación enzimática de la leche es la más empleada en la elaboración de la mayoría de los tipos de queso, en realidad se produce una coagulación mixta, con predominancia de un tipo u otro de coagulación dependiendo de la variedad de la que se trate.

Existen multitud de productos enzimáticos que pueden utilizarse para coagular la leche. De la correcta elección del coagulante dependerán las características de la cuajada, así como el rendimiento quesero y la calidad sensorial final del mismo.

Más adelante se describen de manera mas detallada los tipos de coagulantes empleados en la elaboración de queso.

3. Desuerado. Se corresponde con la sinéresis y la separación de las fases sólida y líquida con obtención de la cuajada. Permite la regularización de la humedad y de la acidez de la cuajada gracias a la pérdida de minerales y de lactosa que se produce. Se inicia con el corte del gel, tras el cual, el proceso se regula mediante agitación y/o tratamiento térmico adecuados.

El corte de la cuajada se realiza con liras o cortadoras de múltiples cuchillas, y debe hacerse lentamente para no deshacer el coágulo, obteniendo granos regulares que desueren fácilmente. La masa obtenida se agita y recalienta provocando la contracción de la matriz proteica y favoreciendo la eliminación de suero. Además, al acelerar el metabolismo de las bacterias lácticas retenidas en la cuajada, aumenta la producción de ácido láctico y disminuye el pH, lo que facilita la retracción de partículas y por tanto la nueva expulsión de suero.

4. Moldeado. Se produce el llenado de los moldes con la cuajada obtenida tras la separación de la mayor parte del suero. Los moldes son de PVC de fácil limpieza y desinfección que pueden ser microperforados o lisos, en cuyo caso necesita colocar una gasa como revestimiento, de manera que se facilita el desmoldado posterior de las piezas.

5. Prensado. La cuajada, en el interior de los moldes, es sometida a presión por gravedad (autoprensado) o a presión externa, que proporciona la forma definitiva al queso, permite un desuerado complementario y facilita la estabilización del pH previamente a la maduración. Este prensado suele repetirse varias veces, volteando los quesos para evitar que queden las marcas de los paños.

6. Salado. Es una de las etapas más importantes de la fabricación del queso. Consiste en adicionar NaCl a la cuajada, a fin de completar el desuerado, contribuir a la formación de la corteza, disminuir la actividad de agua, impidiendo el desarrollo de microorganismos indeseables y potenciar el sabor y aroma propio del queso, enmascarando sabores extraños.

Hay diferentes métodos de realizar el salado de los quesos (en seco, en masa, por impregnación a vacío) pero es habitual que se realice mediante inmersión en salmuera. Por diferencia de concentraciones, la sal difundirá en la pasta, provocando una deshidratación de la cuajada hacia la salmuera.

7. Maduración. Es un proceso de transformación de la cuajada mediante oreo en condiciones controladas de humedad y temperatura. Estas transformaciones bioquímicas de la cuajada (glicólisis, proteólisis y lipólisis) determinan las características propias de cada variedad de queso; y que van a estar condicionadas por factores como: composición química de la cuajada, tipo y cantidad del coagulante utilizado, de los microorganismos presentes en ella, y de

las condiciones de temperatura, presión y humedad relativa de las cámaras de maduración.

1.1.2. Coagulantes vegetales

En la fabricación de cualquier variedad de queso siempre se hace necesaria la agrupación de las caseínas presentes en la leche fresca. Esta coagulación se puede conseguir de diferentes maneras, bien por una acidificación de la misma, bien por adición de agentes específicos como el cuajo o diferentes coagulantes vegetales (ramas de higuera, flor del cardo, azafrán silvestre, etc,...).

La coagulación tradicional de la leche con el cuajo, se produce en dos etapas (Dalglish, 1992). La primera es la fase enzimática, durante la cual las enzimas proteolíticas contenidas en el cuajo atacan a la κ -caseína. En la segunda fase, se produce la coagulación de las micelas que han sido desestabilizadas por el ataque enzimático anterior.

Las diferentes caseínas de la leche, no están homogéneamente distribuidas en la partícula; en concreto, la κ -caseína está localizada principalmente en la superficie de la micela. Esta κ -caseína consta de dos regiones: una hidrofóbica conocida como para- κ -caseína (residuos de aminoácidos del 1-105) y una hidrofílica, el caseín-macropéptido (residuos del 106-169). En su posición natural sobre la superficie de la micela, la κ -caseína se une al resto de la misma por la parte hidrofóbica, quedando el caseín-macropéptido en superficie, interactuando con el solvente. Las enzimas coagulantes de la leche cortan la κ -caseína en la unión entre la para- κ -caseína y el caseín-macropéptido, es decir entre el residuo Phe₁₀₅ y Met₁₀₆. Cuando esto ocurre, el macropéptido difunde dentro del suero, disminuye su actividad estabilizante y cuando ha sido hidrolizada una cantidad suficiente de κ -caseína las micelas coagulan, debido a su carácter hidrofóbico.

La renina o cuajo, que son un conjunto de endopeptidasas que integran los fermentos gástricos de los mamíferos lactantes, ha sido tradicionalmente usada para producir la coagulación de la leche, al contener quimosina, que es la responsable de hidrolizar específicamente el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína bovina.

Aunque existen diferencias entre las quimosinas de diferentes especies, éstas se caracterizan por ser peptidasas gástricas neonatales con débil actividad proteolítica y alta actividad coagulante de la leche (Foltmann y Szecsi, 1998). Debido a la escasez y al alto costo de las peptidasas gástricas fetales o neonatales de mamíferos, se ha intensificado en los últimos años la búsqueda de nuevos coagulantes de la leche.

Varias peptidasas de plantas son capaces de coagular la leche, aunque la mayoría son inapropiadas para la producción de quesos debido a su alta actividad proteolítica, que produce la degradación del coágulo. La falta de especificidad produce por una parte, proteolisis durante la fabricación y por tanto, una pérdida de rendimiento quesero; pero también durante la maduración, ocasiona proteólisis excesivas o atípicas que dan origen a problemas de textura o de flavor.

Muchas son las enzimas vegetales que han sido investigadas. Gupta y Eskin (1977) estudiaron la actividad coagulante de la leche de extractos parcialmente purificados de *Benincasa cerifera*. Yamaguchi *et al.* (1982) detectaron alta actividad proteolítica en jengibre, espárrago y en frutos tales como higo, kiwi y ananá. Se han estudiado las peptidasas presentes en hojas de *Calotropis procera*, Aword y Muller (1987), en semillas de *Oryza sativa*, (Asakura *et al.*, 1997), en tallos de *Dieffenbachia maculata* (Padmanabhan *et al.*, 1993), en semillas, hojas y flores de *Onopordum turcicum* (Tamer, 1993) y en flores de *Centaurea calcitrapa* (Tavaria *et al.*, 1997), pero sólo unas pocas están siendo utilizadas en la elaboración de quesos, debido a que las diferencias en la estabilidad y en el pH óptimo de las peptidasas utilizadas pueden hacer necesario modificar el proceso de elaboración.

El coagulante vegetal crudo, obtenido fundamentalmente a partir de flores de cardos de las especies *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*, se ha utilizado con gran éxito como coagulante de la leche en la elaboración de algunas variedades de quesos de oveja españolas, como el queso de los Pedroches (Fernández-Salguero y Sanjuán, 1999; Tejada *et al.*, 2007), el queso de La Serena (Fernández del Pozo *et al.*, 1988a) o el queso "Torta del Casar" (Pouillet *et al.*, 1991); y portuguesas, como el queso Serra (Macedo *et al.*, 1993) o el Picante (Freitas y Malcata, 1998). Estos quesos, que presentan unas características organolépticas peculiares muy apreciadas por el consumidor, tienen la ventaja de estar elaborados con

proteinasas vegetales obtenidas de forma natural, y además, pueden ser destinados al mercado de productos vegetarianos.

Del *C. cardunculus* se han aislado tres proteinasas ácidas, denominadas "cinarasas" o "ciprocinas", que han sido purificadas y parcialmente caracterizadas (Heimgartner *et al.*, 1990; Faro *et al.*, 1992). Se trata de tres proteinasas que exhiben su máxima actividad proteolítica a los pH de 5,1, 5,7 y 6,0 a diferentes temperaturas y bajo fuerzas iónicas equivalentes de 0,1 a 0,6M de NaCl (Faro *et al.*, 1992) por lo que se trata de proteasas acídicas pertenecientes al tipo de las proteinasas aspárticas denominadas "ciprocinas" 1, 2 y 3 (Cordeiro *et al.*, 1992 y 1994), siendo la ciprocina 3 la que muestra características más parecidas a la quimosina. Las ciprocinas o cinarasas procedentes de *C. cardunculus* también han sido denominadas cardosinas habiéndose aislado dos fracciones denominadas cardosina A y B, siendo la primera similar a la quimosina mientras que la segunda es similar a la pepsina.

Estas enzimas vegetales presentes en el estilo de las flores del cardo ejercen, al igual que lo hace la quimosina de ternera, un efecto proteolítico específico sobre la k-caseína, la proteína que actúa como coloide protector de la micela de caseína de la leche, que conlleva por efecto de su hidrólisis, la formación de la cuajada. Son enzimas vegetales que, además del efecto coagulante, tienen un eficaz efecto proteolítico, muy importante para el desarrollo de la maduración del queso aportándole unas características genuinas.

Estas características organolépticas "sui generis", se traducen en una textura más fina y una mayor untuosidad en la degustación, así como en la fortificación del aroma y el sabor (Tejada *et al.*, 2007). Además, están claramente provocadas por la mayor extensión proteolítica que sufren los quesos elaborados con coagulante vegetal, ya desde los primeros estadios madurativos, y que sin duda se debe, a que las cinarasas presentan mayor actividad proteolítica que la quimosina del cuajo animal (Tejada y Fernández-Salguero, 2003).

Todos los estudios sobre la utilización de las enzimas del *C. cardunculus* concuerdan en que producen una proteolisis más rápida que cuando se utiliza cuajo animal (Núñez *et al.*, 1991; Sousa y Malcata, 1997a; Tejada, 2001; Sanjuán *et al.*, 2002; Tejada y Fernández-Salguero, 2003; Pino, 2007 o Galán, 2008). También se sabe que la actividad coagulante de estas enzimas es más alta en leche de oveja,

indicando que las enzimas procedentes del cardo presentan una hidrólisis más específica en las proteínas de leche de oveja y cabra (Cordeiro *et al.*, 1994).

También es interesante mencionar los estudios de autores como Llorente *et al.* (2004) y Sidrach *et al.* (2005) que han aislado, purificado y caracterizado unas proteinasas asparticas de las alcachofas (otra planta de la familia *Cynara*, la *Cynara scolymus* L. cv. *Green Globe*); concretamente, de sus flores maduras e inmaduras, del pappus y de las hojas adultas.

Estas peptidasas, llamadas scolyminas, presentaban características similares a las cardosinas del *Cardunculus*; así, manifestaban su máxima actividad proteolítica a pH 5, y la secuencia amino terminal de su subunidad B presentaba una alta homología con la subunidad menor de la cardosina A.

Estas características sugieren que existe una gran similitud entre las dos enzimas, lo que permite considerar su potencial para utilizarla en la fabricación de quesos, ya que *in vitro* se ha comprobado que estas proteinasas aspárticas extraídas de la alcachofa rompen la κ -caseína en el mismo enlace peptídico (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) que la quimosina y otras proteinasas fúngicas y microbianas. Pero, a pesar de haberse demostrado la posible utilidad de estas enzimas en la fabricación de quesos, aún no se ha realizado ningún trabajo que estudie el efecto que estas cinarasas o scolyminas pudieran tener sobre las características fisicoquímicas, bioquímicas y organolépticas de los quesos obtenidos.

La utilización de extractos acuosos crudos de las flores del cardo *C. cardunculus* planteaba problemas sanitarios y tecnológicos. En relación a los primeros, la falta de seguridad alimentaria se correspondía con los altos recuentos que presentaba en gérmenes viables totales, enterobacterias y coliformes (Tejada, 2001). En cuanto a los tecnológicos, el principal problema era que no se podían utilizar estos extractos de forma estandarizada, entre otros factores porque: se podían recolectar junto a otras especies de cardos sin actividad coagulante o diferente (Fernández-Salguero y Gómez, 1997; Sanjuán y Fernández-Salguero, 1994), porque se podía comercializar con impurezas lo que impediría el poder utilizar siempre la misma cantidad de enzima para coagular la leche, o porque las flores recolectadas en diferentes estadios de floración, temporada, etc...podrían originar diferencias en sus actividades coagulantes. Para resolver estos problemas Fernández-Salguero *et al.* (2000) desarrollaron y patentaron un producto

lío-filizado a partir de los extractos acuosos de las flores desecadas, utilizándolo como coagulante vegetal. La obtención de este coagulante estandarizado e higiénico permite la elaboración de partidas de queso más uniformes, mejorando su calidad microbiológica, sin modificar significativamente las características bioquímicas, físico-químicas y sin que se pierdan las excelentes cualidades sensoriales que caracterizan y diferencian a los quesos elaborados con coagulante vegetal (Fernández-Salguero *et al.*, 2002; Tejada y Fernández-Salguero, 2003).

La utilización del coagulante vegetal en la elaboración de quesos de leche de cabra aún no está muy extendida, entre otras causas porque tradicionalmente se le conferían a estos quesos, de forma totalmente injustificada, un intenso y desagradable sabor amargo debido a la acumulación de ciertos péptidos amargos. Este fenómeno tan sólo se ha detectado en quesos de leche de vaca elaborados con coagulante vegetal, donde las cinarasas actúan de forma más intensa que la quimosina sobre las regiones voluminosas e hidrofóbicas de la α_1 -caseína y la β -caseína, hidrolizando todos los enlaces peptídicos y produciendo péptidos potencialmente amargos (Barbosa *et al.*, 1976; Macedo *et al.*, 1993b y 1996). En quesos elaborados con leche de oveja o cabra, debido a las diferencias existentes entre las caseínas de estas especies con respecto a las de la leche de vaca, y por la especificidad de las cinarasas, la formación de estos péptidos no es tan patente, y por tanto, no se manifiesta tan intensamente el sabor amargo.

Actualmente, el coagulante vegetal se utiliza de forma exitosa, en la elaboración de algunos quesos de cabra del suroeste español, como el queso Los Ibores. No obstante, los estudios realizados para determinar el efecto de estas proteinasas vegetales sobre las características físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales durante la maduración de quesos elaborados con leche de cabra son aún muy escasos. Tan sólo se ha estudiado el efecto del coagulante vegetal fresco sobre las características bioquímicas de una variedad de queso de cabra portugués (Sousa y Malcata, 1997b), y en variedades de queso españolas como el queso de Los Pedroches elaborado con leche de cabra (Pino, 2007) obteniéndose resultados muy alentadores, no habiéndose estudiado en ninguna otra variedad de queso.

1.1.3. Quesos de cabra con Denominación de Origen

Los quesos con Denominación de Origen tienen un prestigio reconocido, ya que para poder acceder a ella hay que tener razones sólidas de calidad, tradición, conocimiento y normas estrictas de cumplimiento que son vigiladas por órganos eficaces como son los Consejos Reguladores.

Actualmente son cinco las variedades de quesos de cabra españolas acogidas a la Denominación de Origen Protegida. Son el queso Majorero, el Ibores, el Palmero, el queso de Murcia (que integra dos variedades, el fresco y el curado) y el queso de Murcia al Vino. A continuación se presentan sus características principales, obtenidas de los pertinentes Consejos Reguladores reconocidos por el Ministerio.

1.1.3.1. Queso Majorero

Se trata de un queso madurado, de pasta prensada y forma cilíndrica con una altura de 6 a 9 cm y un diámetro entre 15 y 35 cm, con pesos comprendidos entre 1 y 6 Kg.

Para la elaboración de este queso se utiliza la leche de la cabra Majorera, coagulada por la adición de cuajo proveniente de estómagos desecados de baifo (cabrito) y mantenidas entre 28° y 32° C durante un período aproximado de una hora.

Una vez obtenida la cuajada, se corta hasta obtener un tamaño de grano entre 5 y 15 milímetros de diámetro, se desuera, y la pasta semiprensada resultante, se introduce en pleitas de palma o plástico o en moldes plásticos o metálicos inoxidables, que imiten el dibujo de pleita tradicional hecha con hojas de palmera trenzada, y con el tamaño adecuado para que los quesos, una vez madurados, presenten la forma, dimensiones y peso que son peculiares en los mismos.

La salazón será húmeda o seca, utilizándose sal marina, y el madurado se realiza en la quesera, en el cañizo o sobre tablas y siempre en un lugar fresco y ventilado y con poca luz, con precaución de darle vuelta cada poco tiempo.

El curado, se hace untando con grasas o aceites (mejor de oliva) e incluso con grasa de queso y mohos de curados anteriores. A continuación se añade un

producto que cierre los poros o respiración del queso, para que no se pierda peso y gane calidad.

El color es blanco en los quesos tiernos, y pardo amarillento en los curados. Al corte, la pasta es compacta, de textura cremosa y de color blanco a marfileño, generalmente sin ojos. El sabor es ácido y algo picante.

Presenta valores medios de extracto seco del 53,4%, y de 41,16% de proteína, 46,78% de grasa, 3,26% de ácido láctico, 4% de cenizas, 3,7% de sal, 2% de calcio y 1% de fósforo (referidos a porcentaje sobre la materia seca) (Fernández-Salguero *et al.*, 1981).

1.1.3.2. Queso de los Ibores

Es un queso graso, de coagulación enzimática, con forma cilíndrica, caras sensiblemente planas y superficie perimetral plano convexa. Con una altura de 5 a 9 cm, un diámetro de 11 a 15 cm y un peso que oscila de 650 a 1.200g.

En su elaboración se utiliza la leche cruda de las razas Serrana, Verata y Retinta, que se coagula con cuajo animal u otras enzimas coagulantes a una temperatura entre 28-32°C con un tiempo de cuajado de 60-90 minutos. Tras eso, se produce el corte de la cuajada, su moldeado, prensado y salazón, bien seca o húmeda; y se procede a su maduración como mínimo de 60 días, en cámaras con una temperatura entre 4-15°C y una humedad relativa superior al 75%.

La pasta es semidura, de color blanco marfil, y presenta ojos desigualmente repartidos.

Composición grasa mínima 50% sobre extracto, proteína total mínimo 30% sobre el extracto seco, el extracto seco tiene un mínimo del 50%; un pH mínimo del 5,2 y el cloruro sódico máximo es el 4% (Franco *et al.*, 2001).

1.1.3.3. Queso Palmero

El Queso Palmero es un queso graso, presenta forma cilíndrica, con las caras planas, altura de 6 a 15 centímetros, y un diámetro entre 12 y 60 cm. Con un peso entre 0,75 y 15 Kg.

Este queso se elabora a partir de leche cruda de cabra recién ordeñada y cuajo natural de cabrito, y se consume ahumado.

La leche recién ordeñada se filtra y se coagula a una temperatura entre los 27° y los 33°C, por un tiempo medio de 45 minutos. Tras introducir las manos en el caldero e ir obteniendo la cuajada bajo éstas, la cuajada se corta hasta obtener un tamaño de grano pequeño, que facilita el desuerado. Posteriormente se prensa y se le da forma a través de unos aros denominados empleitas, y se sala con sal marina gruesa de las salinas de la isla.

Una vez hecho el queso se procede a su ahumado, a partir de la combustión cáscaras de almendras, tuneras y pinillo del pino canario. La maduración se realiza en cuevas, cocinas o locales acondicionados, y en este proceso, aparte de las operaciones habituales de volteo, se suele untar la corteza con aceite de oliva o gofio.

La pasta es de color blanco brillante, adquiriendo tonalidades marfileñas y mates según va madurando. La superficie y el corte están libres de elementos de ruptura tales como cavidades y grietas, pudiendo presentar pequeños ojos repartidos al azar y en su mayoría de forma irregular.

Las características químicas serán variables según el grado de maduración, presentando los valores mínimos de 17,50% de proteína, 35,10% de grasa/ES y un 48.50% de extracto seco (Anónimo, 2001).

1.1.3.4. Quesos de Murcia

1.1.3.4.a) Queso de Murcia, que integra las dos variedades: fresco y curado

El “queso de Murcia fresco” es un queso graso, elaborado con leche pasteurizada, de pasta ligeramente prensada y no cocida, y no madurado. Presenta forma cilíndrica, altura entre 5-8 cm para el formato pequeño y entre 8-12 cm para las piezas de 1-2 Kg, y con un diámetro entre 7-9 cm para el formato pequeño y entre 12-18 para las piezas de 1-2 Kg. De corteza prácticamente inexistente, con grabados característicos tipo pleita. De masa compacta al corte, de textura blanda, poco salada y aroma suave. De color blanca intensa y prácticamente sin ojos (Anónimo, 2001).

El “queso de Murcia curado” es un queso graso, de pasta prensada y no cocida, que se comercializa a partir de los 60 días de su elaboración. Con forma cilíndrica y bordes rectos pero no vivos, con una altura entre 7-9 cm y diámetro entre 12-18 cm. El peso de las piezas de 1-2 Kg aproximadamente. Corteza lisa (sin grabados) y de color de céreo a ocre. De masa compacta al corte, textura firme, aroma suave, de color blanca, tomando un ligero tono amarillento en los quesos más curados, con pocos y pequeños ojos (Anónimo, 2001).

1.1.3.4.b) Queso de Murcia al Vino

Las características y descripciones técnicas de este queso se verán más detalladamente en el apartado siguiente.

1.1.4. Queso de cabra de Murcia al Vino

Tradicionalmente la ganadería caprina se ha encontrado ligada a países en vías de desarrollo, y dentro de ellos a las zonas más pobres y marginales, presentando connotaciones sociales muy importantes. En la Región de Murcia la ganadería caprina cumplía la doble finalidad de mantener asentamientos humanos en lugares que otros sectores habían abandonado, evitando la posible desertización de la zona y, por otra parte, la utilización de alimentos pastables que otros sectores de las ganaderías “industriales” no utilizaban.

La mayor parte de la leche producida en la Región de Murcia se destina a su transformación industrial, siendo mínima la cantidad de ella destinada a su consumo en fresco. Así, y según datos del MARM, de los 23.722.000 litros de leche de cabra producidas en la Región, tan sólo 276.000 litros (aproximadamente un 1%) se destinó a autoconsumo, mientras que los 23.446.000 litros restantes fueron comercializados para su transformación.

En el año 2007, había censadas en Murcia 190.762 cabezas de cabras (Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, 2009), siendo la mayoría ganaderías puras, y el resto en rebaños mixtos con ovejas. La explotación de caprino en la Región de Murcia se basa en la utilización de la raza Murciano-Granadina, de aptitud láctea reconocida. La producción láctea media es de 530 litros de leche para hembras paridas más de una vez y ordeñadas una vez al día, con un periodo de lactación de 260 días, y de 300 litros para las primíparas con

200 días de lactación. Estas producciones están sometidas a las variaciones debidas a las diferentes formas de manejo, alimentación o estado sanitario en que se encuentren los rebaños (Poto, 1992).

Hasta hace pocos años, en la Región no existía mucha tradición quesera, y el poco queso que se hacía lo elaboraba el propio ganadero hirviendo la leche de sus cabras y añadiendo limón o vinagre, destinándolo al autoconsumo. En la década de los ochenta, y dentro de las líneas de actuación de la Consejería de Agricultura Ganadería y Pesca para rentabilizar las explotaciones de ganado caprino, se puso en marcha en la Región el Plan para el Desarrollo de la Ganadería Extensiva, con programas de mejora en donde se proponían:

-Mejoras en la gestión de los ganaderos, estimulando la creación de una asociación que les permitiera adquirir producto conjuntamente, y de esta manera, abaratar costes y establecer un precio previo a la leche, mejorando las condiciones de su comercialización.

-La modernización de las explotaciones ganaderas con objeto de aliviar el trabajo del ganadero y mejorar las condiciones sanitarias del rebaño.

-Fomentar las queserías artesanales que transformarán la leche en productos derivados produciendo un aumento en la demanda láctea dentro del mismo núcleo, así como el incremento del empleo en el sector.

La creación de un queso de cabra típico de la Región de Murcia permitiría al ganadero hacer frente a la situación de oligopolio, por parte de las centrales lecheras, en la que se encontraba a la hora de establecer el precio de la leche de sus cabras, que era muy diferente según se efectuase su venta en primavera o en otoño (los precios bajaban en primavera y aumentaban en otoño), y que coincidía con la mayor producción que en primavera existía de la leche de vaca. La creación de un mercado transparente permitiría que los precios se determinaran por las condiciones de la oferta y la demanda.

En 1988 la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación firma un convenio con la Asociación de Fomento de Quesos Artesanos (A.F.Q.A.) eligiendo al queso al vino como el representante del queso de cabra de Murcia, seleccionado de entre otros, como el queso blanco de Murcia y el de la huerta de Murcia.

El queso seleccionado tenía que cumplir tres condiciones: una presentación externa nueva y diferenciada, una pasta lavada para conseguir una textura blanda y elástica y de un sabor suave, y algún atributo que recordara su origen murciano.

Para esta última premisa se pensó en el lavado exterior de la corteza durante su maduración, con vino tinto de la Región, de alto extracto seco, mucho cuerpo y gran contenido de taninos, que podía colorear el queso y darle un cierto aroma. De esta forma, se tipificaría el queso al vino como un queso de cabra diferente con unos atributos comerciales que hicieran referencia a su origen y que, pudiera diferenciarlo del centenar de quesos tradicionales que se podían encontrar en España.

Como consecuencia de la puesta en marcha de este plan y el fomento de la instalación de queserías en Murcia, se producen cambios en la cabaña caprina de la Región, que pueden resumirse en una serie de aspectos como son:

-Una disminución, e incluso desaparición de las explotaciones de tamaño pequeño y medio.

-Aumento progresivo de la concentración de animales en un menor número de rebaños, pero de mayor tamaño, lo que permite implantar mejoras como la utilización de maquinaria de ordeño o la de la refrigeración de la leche, así como la mejora de las instalaciones y de las condiciones higiénico-sanitarias de la explotación.

-Un incremento en el valor añadido del producto, consecuencia de la transformación de la leche de cabra en producto elaborado.

-La existencia de una correlación entre los municipios que poseen un mayor número de cabezas de cabra con los lugares en donde se instalan las industrias queseras.

-La aparición de ganado caprino en zonas donde tradicionalmente no tenían implantación.

De esta forma, el número de queserías se vió incrementado, pasando de las cuatro que existían al principio de los años ochenta a las 23 que existen en la actualidad, que llegan a transformar el 52% de los 23.772.000 litros de leche de cabra producida en la Región. De hecho uno de los factores que han permitido el aumento de la producción de quesos de Murcia ha sido el crecimiento

experimentado en las explotaciones caprinas de la Región. Según datos de la memoria de la Consejería de Agricultura y Agua del año 2008, el tamaño medio de las explotaciones aumentó en más de 100 cabezas de cabras por explotación, contabilizando un total de 158 ganaderías adscritas al Consejo Regulador con 55.000 cabras adultas que producen más de 3 millones de litros de leche/año.

El BORM del 18 de Junio de 1990, publica la Orden de 11 de Junio de la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca por la que se aprueba la reglamentación específica de los quesos de cabra acogidos a la denominación "Producto de Calidad de Murcia" y su marca, la cual establece la Reglamentación específica de producción, elaboración y calidad del queso de cabra en sus tres variedades, fresco, curado y al vino. Ese mismo año, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, publicó el Catálogo de los Quesos de España, donde se recogía al Queso de Murcia al Vino (MAPA, 1990) y el 11 de Julio de 2001, se publicó en el BORM el Reglamento de las Denominaciones de Origen "Quesos de Murcia" y "Queso de Murcia al Vino" y su Consejo Regulador, siendo posteriormente ratificada por la Orden publicada en el BOE el 10 de Octubre del mismo año. Finalmente, en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas de 25 de Junio de 2002, ambas denominaciones fueron inscritas en el Registro de Denominaciones de Origen Protegidas y de Indicaciones Geográficas Protegidas.

El "Queso de Murcia al Vino" es un queso maduro, graso, de pasta prensada, lavada y no cocida, que se comercializa a partir de los 45 días de maduración, aunque en el caso de piezas pequeñas puede llegar a comercializarse a partir de los 30 días. Es de forma cilíndrica, con bordes rectos y lateral ligeramente redondeado. La corteza es lisa, ligera, y está lavada con vino tinto doble pasta que le confiere un color granate-rojizo. El peso oscila entre 1 y 2 Kg en formato grande y 400-500 g en formato pequeño. La masa es compacta, la textura cremosa y elástica, sabor ligeramente ácido, poco salado y aroma suave. Ofrece un color blanco intenso al corte, con pocos y pequeños ojos (Anónimo, 2001).

Por su alta calidad y sus excelentes y peculiares características organolépticas, se ha convertido en un producto muy apreciado en el mercado nacional e internacional. De hecho, en el último año, se registró la mayor producción total de queso amparado con figuras de calidad, con más de 388.000

Tm. Concretamente, y según datos aportados por el Consejo Regulador de las DOP Queso de Murcia, en el año 2009, se certificó una producción de 354.909 kg de queso de Murcia al Vino, de los que un 22% se comercializaron en España; de 33.178 kg de queso de Murcia Curado, con una comercialización nacional del 29%, y 2.665 kg de Queso Fresco. En cuanto a la comercialización exterior, Murcia se sitúa como la principal región exportadora de queso de cabra, especialmente a Estados Unidos y a Europa, a los que destinan más de 275.300 kg de queso de Murcia al Vino (77.5% de la producción total) y 23.444 kg de Queso de Murcia Curado (más de un 70%).

La información científica acerca de los aspectos tecnológicos, bioquímica de la maduración y microbiología en quesos españoles de cabra, es menor que la información de tales aspectos realizada en quesos de leche de vaca y oveja. Sin embargo, en los últimos quince años se han incrementado los estudios de caracterización de quesos de cabra, con objeto de mejorar su producción y calidad (Pino, 2007).

Todos ellos se elaboran coagulando la leche con cuajo animal, de forma que no existen variedades reconocidas de quesos de leche de cabra elaborados con coagulante vegetal (salvo en los estudios realizados por Pino (2007), en una variedad del queso de Los Pedroches).

La aplicación de una adecuada tecnología de fabricación de los quesos o los intentos de mejora de su calidad (uniformidad, aspecto, aceptabilidad general, etc.) exige un profundo conocimiento de sus características físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y organolépticas.

1.2. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL QUESO

El queso es una forma de conservación de los componentes insolubles de la leche, la caseína y la materia grasa, que se obtiene por coagulación de la leche seguida del desuerado, en el curso del cual el lactosuero se separa de la cuajada (Alais, 2003).

La puesta a punto de un procedimiento de fabricación que pueda garantizar una gran calidad e higiene, una presentación atractiva y uniforme, y un precio razonable, es importante, además de por razones científicas y económicas, por el mantenimiento de nuestro patrimonio cultural y gastronómico. No obstante, constituye un problema complejo ya que las características de cada tipo de queso, además de depender de la naturaleza de la leche empleada, son el resultado de numerosos factores interdependientes que, según Alais (2003), pueden agruparse en:

-Factores microbiológicos: composición de la microflora, microfloras asociadas y sucesivas.

-Factores bioquímicos: concentración y proporción de los enzimas coagulantes, principalmente del cuajo, de las bacterias, las levaduras y los mohos.

-Factores físicos y físico-químicos: temperatura, pH, efectos osmóticos, etc...

-Factores químicos: proporción de calcio retenido en la cuajada, contenido en agua y sal, componentes de la atmósfera (humedad, gas, carbónico, amoníaco).

-Factores mecánicos: corte, agitación, trituración y fraccionamiento, que reducen o acentúan los efectos de los factores precedentes.

1.2.1 pH

El pH es un parámetro que va a estar regulado por el grado de hidrólisis sufrido por la lactosa tras la coagulación de la leche, así como por la cantidad de ésta que quede retenida en la cuajada tras el desuerado. Las primeras operaciones en la elaboración del queso determinan el grado de acidificación de la cuajada hasta el momento del salazonado. A partir de este momento, la actividad proteolítica de bacterias y mohos provoca la liberación de sustancias neutras o

alcalinas que elevan el pH y la disminución de la capacidad tampón de la cuajada.

El pH afecta a factores como el crecimiento microbiano, a la producción de toxinas, a la actividad enzimática (Weimer *et al.*, 1997) o a la textura del queso.

El pH óptimo durante la coagulación del queso está comprendido entre 5,7 y 6. A este pH se produce una red tridimensional muy regular, que atrapa glóbulos grasos de 2-3 μm de diámetro. Las primeras fuerzas responsables de la cohesión del gel son enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, hidrófobas e interacción electrostática), de los que dependen posteriormente las propiedades reológicas del queso. Por tanto, 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 (Marchesseau *et al.*, 1997).

1.2.2. Lactosa / ácido láctico

La lactosa es (cuantitativa y cualitativamente) el principal carbohidrato de la leche. Su concentración varía entre 4,2 y 5%, siendo en general, su contenido más bajo al final de la lactación y en la leche de animales con mamitis. Es un disacárido constituido por una molécula de α -D-glucosa y otra de β -D-galactosa, presentándose en forma de α -lactosa monohidratada y de α y β -lactosas anhidras.

Su presencia en el queso es fugaz ya que el 98% se pierde con el suero. Esta lactosa puede ser aprovechada por la industria alimentaria en la elaboración de diversos productos. Así, se incluye en la formulación de alimentos infantiles, productos cárnicos y de panadería o en alimentación animal (Yang y Silva, 1995; Adam *et al.*, 1999).

En quesos muy desuerados, como el Emmental, la lactosa residual desaparece totalmente tras 4 ó 5 horas. En el Cheddar, es fermentada completamente a las 24 horas en la cuajada recién prensada. En otros quesos como el Camembert, diversos tipos de quesos de cabra españoles o el Serra da Estrela, puede encontrarse lactosa hasta el día 15 ó 20 de maduración (Choisy *et al.*, 1990; Carballo *et al.*, 1994; Macedo y Malcata, 1997a).

Según estos últimos, se puede establecer una correlación entre la lactosa y el ácido láctico determinado durante la maduración, ya que, este último se origina por la acción de las bacterias lácticas sobre la lactosa.

El aumento de ácido láctico provoca un descenso rápido del pH que desarrolla el aroma del queso, modifica su estructura (por solubilización de los minerales ligados a las caseínas), favorece la retracción de la cuajada y protege el medio, al impedir el desarrollo de otros microorganismos perjudiciales e inhibir acciones enzimáticas alterantes (Lindgren y Dobrogosz, 1990).

Durante el transcurso de la maduración, el ácido láctico se neutraliza o desaparece, mediante el fosfato cálcico residual de la pasta, las fermentaciones secundarias, la destrucción metabólica o por la formación de amoníaco en quesos con flora superficial alcalinizante. Éste proceso no se desarrolla de igual medida en todas las variedades de queso, siendo más marcado en quesos de pasta blanda y teniendo poca significación en quesos de pasta dura y cocida. En el queso Suizo, el L-lactato se transforma, gracias a la acción de *Propionibacterium*, en acetato y CO₂, siendo fundamental para el desarrollo de ojos y del sabor característico. En quesos como el Brie y el Camembert la metabolización del lactato a CO₂ y H₂O por mohos superficiales, es importante en el aumento del pH y en el estímulo de la proteólisis (Varnam y Sutherland, 1995).

1.2.3. Agua

El contenido en agua del queso es muy variable dependiendo de la forma en que se realiza la coagulación, el desuerado y el prensado, experimentándose, además, importantes pérdidas durante la maduración.

El salado de la cuajada y la deshidratación durante la maduración son los principales factores que modifican el contenido de agua ligada en el queso (Eck, 1990).

Según Scott (2002), el agua se encuentra en el queso de tres formas diferentes:

- Ligada a la estructura de algunos componentes de la cuajada, como proteínas.
- Retenida por fuerzas de atracción a las partículas de cuajada y grasa.

-Agua libre que contiene las sustancias solubles.

El agua que componen estas tres fracciones puede pasar de una a otra por su liberación o como consecuencia de algunas reacciones. En esta fase acuosa se llevan a cabo las reacciones bioquímicas catalizadas por las enzimas naturales de la leche, del coagulante y microbianas. Se ha comprobado en quesos con baja humedad, que la proteólisis es más reducida, debido a que la hidratación de las proteínas tiene prioridad sobre la utilización del agua en la hidrólisis de las mismas por la quimosina (Krause *et al.*, 1999). La caracterización y cuantificación de la fracción líquida que permanece en el queso es útil para determinar la concentración de las enzimas y los sustratos.

En un estudio realizado en queso de cabra blando se observó un incremento de la porción de agua no solvente (ligada) durante la maduración en proporción al agua total. En la primera etapa de la maduración, el queso presenta una estructura débil, caracterizándose por intensas reacciones enzimáticas en la fase acuosa, favoreciéndose la proteólisis. Se produce una rápida pérdida de agua como resultado de la evaporación en la superficie del queso, facilitada por los movimientos del agua interna del queso a la superficie a través de aperturas y porosidades de la estructura. La desecación de la corteza del queso provoca la acumulación de sustancias solubles en esta zona. A medida que avanza la maduración, la estructura del queso se hace más compacta y la velocidad de difusión del agua residual es más lenta, siendo principalmente agua no solvente. La velocidad de proteólisis decrece, probablemente, debido al menor contenido de agua solvente (Pierre *et al.*, 1999).

También se ha observado que el contenido en agua puede afectar algunas propiedades reológicas del queso como la fracturabilidad (Jaros *et al.*, 1997).

Así mismo, se ha observado que la cantidad de suero exprimido por centrifugación decrece notablemente a medida que aumenta el tiempo de maduración, indicando un sustancial incremento de la capacidad de retención de agua (Guo y Kindstedt, 1995).

A partir de la determinación del agua, de manera indirecta, se va a calcular el extracto seco total de los quesos. Este extracto seco va a reflejar el valor nutritivo de los mismos ya que se compone principalmente de proteína, grasa y derivados de la lactosa, así como del contenido en minerales.

1.2.4. Grasa

La grasa es uno de los principales constituyentes del queso, y determina una de las múltiples formas que existen de clasificar los quesos. Así, en función de su contenido graso tenemos: quesos extragrasos, grasos, semigrasos, semidesnatados y desnatados, dependiendo de que el porcentaje de grasa sobre extracto seco que presenten sea, mayor o igual del 60%, esté comprendido entre 45% y 60%, 25%-45%, 10%-25% o sea menor del 10%, respectivamente (Anónimo, 2006). El porcentaje de grasa en el queso está determinado por el contenido en grasa de la leche utilizada, por el tamaño del glóbulo graso, por la velocidad de coagulación, por las manipulaciones efectuadas sobre la cuajada y por el tiempo de maduración.

La función nutricional de la grasa del queso viene determinada por el aporte energético de la grasa de la leche de partida, su composición en ácidos grasos y triglicéridos, y por su papel como disolvente de vitaminas liposolubles (Catalano *et al.*, 1985; Precht y Abd-el-Salam, 1985).

La grasa influye sobre las características estructurales y reológicas del queso. Así, la firmeza de éste, a pesar de estar determinada fundamentalmente por el contenido de proteína, cloruro sódico y agua (Chen *et al.*, 1979). También se ve afectada por el intervalo de fusión de la grasa, ya que algunos autores han observado que diferencias en la proporción del índice de grasa sólida afectan a las propiedades reológicas del queso (Prentice, 1987).

La grasa reduce la tensión y la firmeza de la cuajada debido a que la elasticidad del queso, en los primeros estadios madurativos, está influenciada por la interacción existente entre la membrana superficial del glóbulo graso y la matriz proteica (Hassan y Frank, 1997); hecho que disminuye en el queso curado por la naturaleza de la membrana de dicho glóbulo (Van Vliet y Dentener-Kikkert, 1982). Además, la grasa favorece la adhesividad, mejorando la homogeneidad de la pasta y confiriendo un aspecto cremoso (Catalano *et al.*, 1985; Stampanoni y Noble, 1991).

Con respecto a la participación de la grasa en la formación del aroma del queso, ésta tiene, al igual que la grasa de la leche de partida, una alta concentración de ácidos grasos de cadena corta que van a poder ser liberados en el transcurso de la maduración, condicionando fuertemente su aroma (Olson y

Johnson, 1990). La grasa láctea es una fuente clave de los componentes responsables del flavor del queso o de sus precursores (Wijesundera y Drury, 1999). La influencia de la grasa en la producción del aroma característico de cada queso es específica de las distintas variedades. Así, en algunos quesos, el aroma está fuertemente influenciado por la producción de ácidos grasos libres, mientras que en otras variedades de queso, la intensidad aromática no depende de este contenido, siendo más importante la función que ejerce la grasa como disolvente de compuestos aromáticos (Jameson, 1990; Olson y Johnson, 1990).

1.2.5. Proteína

En la leche se presentan dos tipos de proteínas: caseínas y proteínas séricas. Las caseínas constituyen más del 80% de las proteínas totales, presentándose en forma micelar gracias a su carácter anfifílico y a su fosforilación, que favorece la interacción entre ellas y con el fosfato cálcico. Se pueden subdividir básicamente en cinco tipos, caseínas α_{s1} , α_{s2} , β , γ y κ , todas ellas sintetizadas en la glándula mamaria, excepto la γ -caseína que se origina tras una proteólisis de la β -caseína. El 92% de la micela está constituido por α_{s1} , α_{s2} , β , y κ , con una relación de 3:1:3:1; el resto son compuestos inorgánicos fundamentalmente fosfato cálcico coloidal (Varnam y Sutherland, 1995).

Las caseínas presentan un gran polimorfismo genético, observándose además, diferencias según la especie de la que procedan. Este hecho permite la detección de fraudes, ya que mediante un análisis cromatográfico de las γ -caseínas y la para- κ -caseína se podría obtener el porcentaje de leche de vaca, oveja y cabra utilizada para la elaboración de un queso (Mayer, 1997). El porcentaje de caseínas α_{s1} y α_{s2} es más alto para leche de oveja que para el de cabra, pero significativamente más bajo que para la leche de vaca (Assenat, 1991). El porcentaje de β -caseína representa en la leche de oveja la mitad de la caseína total, mientras que en las leches de cabra y vaca representa $2/3$ y $1/3$, respectivamente. Se han descrito en leche de cabra, trece alelos en el locus α_{s1} -caseína, distribuidos en siete variantes genéticas (Martín *et al.*, 1999), corroborándose que el genotipo en este locus afecta al contenido graso de la leche, al diámetro de las micelas y a su contenido en calcio. Delacroix-Buchet *et al.* (1996) y Lamberet *et al.* (1996) detectaron diferencias en el rendimiento quesero y las

características sensoriales de quesos elaborados con leche de cabra con las variantes AA y FF de la α_{s1} -caseína. Existe una alta relación entre los genotipos de los locus α_{s1} -caseína, β -caseína y κ -caseína y el diámetro de las micelas de caseína (Lodes *et al.*, 1996a). La β -caseína presenta siete variantes genéticas en vaca y dos en oveja y cabra. Finalmente, a la κ -caseína bovina se le han identificado dos tipos de variantes genéticas (A y B) (Eigel *et al.*, 1984), mientras que en ganado ovino no presenta variabilidad genética alguna (López-Gálvez *et al.*, 1994).

Las proteínas del lactosuero comprenden dos tipos de proteínas nativas, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, la fracción proteosa-peptona y pequeñas cantidades de proteínas de origen sanguíneo, seroalbumina e inmunoglobulinas. Algunas proteosa-peptonas, durante la coagulación, se asocian con la paracaseína, pero cuando se alcanza el punto isoeléctrico de las caseínas se pierden con el suero. No obstante las tres cuartas partes de las proteosa-peptonas coagulan junto a la paracaseína aumentando el rendimiento queso (Vanboekel y Crijns, 1994).

El contenido proteico de un queso depende de la concentración de proteína de la leche y de las pérdidas de la misma al suero, que a su vez están determinadas por el sistema de coagulación y por el trabajo realizado sobre la cuajada. En las cuajadas enzimáticas se pierde la fracción soluble del caseinoglicopéptido. No obstante, son más importantes las pérdidas por causas físicas y mecánicas que hay en las cuajadas ácidas (más friables y porosas) que presentan contenidos proteicos más bajos.

El tratamiento térmico que se aplique a la leche y la intensidad del lavado de la cuajada también influye en el contenido proteico de los quesos. Así, una pasteurización alta provoca la unión de las proteínas del suero con la κ -caseína y su retención en la cuajada. Por el contrario, un lavado intenso excluirá un mayor porcentaje de proteínas séricas.

La mayoría de las proteínas lácteas se pierden durante el desuerado junto a lactosa, minerales, fracciones nitrogenadas y grasa. Se han desarrollado numerosos procesos tecnológicos para utilizarlas, obteniéndose concentrados de proteína del suero mediante ultracentrifugación, conteniendo entre un 35% y un 75% de proteína (Hollar *et al.*, 1995; Parris *et al.*, 1997). Las proteínas del suero poseen un gran interés nutricional, terapéutico, funcional y fisiológico.

Las proteínas de la leche van a sufrir modificaciones durante las diferentes etapas de elaboración del queso, fundamentalmente durante la formación de la cuajada y la maduración.

1.2.6. Sal

El objetivo del salazonado es conseguir en el queso una concentración de sal normalmente de 1,5%-2,5%, deteniendo la acidificación, y de sus condiciones de maduración. La sal proporciona al queso cierta protección sobre microorganismos indeseables, afecta a la acción enzimática, potencia su sabor, ayuda a la formación de la corteza y complementa el desuerado. Pérez Elortondo *et al.* (1999a) detectaron en queso Idiazábal un descenso de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* y, en contraste, un aumento de micrococos, mohos y levaduras, cuando se aumentaba la concentración de sal. La actividad de diversas enzimas, como las lipasas, estererasas, y aminopeptidasas se reduce con la adición de sal (Weimer *et al.*, 1997). Skeie *et al.* (1997), observaron que quesos bajos en sal presentaban menor porcentaje de materia seca, pH más alto, mayor proteolisis, mayores niveles de ácido glutámico, pirúvico y úrico, así como menor firmeza y sabores amargos. Niveles altos de sal/humedad pueden producir un efecto inhibitor sobre la proteolisis y la degradación de la lactosa (Bernardo, 1991). El contenido en sal también afecta a la lipolisis, así en el queso Idiazábal, un aumento del contenido en sal (3-4%) potenció la lipolisis (Nájera *et al.*, 1999a). Las α_{s2} -caseína, α_{s1} -caseína, β -caseína, y para- κ -caseína intactas se presentan en mayor concentración en quesos salados, posiblemente debido a que el NaCl provoca un 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).

En los quesos frescos (no madurados) con un contenido en humedad igual o superior al 40%, en los que no se ha producido proteolisis o ésta es muy limitada, la sal añadida es prácticamente el único depresor de la actividad de agua del queso (Marcos *et al.*, 1981), estando directamente relacionada con la concentración de cloruro sódico en la fase acuosa.

1.2.7. Minerales

Los minerales más importantes en la leche son los bicarbonatos, cloruros y citratos de calcio, magnesio, potasio y sodio, aunque se han detectado un total de veinticinco elementos en la leche de vaca. Se distribuyen entre una fase soluble y una coloidal, dependiendo de diversos factores como el pH y la temperatura, mientras que los iones monovalentes se encuentran en gran parte o en su totalidad en la fase soluble.

La composición mineral de los diferentes productos lácteos depende de la proporción final de los constituyentes de la leche de tales productos, y además en los quesos, de los métodos de coagulación, desuerado y salado de los mismos.

Las sales más importantes en la elaboración del queso son los fosfatos y citratos de calcio y magnesio. La cantidad de calcio disponible afecta al tamaño de las micelas de caseína, por lo que la adición de cloruro cálcico antes del cuajado aumenta el tamaño de éstas (Scott, 2002). Se ha propuesto una clasificación del queso en base a los índices Ca/P, Ca/proteína y P/proteína, puesto que dan información del modo de producción del queso y de sus características estructurales (Lucey y Fox, 1993).

Aproximadamente el 60% del calcio suele hallarse en estado coloidal, participando en la estructura del complejo caseínico, y tan sólo una décima parte se encuentra en forma de calcio reactivo. El tratamiento térmico provoca una disminución del calcio soluble y la precipitación del fosfato cálcico, de forma que en la leche UHT un 40-50% del calcio soluble aparece en forma coloidal. Durante el almacenamiento de la leche, en congelación y en refrigeración, también se produce un incremento de los contenidos de fósforo coloidal, calcio y magnesio y se modifican las propiedades de coagulación de la misma (De la Fuente *et al.*, 1997). Durante la elaboración del queso se presentan diversas situaciones que provocan la desmineralización del mismo. Así, la preacidificación de la leche provoca la transformación del Ca^{+2} y $(\text{PO}_4)^{-2}$ y magnesio coloidal insoluble, a formas solubles, que puede perderse durante el desuerado (Lucey y Fox, 1993; Le Graet y Gaucheron, 1999). Por otro lado, a medida que se reduce el pH del suero se incrementa la pérdida de minerales de la cuajada. Este valor de pH depende del momento en que se produzca la formación del ácido láctico, antes del desuerado (Cheddar) o tras el prensado (Gouda), y es característico de cada

variedad de queso. La relación Ca/P está influenciada por el pH de la cuajada, de forma que si éste descende, la relación baja, ya que la retención del calcio es mucho menor que la del fósforo, y sucede lo contrario cuando el pH se mantiene elevado. Finalmente, cuando la cuajada es calentada rápidamente a altas temperaturas durante la elaboración de algunos quesos, las partículas se contraen rápidamente, expulsando la fase acuosa y, por tanto, las formas solubles de Ca^{+2} y $(\text{PO}_4)^{-2}$ (Lucey y Fox, 1993).

Las cenizas del queso están constituídas por la sal añadida a la cuajada y por los componentes minerales derivados de los cloruros, fosfatos y citratos de sodio, calcio y magnesio que forman las sales de la leche e intervienen en la constitución de componentes orgánicos. También habrá que tener en cuenta el cloruro de calcio añadido a la leche pasteurizada o refrigerada durante largo tiempo, para restablecer el equilibrio entre el calcio soluble y el coloidal y facilitar el proceso de coagulación y la consistencia del coágulo.

1.2.8. Valor calórico

El valor nutricional del queso depende del tipo de leche utilizada en su elaboración, de su proceso de fabricación, y de las condiciones de maduración, que condicionan las pérdidas de componentes que experimentan los mismos.

A pesar de esto, de manera general, el consumo de queso reporta un gran número de beneficios entre los que destaca su gran valor nutricional. Es una buena fuente de proteínas con alto valor biológico y con elevado contenido en aminoácidos esenciales; posee un alto valor energético, dependiendo fundamentalmente de la cantidad de grasa, y de su aporte en algunos ácidos grasos esenciales. Además, contiene cantidades apreciables de minerales, especialmente calcio de fácil asimilación, vitaminas esenciales excepto el ácido ascórbico y puede ser consumido por aquellas personas intolerantes a la lactosa ya que, la que no desaparece durante el proceso de desuerado, va a ser transformada a ácido láctico.

Aunque desde el punto de vista nutritivo, su consumo es recomendable a cualquier edad, es especialmente importante en etapas de crecimiento y desarrollo, así como para el mantenimiento de la masa muscular y ósea.

El aporte energético necesario para cubrir las necesidades corporales proviene esencialmente de la ingesta diaria de alimentos, en particular de aquellos nutrientes llamados energéticos, es decir, los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. La energía, que potencialmente poseen los alimentos, y que se encuentra almacenada en forma química, se cuantifica en unidades de calor llamadas Kilocalorías, y expresan el valor energético o calórico que tienen los alimentos (Mataix, 2002). Para determinar la energía de un alimento se pueden utilizar métodos directos, como la bomba calorimétrica, que cuantifica el calor de combustión liberado por una cantidad conocida de un alimento. También puede determinarse indirectamente, multiplicando la composición química del queso por los factores de conversión teóricos del calorímetro, tal y como lo describen Kathleen y Escott (2001). Sin embargo, debido a las pérdidas digestivas, tan sólo parte de la energía de los alimentos, la denominada energía metabólica, es aprovechada por las células (McCance y Widdowson, 1993).

1.3. BIOQUÍMICA DE LOS QUESOS DE CABRA. CAMBIOS DURANTE LA MADURACIÓN

Los quesos curados o maduros sufren una maduración biológica de diferente intensidad que tiene varias finalidades. Estas son desarrollar su sabor, modificar su aspecto, textura y consistencia, así como, la digestibilidad y valor nutritivo de la cuajada (Veisseyre, 1988).

El afinado de los quesos lleva consigo la degradación o simplificación de los componentes de la cuajada. Del mismo modo, los microorganismos presentes en la leche van a producir una serie de enzimas que actúan sobre la grasa, proteína y lactosa del queso; y, estas transformaciones producirán sustancias que le proporcionan su sabor y aroma característico.

Durante esta etapa es importante controlar principalmente factores como la temperatura y humedad relativa, la aireación y el tiempo de permanencia en las cámaras de maduración, ya que van a determinar el ritmo de pérdida de agua y finalmente, el extracto seco del queso.

Aunque puede decirse que cada tipo de queso se caracteriza por su propio proceso de maduración, para Jacquet y Lenoir (1969) los grandes fenómenos que acontecen en todos los procesos de maduración, aunque en diferente grado son tres: la fermentación de la lactosa, la hidrólisis de la grasa y la degradación de la proteína.

1.3.1. Glucólisis

La glucólisis consiste en la transformación de la lactosa residual de la cuajada, principalmente en ácido láctico, así como en pequeñas cantidades de acético, propiónico, dióxido de carbono, diacetilo, además de otros componentes responsables del aroma.

Estas reacciones van a comenzar durante la coagulación y el desuerado de la cuajada y van a continuar durante el transcurso de la maduración en una intensidad diferente dependiendo de cada tipo de queso. Se produce de manera rápida durante las 24 horas que siguen al desuerado y se prolonga durante una o dos semanas hasta la desaparición, casi completa de la lactosa. De hecho, a pesar

de que sólo el 5% de la lactosa de la leche queda retenida en la cuajada, esta cantidad es suficiente para producir compuestos que contribuyen al flavor de los quesos, fundamentalmente al principio de la maduración (McSweeney y Sousa, 2000).

La fermentación de la lactosa se lleva a cabo, fundamentalmente, por acción de las bacterias lácticas de la leche o añadidas a la misma como integradoras de cultivos iniciadores (Desmazeaud, 1983; Fox *et al.*, 1993a), que van a producir ácido láctico que también sufrirá transformaciones posteriores de diversa naturaleza.

Atendiendo a las diferentes vías metabólicas utilizadas para degradar la lactosa, y por tanto, a la concentración de los productos resultantes del metabolismo de la misma, estas bacterias se clasifican en dos grandes grupos: Homofermentativas (con especies como *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y algunos *Lactobacillus* como *L. plantarum* o *L. casei*) y Heterofermentativas (con especies como *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* como *L. brevis*). Las homofermentativas utilizan la vía glucolítica para transformar prácticamente toda la glucosa de la lactosa en ácido láctico; mientras que, las heterofermentativas, producen además de lactato, etanol, acético y dióxido de carbono, por la vía de la fosfoetolasa.

La producción de ácido láctico va a producir un descenso del pH de la leche que favorece su coagulación y la sinéresis de la cuajada, a la vez que ejerce un efecto preventivo sobre el crecimiento de bacterias perjudiciales (Ordóñez, 1987). Por otro lado, tanto en quesos elaborados con leche pasteurizada, como con leche cruda, es habitual adicionar cultivos iniciadores a la leche antes de su coagulación. En los primeros se persigue obtener un producto más homogéneo, de más fácil comercialización; mientras que en los segundos, la flora aportada entra en competencia con la flora de la leche ayudando a controlar el proceso de maduración, ya que evita fermentaciones perjudiciales, que pueden dar lugar a una producción incontrolada de gas y a la aparición de sabores anormales.

Dependiendo de la cantidad de cultivo iniciador añadido, del tiempo empleado en la elaboración del queso, del estado de la cuajada durante la fabricación, del nivel de salado y el grado de enfriamiento de la cuajada, se va

producir un descenso del pH de la cuajada que varía entre 4,6 y 5,1 (Lawrence *et al.*, 1987; Fox, 1993a).

1.3.2. Lipolisis

La lipolisis es uno de los mayores cambios bioquímicos ocurridos durante la maduración del queso. Es una degradación de la grasa producida por vía enzimática que influye sobre las características sensoriales de los quesos, ya que se ha demostrado que los ácidos grasos libres (AGL) producidos durante la lipolisis, contribuyen junto con los compuestos volátiles y los productos de la proteolisis, al flavor del queso (McSweeney y Sousa, 2000; Urbach, 1993).

En este proceso, los glicéridos, por acción de las lipasas, son hidrolizados a diglicéridos, monoglicéridos o ácidos grasos libres (Choisy *et al.*, 1990; Molimard y Spinnler, 1996) contribuyendo así al aumento de la acidez total (Dias, 1998).

La lipolisis varía considerablemente entre los diferentes tipos de quesos, y está influenciada por múltiples factores como son la calidad de la leche, el grado de agitación y homogeneización de la misma, pH, concentración de sal, tiempo y temperatura de maduración del queso (Nájera *et al.*, 1999a).

Los AGL son liberados gracias a la acción de lipasas provenientes de diferentes fuentes como: la leche, el cuajo, las bacterias pertenecientes a los cultivos iniciadores, los mohos incluidos como cultivos secundarios y enzimas lipasas (Collins *et al.*, 2003; Perotti *et al.*, 2005).

De esta manera, la contribución de las lipasas naturales de la leche (lipoprotein lipasa) a la lipolisis del queso va a depender del tratamiento térmico al que se haya sometido la leche, ya que la pasterización reduce la actividad de éstas. La contribución del cuajo va a depender del tipo utilizado; así, el cuajo comercial de ternero o bovino, que es comúnmente utilizado en la mayoría de las variedades de queso, está normalmente libre de actividad lipolítica; mientras que, el cuajo tradicional de abomaso de cordero o cabrito, tiene alta actividad lipolítica, (Battistotti y Corradini, 1993). Y la microflora contribuye a la lipolisis por la vía del sistema esterasa/lipasa de las bacterias lácticas y ácido propiónicas, bacterias no *estárter*, microorganismos superficiales, levaduras y mohos (McSweeney y

Sousa, 2000); siendo los mohos los microorganismos de mayor actividad lipolítica, mientras que las bacterias lácticas exhiben muy escasa actividad (Ordóñez, 1987).

La lipólisis se produce con mayor intensidad durante la primera semana de maduración, debido principalmente a la acción de las lipasas nativas de la leche cruda (Gobbetti *et al.*, 1997). Mas tarde, hacia la segunda semana de maduración, comienza la lipólisis desarrollada por los microorganismos lipolíticos, y su acción es más notoria en las fases más avanzadas de la misma, contribuyendo de forma importante al bouquet del queso (Vieira de Sá *et al.*, 1970).

En un queso madurado, los ácidos grasos liberados y sus productos de transformación, afectan de forma importante al perfil organoléptico de un queso. Así, según diversos autores (Rafecas *et al.*, 1985, Lacasa, 1986; Ordóñez, 1987; Nájera *et al.*, 1993; Chávarri, 1999) los AGL contribuyen al aroma de los quesos porque actúan como precursores de compuestos volátiles del tipo metilcetonas, alcanos, lactonas y ésteres alifáticos y aromáticos, componentes del valor aromático característico de muchos quesos madurados, y porque los ácidos grasos de cadena corta lineal como el fórmico, acético, propiónico, butírico y caprónico, y ramificada, como isobutírico e isocaprónico contribuyen “per se” al aroma de los quesos madurados.

Sousa *et al.* (1997) apuntaron que los ácidos grasos libres contribuyen positivamente al sabor característico de una gran variedad de quesos, cuando éstos se encuentran equilibrados con los productos de origen proteolítico y demás productos derivados de la acción catalítica de otras enzimas. En este sentido, Buffa *et al.* (2001) concluyeron que, la lipólisis intensa encontrada, particularmente en quesos italianos duros, y en quesos de cabra, eran esenciales para el desarrollo correcto de sus sabores, y que la mayoría de los ácidos grasos libres que se generaban eran los precursores de los compuestos volátiles como las metil cetonas, alcanonas, lactonas, etc., que ejercen un papel decisivo en el aroma de estos quesos. También, Gaborit *et al.* (2001), argumentan que algunos ácidos grasos libres como el hexanoico, octanoico, nonanoico y decanoico y de cadenas ramificadas como el 3 metil butanoico, 4 metil octanoico y 4 etil octanoico contribuyen al sabor característico a cabra en el queso.

Bajo otro punto de vista, la lipólisis puede afectar negativamente al sabor de los quesos, como en el caso de los quesos Gouda, Gruyere o Cheddar, que no

deberían de sobrepasar el 2% de lipólisis (Collins *et al.*, 2003) lo que facilita la oxidación y provoca rancidez, generada por la producción de una cantidad excesiva de ácidos grasos volátiles liberados por la acción de la lipoprotein lipasa.

Por otra parte, Tunick (2000), sostiene que la textura de un queso tiene tanta importancia como su flavor por lo que la mayoría de las investigaciones reológicas llevadas a cabo en productos lácteos están limitadas al queso. Los mono y diglicéridos producidos como consecuencia de la lipólisis son surfactantes y por lo tanto introducirán cambios en las propiedades reológicas del queso.

Aunque la lipólisis es la vía principal de formación de los AGL en quesos madurados, éstos también se pueden generar a partir de la metabolización de hidratos de carbono y proteínas por acción de las bacterias lácticas. (Bills *et al.*, 1969).

1.3.3. Proteolisis

La proteolisis es un fenómeno fundamental en la maduración del queso y afecta a la textura, al aroma y al sabor del producto final (Varnam y Sutherland, 1995).

Dada la complejidad bioquímica de las sustancias nitrogenadas del queso, la gran variedad de agentes proteolíticos susceptibles de intervenir y la multiplicidad de vías metabólicas que el proceso degradativo puede seguir, puede comprenderse fácilmente la gran variabilidad de productos que se acumulan en la pasta del queso durante la maduración.

Puesto que la mayor parte de las proteínas del suero se pierden durante la fabricación del queso, las proteínas mayoritarias y predominantes en el mismo son las α y las β -caseínas (Scott, 2002). Durante la maduración del queso, estas proteínas son hidrolizadas por los enzimas proteolíticos en productos muy diversos, que van desde péptidos de gran tamaño hasta aminoácidos libres, e incluso amoníaco (Walstra *et al.*, 2001).

Según McSweeney y Sousa (2000), los enzimas proteolíticos responsables de los procesos de hidrólisis pueden ser: enzimas coagulantes (quimosina, pepsina, proteinasas ácidas microbianas o vegetales), enzimas endógenas de la leche

(plasmina principalmente), enzimas procedentes del cultivo iniciador o estárter, enzimas bacterianas que no forman parte del estárter, enzimas del fermento secundario o, proteinasas y peptidasas exógenas (utilizadas para acelerar la maduración).

Estas enzimas, tal y como se recoge en varios estudios como los de Macedo *et al.* (2000, 2002) en queso Serra da Estrela, pueden ver afectada su actividad por factores como el contenido en humedad, los niveles de sal, el pH, el potencial redox o la temperatura de maduración.

La proteólisis tiene un efecto inmediato en la textura de los quesos duros y semiduros por la hidrólisis de proteínas, el incremento del pH y la retención de agua por los grupos amino y carboxilo que se van formando durante la maduración (Calvo *et al.*, 2007). Este ablandamiento producido por el debilitamiento de la red caseínica, es muy dependiente del pH. Así por ejemplo, en queso Edam, el alto valor de pH permitiría a las proteínas permanecer en una matriz que se va ablandando conforme aumenta la proteólisis. Proteólisis que tendrá lugar más rápidamente en el centro del queso donde el contenido en NaCl es menor. Por el contrario, el pH bajo de los quesos tipo Cheddar, hace que la pasta se vuelva desmenuzable al progresar la proteólisis, ya que el agua intersticial se encuentra ligada por grupos iónicos (Varnam y Sutherland, 1995).

1.3.3.1. *Proteólisis primaria*

La proteólisis primaria, incluye aquellos cambios que se producen en las caseínas y los péptidos, y que van a poder ser detectados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Rank *et al.*, 1985), que es una técnica basada en la separación de los péptidos en función de su relación carga/peso molecular.

Esta hidrólisis inicial de las caseínas se va a producir por las enzimas endógenas presentes en la leche y por el coagulante empleado en la elaboración del queso, rindiendo principalmente, péptidos de gran tamaño. La determinación de estos péptidos, que puede calcularse, bien utilizando la disminución de la cantidad de paracaseína durante la maduración, o bien, mediante la proporción de NS formado, sirve para determinar la llamada “extensión” de la proteólisis (Scott, 2002).

La plasmina participa en la degradación inicial de las caseínas, a péptidos de tamaño grande e intermedio, siendo su acción específica sobre la β -caseína (concretamente sobre los enlaces peptídicos en el extremo C-terminal de residuos lisil, y en menor grado de residuos arginil (Weinstein y Doolittle, 1972)), dando lugar a las proteosomas-peptonas (fragmentos N-terminales) y las γ -caseínas (fragmentos C-terminales). En menor medida actúa también sobre las α_{s2} -caseínas (Walstra *et al.*, 2001). En queso madurado elaborado con leche cruda, la enzima catepsina D juega un papel importante actuando sobre la α_{s1} -caseína (Kaminogawa, 1980), rindiendo la α_{s1} -I-caseína.

Con relación al coagulante empleado, la acción de la quimosina sobre la α -caseína se produce de forma más intensa y temprana que la ejercida sobre la β -caseína (Ramos y Martínez-Castro, 1976; Ramos *et al.*, 1981), debido a que entre las regiones hidrofóbicas C-terminales de la β -caseína se producen uniones intramoleculares, que hacen que sea más difícil su escisión. En queso de cabra el ataque de la quimosina sobre las α_{s1} -caseína y β -caseína es más intenso que en quesos de vaca (Ramos y Martínez-Castro, 1976; Ramos *et al.*, 1981; Trujillo *et al.*, 1997).

Se ha comprobado que, las proteinasas del *Cynara cardunculus*, utilizadas como coagulante vegetal, tienen la capacidad de romper todos los enlaces de ciertas regiones extremadamente hidrofóbicas de la α_{s1} -caseína (Ala₁₆₃-Trp-Tyr-Tyr-Tyr-Val₁₆₇) y β -caseína (Ala₁₈₉-Phe-Leu-Leu-Tyr₁₉₃), mientras que la quimosina rompe sólo el enlace Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅ en la región de la α_{s1} -caseína y el de las regiones Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ y Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ de la β -caseína. Esto sugiere que las proteinasas de *C. cardunculus* exhiben mayor preferencia por los enlaces entre residuos hidrofóbicos voluminosos que la quimosina (Macedo *et al.*, 1996).

Por otra parte, Sousa y Malcata, (1998b) encontraron también diferencias en los péptidos detectados en quesos de oveja elaborados con coagulante vegetal y con cuajo animal. De esta manera, los péptidos β -(f₁₂₈-*), β -(f₁₆₆-*), β -(f₁₉₁-*) y α_{s1} -(f₂₄₋₁₆₅) solamente fueron producidos por la acción de *C. cardunculus*, mientras que el β -(f₁₆₄-*) y α_{s1} -(f₁₂₀₋₁₉₁) sólo aparecieron en los quesos elaborados con cuajo animal.

1.3.3.2. *Proteolisis secundaria*

La proteolisis secundaria se caracteriza por la hidrólisis de los polipéptidos y péptidos formados durante la proteolisis primaria como consecuencia de la acción de las bacterias del estárter, de microorganismos no iniciadores o de fermentos secundarios que van a rendir péptidos y aminoácidos extraíbles con diferentes solventes, incluyendo el agua. Estos compuestos generados forman parte del nitrógeno no protéico (NNP) y determinarán lo que se conoce como intensidad o profundidad de la proteolisis (Walstra *et al.*, 2001).

Las proteinasas y peptidasas responsables de la proteolisis en quesos elaborados a partir de leche cruda proceden de las bacterias lácticas no iniciadoras y de microorganismos secundarios; y, en quesos elaborados con leche pasteurizada se corresponden principalmente, con las bacterias del cultivo iniciador.

Estas bacterias integrantes del cultivo iniciador se corresponden con especies mesófilas pertenecientes a los géneros *Lactococcus* y *Leuconostoc* y termófilos como *Lactobacillus* y el *Streptococcus thermophilus* (Sousa *et al.*, 2001), mientras que la mayoría de las proteinasas y peptidasas de bacterias lácticas no iniciadoras pertenecen al género *Lactobacillus*, del que se están aislando un gran número de microorganismos como *L. curvatus* DPC2024 (Magboul y McSweeney, 1999).

Todas las proteínas de la leche son susceptibles de ser hidrolizadas por estos microorganismos aunque de forma diferente. Así por ejemplo, la α -caseína es más fácilmente degradada por *Lactobacillus helveticus*, mientras que *Lactobacillus delbrueki* subsp. *bulgaricus* degrada mejor la β -caseína (Chandam *et al.*, 1982; Ezzat *et al.*, 1985). La actividad proteolítica de *Streptococcus thermophilus* es menor que la de los *Lactococcus* y no afecta a la hidrólisis de caseínas en el queso (Thomas y Pritchard, 1987). Las cepas de *L. Lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* muestran una actividad proteolítica inferior a la de la mayoría de las cepas de *L. Lactis* subsp. *lactis*, pero similar a las de *L. lactis* subsp. *cremoris* (Herrerros *et al.*, 2003).

Son bacterias que juegan un papel importante en la proteolisis, ya que su sistema proteinasa/peptidasa, aunque no participa de forma determinante en la

formación de grandes péptidos, hidroliza los oligopéptidos en aminoácidos, (Fox, 1989; Lane *et al.*, 1997).

Estas proteinasas extracelulares que degradan las caseínas a péptidos, pueden diferenciarse en proteinasas y peptidasas. Las proteinasas de tipo PI, actúan fundamentalmente sobre la β -caseína, mientras que las de tipo PIII lo hacen sobre las α_{s1} -caseína, κ -caseína y β -caseína. Por otra parte, las peptidasas, encargadas de catalizar la hidrólisis de los péptidos, pueden ser de dos tipos: endopeptidasas y exopeptidasas, y van a contribuir al suministro de sustancias esenciales para el crecimiento de las bacterias (Tan *et al.*, 1993).

Existen dos endopeptidasas bacterianas denominadas LEP-I Y LEP-II, que catalizan la hidrólisis inicial de los oligopéptidos en péptidos de menor tamaño, escindiendo fundamentalmente el fragmento 1-23 de la α_{s1} -caseína a nivel de los enlaces Glu₁₈-Asn₁₉ y Gln₉-Gly₁₀, Gln₁₃-Glu₁₄ y Leu₂₀-Leu₂₁, respectivamente. La LEP-I se encuentra asociada a la pared celular mientras que LEP-II es intracelular, por lo que para que se produzca la degradación del fragmento 1-23 en queso se debe producir una lisis bacteriana y difundirse la enzima en el medio (Yan *et al.*, 1987).

Las exopeptidasas son aminopeptidasas y carboxipeptidasas, que degradan completamente los péptidos de menor tamaño, gracias a una separación progresiva de los aminoácidos terminales, produciendo aminoácidos libres. Se han aislado y purificado una gran variedad de aminopeptidasas de microorganismos iniciadores, (Tan *et al.*, 1990; Fernández de Palencia *et al.*, 1997a; Fernández-Esplá *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 1997; Williams y Banks, 1997).

En general estas peptidasas presentan una alta especificidad hacia los enlaces peptídicos que contienen prolina, por lo que ejercen un papel fundamental en la proteólisis, al ser la caseína muy rica en este aminoácido.

Los péptidos formados tras la degradación de las proteínas durante su maduración, pueden desarrollar distintos sabores a los quesos (clasificados como agrio, dulce, salado, a pescado y amargo), a pesar de que en muchos casos, más que actuar como compuestos determinantes de un sabor, contribuyen al espectro global del gusto. Además, la contribución de los péptidos al sabor del queso puede ser agradable o desagradable, dependiendo del tipo de péptido que

predomine, y sobre todo de los aminoácidos terminales de su cadena peptídica (Scott, 2002) que pueden ser cambiantes conforme transcurre la maduración.

Por ejemplo, se conoce que pueden aparecer defectos de amargor en los quesos, asociados generalmente con la presencia de polipéptidos con alto contenido en péptidos hidrofóbicos (Vartam y Sutherlan, 1995). Pero también, que los péptidos formados por Leu- Leu -Tyr, Ala-Trp-Phe-Lis-Arg o Phe-Phe-Val-Ala-Pro, poseen todos este sabor. Si se produce la escisión del aminoácido terminal por las enzimas, se eliminaría el sabor, haciendo que un queso, que en una fase es amargo, no lo sea cuando está totalmente maduro.

En muchas circunstancias, la formación de estos péptidos amargos se reconoce fácilmente como un defecto, pero el sabor amargo y astringente, cuando no es muy intenso, puede también considerarse como una contribución positiva a la calidad organoléptica del queso.

Los productos finales de la proteólisis son los aminoácidos libres. Estos aminoácidos pueden sufrir distintas reacciones catabólicas (de descarboxilación, desaminación, transaminación, desulfuración y de hidrólisis de la cadena lateral del aminoácido), para posteriormente, a partir de los aldehídos formados, transformarse en alcoholes o ácidos (Hemme *et al.*, 1982; Fox y Wallace, 1997), que son compuestos, en parte responsables, del flavor del queso.

Además, los aminoácidos libres pueden correlacionarse linealmente con el tiempo de maduración, indicando, hasta cierto punto, el estado de maduración del queso (Fernández-Salguero, 1978a; McSweeney y Fox, 1997; Verdini *et al.*, 2002; Scott, 2002). De hecho, existen estudios en los que se han añadido aminoácidos al queso Cheddar con objeto de acelerar la maduración, mejorando su textura y su flavor (Wallace y Fox, 1997).

Cada uno de los aminoácidos presentes en el queso es responsable de ciertas particularidades que aparecen en el mismo. Así por ejemplo, una elevada cantidad de GABA se relaciona con una baja calidad del queso, mientras que la arginina sería responsable de aportar sabores amargos, o la prolina, el flavor dulce.

El perfil aminoacídico de los quesos durante su maduración puede ofrecer cierta información sobre las características de la leche de partida, los parámetros

tecnológicos de elaboración del queso, los microorganismos originalmente presentes en la leche, el tipo de cultivo iniciador utilizado y las condiciones de maduración. De esta manera el patrón específico de aminoácidos libres puede ser usado para caracterizar e identificar las distintas variedades de queso (Giraudó *et al.*, 2002).

Fox y Wallace (1997) llegaron a la conclusión de que no existía una correlación entre la concentración de aminoácidos libres y el sabor del queso, ya que diferentes tipos de quesos con sabores distintos, presentaban proporciones relativas de aminoácidos muy similares. Sin embargo, Broome *et al.* (1990) consideran que la proporción relativa de aminoácidos respecto del total es un factor importante en el desarrollo del sabor típico del queso. En consecuencia, se podría decir que los aminoácidos no intervienen directamente en el flavor del queso, pero sí lo hacen indirectamente, ya que sobre todo los aminoácidos de cadena ramificada, aromáticos y sulfurados, al ser metabolizados por los microorganismos durante la maduración, generan compuestos volátiles aromáticos, como aldehídos, ácidos, alcoholes, ésteres, y tioles (Engels y Visser, 1996).

Otros compuestos que se pueden producir durante la proteólisis, como consecuencia de descarboxilación de aminoácidos por determinadas especies de bacterias lácticas, son las aminas biógenas como la histamina, tiramina, putrescina y cadaveriana (Ordóñez *et al.*, 1997; Leuschener *et al.*, 1998; Walstra *et al.*, 2001).

Estos compuestos son responsables de cuadros de intoxicación caracterizados por síntomas como el dolor de cabeza o mareos. Su producción es mayor en quesos madurados elaborados con leche cruda, ya que presentan mayores tasas de microorganismos descarboxilantes en comparación con los elaborados a partir de leche pasteurizada.

Para cuantificar los péptidos y los aminoácidos en el queso se van a utilizar técnicas de cromatografía. Las más empleadas son la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y la cromatografía de intercambio iónico, si bien han sido también utilizadas otras como, la cromatografía en papel (Kuchroo y Fox, 1982b), la cromatografía en capa fina sobre gel de sílice (Kuchroo y Fox, 1982b; Edwards y Kosikowski, 1983; Visser *et al.*, 1983a) y cromatografía en columna en distintos medios (Kuchroo y Fox, 1983a).

La RP-HPLC se ha utilizado para el estudio de la proteólisis en quesos, ya que permite mostrar la evolución de los péptidos, así como, la proporción de péptidos hidrófilos y péptidos hidrófobos durante la maduración, encontrando que cada variedad de queso presenta un perfil peptídico típico (González de Llano *et al.*, 1995; Uceda *et al.*, 1994a; Gaya *et al.*, 2003; Poveda *et al.*, 2006). Los péptidos hidrófobos pueden ser responsables del sabor amargo en determinadas variedades cuando se encuentran en proporciones elevadas (Fallico *et al.*, 2005).

Se han realizado multitud de trabajos que estudian la influencia de determinados parámetros empleados en la elaboración del queso, sobre la evolución del perfil peptídico del mismo durante la maduración. Por ejemplo: el empleo de diferentes tipos de coagulantes (Picón *et al.*, 1996; Gaya *et al.*, 1999; O'Mahony *et al.*, 2003; O'Sullivan *et al.*, 2005; Rossano *et al.*, 2005; Pino, 2007; Galán, 2008); el tipo de leche empleada y sus mezclas (Mallatou *et al.*, 2004); los cultivos iniciadores añadidos a la leche (Hynes *et al.*, 2003; Poveda *et al.*, 2004; Hayaloglu *et al.*, 2005); la influencia de la pasteurización de la leche (Lau *et al.*, 1991); la utilización de altas presiones (Trujillo *et al.*, 2002; Saldo *et al.*, 2002) o el método de salado empleado (Pavia *et al.*, 1999). Muchos de estos autores aplicaron análisis estadísticos como el análisis multivariante o Análisis de Componentes Principales (ACP) a los valores de altura o área de los picos obtenidos en el cromatograma para discriminar entre quesos y determinar qué picos contribuyen a dicha discriminación.

De la misma manera, existen numerosos estudios sobre el perfil aminoacídico del queso y su evolución durante la maduración (Verdini *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2003; Poveda *et al.*, 2004; Hayaloglu *et al.*, 2005), a los que también, se puede aplicar el análisis multivariante para discriminar entre quesos atendiendo a los valores de concentración de sus aminoácidos, así como, para determinar que aminoácidos contribuyen a dicha discriminación.

1.4. MICROBIOLOGÍA DEL QUESO

1.4.1. Calidad microbiológica de la leche destinada a la elaboración de queso

La mayoría de los accidentes y defectos del producto final observados en quesería están relacionados con deficiencias de la leche utilizada en su elaboración. Se considera que una leche destinada a la elaboración de queso es de buena calidad cuando contiene baja carga microbiana y escaso o nulo número de gérmenes tecnológicamente indeseables (Tornadijo *et al.*, 1998).

La leche destinada a la elaboración de quesos puede contener microorganismos saprófitos (*Lactobacillus*, *Streptococcus lácticos* y *micrococos*) procedentes de la ubre y de los conductos galactóforos, que hacen que difícilmente los recuentos bajen de los 5×10^3 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, incluso extremando las medidas higiénicas. Por este motivo es importante primar al ganadero, estimulándolo a que mejore o mantenga la calidad microbiológica de la leche desde el ordeño.

A parte de estos microorganismos, la leche puede ser vehículo de otros patógenos para el hombre que pueden ser eliminados por animales con mamitis, como es el caso de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium pyógenes*, o *Pseudomonas uberis* entre otros; o bien enfermos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, o *Escherichia coli enteropatógeno*.

Para evitar esto, el método generalizado que se utiliza en las ganaderías para controlar la proliferación microbiana de la flora mesófila va a ser la refrigeración de la leche antes de procesarla. Pero como esta refrigeración no evita la multiplicación de la flora psicotrofa presente en la leche cruda, varios autores han ido presentando diferentes métodos para evitar esta proliferación microbiana. Así, Espie y Madden (1997) y Ruas-Madiero *et al.* (1998) propusieron el tratamiento de la leche refrigerada con CO₂; mientras que Caro y Mateo (2000) apuntaron someter la leche a una terminación o a la preinoculación con cultivos lácteos productores de peróxidos. Pero sin duda alguna, la pasteurización de la leche de quesería es el método más eficaz para eliminar los microorganismos perjudiciales, así como para controlar la carga microbiana que presenta la leche, ya que hay estudios que determinan que tras este tratamiento los recuentos de aerobios mesófilos totales se pueden reducir en un 90%, y que además, se

destruyen los microorganismos patógenos, como coliformes y la mayoría de las bacterias psicotrofas (Burton, 1996).

Es conocido que los microorganismos autóctonos de la leche, son los principales responsables de las propiedades sensoriales específicas de los diferentes tipos de quesos elaborados con leche cruda (Ballesteros *et al.*, 2006; Ortigosa *et al.*, 2004). A pesar de esto, hoy en día existen muchas variedades de quesos elaborados con leche pasteurizada, ya que este tratamiento va a permitir la estandarización de los procesos de fabricación de quesos y la mejora de su calidad higiénica y sanitaria (Calvo *et al.*, 2007).

Sin embargo, la pasteurización de la leche puede tener repercusión en los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración de los quesos (Albenzio *et al.*, 2001), ya que reduce la microflora autóctona de la leche, cuya actividad enzimática no siempre va a poder ser sustituida de manera satisfactoria por las bacterias presentes en las bacterias del cultivo iniciador. También produce una destrucción parcial de la flora madurativa, y la inactivación total de diversas enzimas como el complejo plasmina/plasminógeno (Benfeldt *et al.*, 1997), catepsina D (Larsen *et al.*, 1996) lipasas lipoproteicas (Andrews *et al.*, 1987) y fosfatasa alcalina (Griffiths, 1986).

Es comúnmente conocido el uso de cultivos iniciadores comerciales en la elaboración de queso de leches pasteurizadas, o incluso en quesos de leche cruda para obtener un mayor grado de control sobre los procesos de fermentación (Herreros *et al.*, 2007). De hecho, las bacterias de los cultivos iniciadores usados en la elaboración de queso tienen como atributos importantes, la actividad proteolítica y la producción de ácido (Ballesteros *et al.*, 2006).

La utilización de estos cultivos en leche pasteurizada, tal y como se ha mencionado con anterioridad, puede influenciar significativamente las propiedades físicas, químicas, bioquímicas y sensoriales de los quesos, sobre todo en relación a los elaborados con leche cruda. De hecho, autores como Fernández-García *et al.*, 2002a; Ortigosa *et al.*, 2001 o Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2000 entre otros, constataron que los quesos elaborados a partir de leche pasteurizada tenían sabores suaves y carecían del sabor característico que presentaban los quesos elaborados con leche cruda. Y, según Powell *et al.* (2002), los quesos elaborados utilizando cultivos iniciadores que contengan una o mas cepas de *Lactococcus*,

normalmente tienen una textura uniforme, debido a la conocida actividad bioquímica de su microflora durante la elaboración y maduración del queso.

1.4.2. Características microbiológicas del queso

Los microorganismos en el queso contribuyen en gran medida al desarrollo de sabores, aromas y características físicas deseables que aparecen principalmente durante su maduración.

Además, son responsables de la presencia de sabores extraños y defectos físicos, así como de la aparición de procesos patológicos en el hombre. La leche y los productos lácteos, como el queso, han sido considerados históricamente alimentos seguros (Kosikowski y Mistry, 1997). No obstante, en los años 80 surgieron un gran número de publicaciones en torno a los problemas ocasionados por *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus spp.* en queso (Johnson *et al.*, 1990), que hicieron imprescindible la implantación del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control en leche y queso (Varnam y Sutherland, 1995; Serrano *et al.*, 1997a; Mauropoulos y Arvanitoyannis, 1999), para asegurar la calidad higiénica de los productos lácteos.

A continuación se describen brevemente los principales grupos bacterianos de relevancia en la calidad y seguridad del queso.

1.4.2.1. Bacterias aerobias mesófilas

La mayoría de los microorganismos patógenos que dan lugar a enfermedades son mesófilos, de ahí que se justifique la utilidad del estudio de los recuentos de microorganismos viables totales en los productos lácteos. Su aparición se corresponde con una contaminación excesiva de la materia prima y/o una elevada proporción de microorganismos termorresistentes, indicativa de tratamientos térmicos insuficientes, recontaminaciones posteriores a los tratamientos térmicos o incrementos de la temperatura durante la conservación de productos lácteos refrigerados.

1.4.2.2. Bacterias ácido-lácticas (BAL)

El grupo de bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico fue definido por Orla-Jensen en 1919, quién reunió diversos géneros caracterizados por su capacidad de fermentar glúcidos produciendo ácido láctico, separándolas de las bacterias productoras de ácido propiónico. Así, quedaron divididas en homolácticas, cuando prácticamente el único producto formado era el ácido láctico y heterolácticas si existían productos de fermentación diferentes, tales como el ácido acético, etanol o anhídrido carbónico. Más tarde se clasificarían las bacterias lácticas en los géneros: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. A la vez, Schleifer *et al.* (1985), sugirieron separar dentro del género *Streptococcus*, los estreptococos lácticos mesófilas, creando el género *Lactococcus* y los estreptococos fecales (o D de Lancefield) como el género *Enterococcus* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1987).

Desde el punto de vista de la tecnología quesera, la flora láctica de interés presente en la leche cruda puede reducirse fundamentalmente a 3 géneros (Branger, 1992): *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*.

Por otra parte, los microorganismos iniciadores en cepas mixtas usados en la elaboración de los quesos pertenecen principalmente al género *Lactobacillus* o *Lactococcus*, de las cuales *L. Lactis* subsp. *lactis* o *L. Lactis* subsp. *cremoris* son las más habituales y utilizadas en la elaboración de quesos (Hayaloglu *et al.*, 2005).

Estos géneros se encuentran clasificados actualmente, según el Manual Bergey, dentro del Orden II "*Lactobacillales*", Familia I *Lactobacillaceae*, Genus I *Lactobacillus* y Orden II "*Lactobacillales*", Familia VI *Streptococcaceae*, Genus II *Lactococcus*.

El papel principal de las BAL es llevar a cabo la acidificación inicial de la leche, produciendo ácido rápidamente (Cogan *et al.*, 1997). A pesar de esto, también contribuyen indirectamente a la sinéresis de la cuajada, a la expulsión del suero, a la solubilización del calcio micelar, o a importantes procesos como la lipólisis o la proteólisis, jugando un papel primordial en la liberación de componentes específicos responsables del desarrollo del flavor de los quesos (Herrerros *et al.*, 2003).

A pesar de que la información acerca de la contribución de las BAL a la lipólisis sea más bien escasa, se conoce que algunas especies de BAL son capaces de hidrolizar la grasa de la leche y algunos triglicéridos (Gobbetti *et al.*, 1997). Estos productos serán el sustrato sobre el que actuarán las lipasas y estererasas de las bacterias lácticas que no pertenecen a los cultivos iniciadores (BALNS), que en mayor o menor medida, participarán en el desarrollo del aroma del queso.

En relación a la contribución de las BAL a la proteólisis de los quesos, ésta se produce porque pueden degradar los péptidos de tamaño grande y medio. De hecho, algunas especies poseen proteinasas asociadas a la pared celular que preferiblemente hidrolizan las caseínas, para que posteriormente, los péptidos libres de estas caseínas sean hidrolizados a pequeños péptidos y aminoácidos libres por las peptidasas del interior de dichas células (Herreros *et al.*, 2003).

En la mayoría de los quesos, los agentes desencadenantes de la acidificación son los *Lactococcus*, que son los microorganismos más abundantes en los 2 ó 3 primeros meses, pero su crecimiento disminuye, mientras que *Lactobacillus* parten de una tasa más baja y su aumento es más lento pero progresivo, y suelen superar a los 6-7 meses a los primeros, debido a que son mucho más resistentes que éstos a pH ácidos.

Lactococcus spp es un género creado para agrupar a los estreptococos lácticos mesófilos, ampliamente utilizado en la industria quesera.

En él se incluyen especies homo y heterofermentativas, que producen ácido L-láctico a partir de glucosa. También pueden producir diacetilo, con lo que se mejoran las características organolépticas de quesos y mantequillas.

Puesto que todos son mesófilos, sólo es adecuado su uso como iniciador en aquellos quesos en los que la temperatura de obtención de la cuajada no sea superior a 40°C. La acción de estos microorganismos es fundamentalmente proteolítica dando lugar a oligopéptidos y aminoácidos libres. La especie de *Lactococcus* más comúnmente aislada en la leche y los quesos fabricados con leche cruda de oveja (Macedo *et al.*, 1995) es el *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que suele aparecer en simbiosis con el *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ya que fermenta varios azúcares, es ligeramente más resistente a la sal (inferiores a 6,5%) y sobrevive a temperaturas más altas, 40°C.

La fermentación inicial en el queso se debe al *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o al *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* o a los dos juntos, siendo el *L. lactis* subsp. *cremoris* el más destacado por distintos autores como desencadenante inicial de la acidificación. Se encuentran con regularidad y en gran número en las primeras etapas de la fabricación, creando el ambiente ácido necesario para el crecimiento de los *Lactobacillus* (Ordóñez, 1987). El 90% de los cultivos iniciadores de tipo mixto contienen *Lactococcus* (Jay, 1994).

La combinación del *L. lactis* y *L. cremoris* es muy usada en el caso de la fabricación de quesos duros. El *L. cremoris* proporciona la forma consistente, el aroma y el sabor adecuado libre de aromas anómalos, mientras que el *L. lactis* permite reducir el tiempo de maduración. Finalmente, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, se caracteriza frente a los dos anteriores en que junto a *Leuconostoc* son las únicas bacterias lácticas capaces de metabolizar el citrato rindiendo diacetilo y acetato, sustancias responsables del aroma de quesos frescos y en menor medida de los madurados (Varnam y Sutherland, 1995).

El *Lactococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*, conocido actualmente como *Streptococcus thermophilus*, no se desarrolla a temperaturas inferiores a los 18°C, aunque pueden crecer hasta los 50°C y sobrevivir a la pasterización a 74°C. Para su destrucción es necesario utilizar temperaturas de 90°C durante veinte segundos. Su velocidad de fermentación es muy alta y su actividad proteolítica suele ser también alta. A menudo se encuentra en simbiosis con los *Lactobacillus* ya que necesita para su desarrollo los productos de hidrólisis de la caseína que le son proporcionados por estos. El *S. thermophilus* proporciona ácido fórmico que estimula el crecimiento en simbiosis del *Lactobacillus bulgaricus* quien crece en segundo lugar, mientras que éste por su actividad proteolítica produce valina que a su vez es un estimulante del primero. Ambos microorganismos crecen proporcionando niveles de ácido mucho más rápidamente.

Leuconostoc spp. son bacterias lácticas de crecimiento muy rápido. Suelen ser predominantes al inicio de la maduración, aunque son reemplazados gradualmente en los quesos por los *Lactobacillus*, mucho más resistentes a la acidez (Mossel y Moreno, 1985). Realizan una fermentación alcohólica con formación de diacetilo y dióxido de carbono y normalmente se utilizan junto a *L. lactis* subsp. *diacetylactis*. Son poco acidificantes y metabolizan el citrato.

1.4.2.3. *Enterococcus* (*Streptococcus* del grupo D de Lancefield)

Enterococcus son bacterias afines a las lácticas. De hecho se encuadraban dentro del género *Streptococcus*, hasta que se separaron los llamados enterococos fecales en su propio género *Enterococcus* o del grupo D de Lancefield.

Son bacterias dotadas de gran actividad proteolítica, lo que a veces confiere al queso algunos defectos en el flavor. La presencia de este grupo en los productos lácteos está considerada como un indicativo de unas condiciones higiénicas insuficientes durante la producción y el procesado de la leche, así como de contaminación fecal (Cuesta *et al.*, 1996). Son microorganismos que crecen en los medios más resistentes, siendo capaces de sobrevivir en amplios rangos de temperatura y de concentraciones salinas y ácidas, por lo que su presencia en queso no es extraña (Sánchez *et al.*, 1995; Macedo *et al.*, 1995). Su poder acidificante, su capacidad para utilizar los citratos y su actividad proteolítica, lipolítica y esterolítica, los convierte en microorganismos muy interesantes tecnológicamente (Menéndez *et al.*, 1999b). No obstante, en los últimos años se han aislado cepas enterotoxigénicas de *Enterococcus* (Cantoni y Bersani, 1988), y se piensa que pueden producir aminas biógenas (Celano *et al.*, 1996). Existen numerosos estudios, en ocasiones contradictorios, acerca de los efectos de la inclusión de *Enterococcus* en cultivos iniciadores en quesería, donde se describen efectos positivos, ausencia de efectos o efectos negativos (Jensen *et al.*, 1975, Vema y Anand 1989; Centeno *et al.*, 1996a y 1999).

1.4.2.4. *Lactobacillus*

En la mayoría de los quesos los agentes desencadenantes de la acidificación son los lactococos lácticos, que son los microorganismos más abundantes en los 2 ó 3 primeros meses, pero su crecimiento disminuye, mientras que *Lactobacillus* parten de una tasa más baja y su aumento es más lento pero progresivo, y suelen superar a los 6-7 meses a los *Lactococcus*, debido a que son mucho más resistentes que estos a pH ácidos.

Los *Lactobacillus* son bacterias lácticas con gran actividad peptidasa. La actividad aminopeptidasa es especialmente alta en *Lactobacillus helveticus*, aunque no existe mucha diferencia entre la actividad caseinolítica y dipeptidasa entre

Lactobacillus helveticus, *L. lactis* spp. y *L. bulgaricus* spp. (Atlan *et al.*, 1989). Se han identificado algunas peptidasas con actividad específica del *L. casei* NCDO 15 y de algunas especies de *L. plantarum*.

La presencia del *Lactobacillus casei* durante toda la maduración de algunos quesos duros y su sistema proteolítico han sugerido un papel importante en el desarrollo del flavor en estos quesos (Broome y Hickey, 1991; El Abboudi *et al.*, 1992; Macedo *et al.*, 1993 y 1995; Bosi *et al.*, 1993).

1.4.2.5. Coliformes

La presencia de coliformes en queso puede conducir a la aparición de fenómenos de hinchazón precoz, por generación de gas consecuencia de una fermentación mixta de la lactosa, que además produce ácido láctico, ácido acético, etanol, CO₂ y H₂.

Representan un grupo de bacterias gram negativas de origen entérico, por lo que se utilizan como indicadores de contaminación fecal.

En general, se puede decir que altos recuentos de este grupo bacteriano representa una manipulación y elaboración del queso inadecuadas.

Los coliformes son los microorganismos menos resistentes a las condiciones adversas, y dado su carácter termolábil se destruyen fácilmente con la pasteurización.

1.4.2.6. Levaduras y Mohos

El crecimiento de levaduras en los alimentos tiene lugar por la existencia de unas condiciones menos favorables para el crecimiento de las bacterias como son el pH ácido, bajas temperaturas de almacenamiento, baja *a_w* y contenidos más o menos elevados de sal y azúcares.

Especies como *Kluiveromyces lactis* y *K. fragilis* fermentan la lactosa con elevada producción de gas, pudiendo ocasionar problemas de “hinchazón precoz”, dando lugar a cuajadas con aberturas y 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 provocando la aparición de una corteza viscosa, de aspecto multicolor y rosáceo.

Los mohos crecen bien a valores de pH de 5,0 e incluso a valores alrededor de 0,75 de aw, de modo que generalmente sustituyen a las bacterias en este tipo de condiciones (ICMSF, 1985). Estos microorganismos pueden deteriorar el alimento, producir gran cantidad de micotoxinas e infecciones y reacciones alérgicas debido a sus antígenos, aunque también se han usado en el campo de la biotecnología, junto con las levaduras en fermentaciones industriales.

En algunos quesos, la presencia de especies como *Penicillium caseicolum*, *P. camembertii*, *P. candidum*, *P. roqueforti* y otros, se considera fundamental en la obtención de variedades con características organolépticas muy peculiares como los quesos de vena azul (maduración interna) y los madurados con mohos superficiales.

La alteración producida por mohos suele ir acompañada de una lipólisis y proteólisis intensa y suele estar producida por los géneros *Penicillium* en un 60%-80% de los casos y *Aspergillus* (Varnam y Sutherland, 1995).

En los quesos, los hongos se multiplican con bastante lentitud, de forma que otros microorganismos pueden deteriorar el queso antes de que el enmohecimiento sea evidente, sin embargo especies como *Penicillium* y *Mucor* son muy comunes en la superficie.

1.5. ANÁLISIS SENSORIAL

La aceptabilidad de un alimento está condicionada por una serie de sensaciones complejas que percibe el consumidor y que en última instancia van a ser las que influyan en la decisión de su elección. De manera que, el que se acepte un determinado alimento va a depender de la sensación de agrado y satisfacción que éste produzca al ser consumido, así como por la capacidad nutricional del mismo (Pagliarini *et al.*, 1991).

La apreciación de los alimentos se produce fundamentalmente a través de la percepción sensorial, a pesar de disponer de procedimientos analíticos instrumentales. Esto se debe a que el análisis físico-químico de un alimento va a aportar información parcial sobre la naturaleza del estímulo que percibe el consumidor, pero no sobre la sensación que éste experimenta al ingerirlo (Costell y Durán, 1981). Por este motivo, los científicos son cada vez más conscientes de la necesidad de potenciar los métodos analíticos basados en dicha apreciación sensorial, que en definitiva son los más adecuados para la valoración final de la calidad de los alimentos.

Es, por tanto, de vital importancia, definir objetivamente la calidad de un producto, siendo las características sensoriales las más importantes y a la vez las más difíciles de evaluar objetivamente.

La evaluación de la calidad sensorial de los alimentos cada día cobra más importancia en la industria alimentaria, dadas las exigencias del mercado competitivo actual y su repercusión en el desarrollo de cualquier empresa o entidad productora. Se le reconocen gran cantidad de aplicaciones como el control de calidad, el desarrollo e investigación de nuevos productos con características organolépticas diferentes, las preferencias del consumidor, etc.

De ahí la importancia del análisis sensorial de los alimentos que en general puede definirse como una disciplina científica usada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de los alimentos que se perciben por los sentidos de la vista, el oído, el olfato, el gusto y el tacto. Es por este motivo que el principal instrumento para realizar la evaluación sensorial van a ser personas perfectamente entrenadas (Chamorro, 2002).

Como se considera que el aparato sensorial humano muestra grados de variación de sensibilidad de persona a persona, que cada mundo individual de sensaciones es muy diferente dependiendo del nivel de desarrollo, y que la sensibilidad puede ser influenciada fácilmente por circunstancias externas o del medio, uno de los mayores problemas asociados al análisis sensorial de los alimentos es conseguir que la respuesta humana sea precisa y reproducible. El control de las condiciones, tanto del entorno y de las muestras a analizar, como de los sujetos participantes en las pruebas sensoriales, facilitará la obtención de unos resultados objetivos.

1.5.1. Aplicación del análisis sensorial en queso

La realización del análisis sensorial de una forma racional va a permitir conocer la preferencia, aceptación y el grado de satisfacción de los consumidores, así como determinar la posible diferencia entre los caracteres sensoriales de los quesos y describir exhaustivamente los distintos descriptores de un queso (Chamorro, 2002). Así pues, la planificación de las pruebas, para conseguir los objetivos anteriores y su elección, constituye una etapa importante para valorar las impresiones recibidas durante la cata.

Las características organolépticas del alimento determinan el atractivo que este ejerce sobre el consumidor. El aspecto del queso (apariencia), su textura y sus características organolépticas estimulan el sentido de la vista, del oído, tacto, olfato y gusto, provocando reacciones más o menos intensas de deseo o rechazo.

Aplicar correctamente este análisis sensorial nos va a permitir obtener información de gran interés, como la caracterización básica y específica de los diferentes tipos de quesos de los ámbitos de las Denominaciones de Origen Protegidas, validación de las técnicas instrumentales para el control de la calidad y las defensas de sus particularidades frente a las imitaciones y, finalmente, la investigación de las preferencias de segmentos de mercado, que incluyen la elección, aceptación y consumo (COST 95, 1999).

La calidad organoléptica de un queso se refiere a los atributos que posee y que son perceptibles por los órganos de los sentidos, pudiendo evaluarse de forma objetiva por métodos instrumentales, o bien directamente a través de métodos sensoriales que emplean al hombre como instrumento de medida.

El conjunto de pruebas utilizadas para la caracterización sensorial del queso se distribuyen en tres grupos: hedónicos, discriminantes y descriptivos. De todas ellas se pueden destacar el Análisis Descriptivo Cuantitativo (Benedito *et al.*, 2000; Brito *et al.*, 2003) en el que hay que establecer exactamente los términos (descriptores) que se van a utilizar para definir cada una de las sensaciones percibidas (Guerra *et al.*, 1999).

Actualmente se pretenden medir las características sensoriales del queso mediante análisis instrumental, por considerarlas más objetivas y reproducibles. Así por ejemplo, se analiza la fracción volátil del queso para definir cualitativa y cuantitativamente el aroma y el olor del mismo, mediante técnicas cromatográficas (Mulet *et al.*, 1999; Paleari *et al.*, 2008; Hayaloglu, 2007; Sheehan *et al.*, 2009; Thierry *et al.*, 1999) o incluso la nariz electrónica (Zannoni, 1995; Barron *et al.*, 2005). El color del queso se puede medir por métodos de reflectancia (Rohm y Jaros, 1997a y b) o por espectrocolorimetría (Frau *et al.*, 1999). Pero sin duda son los parámetros de textura del queso (cohesividad, dureza, elasticidad, o adhesividad entre otros) los más medidos instrumentalmente (Lane *et al.*, 1997; Lobato-Calleros *et al.*, 1997; Ibáñez *et al.*, 1998).

Actualmente, los métodos sensoriales están bien definidos y se puede llegar a considerar que la evaluación sensorial tiende a convertirse en una disciplina científica, en la que principalmente se utilizan los sentidos corporales, pero que también necesitan de medios matemáticos como la estadística, que permitan traducir las percepciones a números o datos cuantificables (Sancho y Bota, 2001). De esta manera, técnicas estadísticas de análisis bivariante (análisis de correlación o de regresión simple) y/o multivariante (análisis de componentes principales, análisis cluster, o discriminante, entre otros), son de gran utilidad a la hora de estudiar las correlaciones que pueden establecerse entre las características sensoriales, físicas y/o químicas del queso.

Cuando interesa detectar diferencias entre muestras, lotes, o tratamientos (Análisis de diferencias significativas), se realizan pruebas cualitativas mediante métodos paramétricos (ANOVA, MANOVA), o pruebas cuantitativas mediante comparaciones múltiples (Pruebas de Duncan, Fisher, Scheffè o Tukey) (Barcina, 1997). Un adecuado uso de la estadística puede permitir obtener relaciones entre las variables instrumentales y sensoriales, que puede contribuir a adaptar el

producto a la demanda del consumidor y establecer sistemas de control de calidad. Cada vez es más frecuente la utilización de técnicas de análisis multivariante en estudios relacionados con el queso (Piggott y Hunter, 1999).

Las características organolépticas de los quesos se forman como consecuencia de una serie de mecanismos, la mayor parte enzimáticos, que transforman los distintos componentes de la cuajada (proteínas y lípidos principalmente) y gracias a los cuales se forman numerosas moléculas olorosas y/o sápidas, cuya proporción y en una cierta medida su naturaleza, varía según la tecnología empleada.

Existen en la bibliografía diversos estudios que relacionan atributos sensoriales con características físico-químicas de los quesos (Pagliarini *et al.*, 1997; Lucey, 2003; Kaminarides *et al.*, 2006; Tejada *et al.*, 2007; Brickley *et al.*, 2008; Rogers *et al.*, 2009; o De Rensis, 2009, entre otros). También, trabajos que analizan el desarrollo de los atributos sensoriales del queso a través del tiempo, mediante el análisis de los componentes principales, (Tejada, 2001; Kraggerud *et al.*, 2008; Pino *et al.*, 2009); y trabajos, en los cuales se establecen diferencias sensoriales entre quesos elaborados con diferentes tipos de cultivo iniciador (Gaborit *et al.*, 2001; Bárcenas *et al.*, 2003 o Pappa *et al.*, 2006); y entre quesos elaborados con leche pasteurizada y leche cruda (Mendia *et al.*, 1999; Ginzinger *et al.*, 1999; Ortigosa *et al.*, 2001).

Por último, otros factores que afectan a las características sensoriales del queso va a ser el tipo de coagulante ensayado. En este sentido existen estudios en quesos de Los Pedroches elaborados con coagulante vegetal y con cuajo animal (Sanjuán, 1992; Vioque, 2002; Tejada *et al.*, 2007), y en queso de oveja “tipo manchego” elaborado con dos tipos de coagulantes (Prados *et al.*, 2007).

CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

2. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS

2.1. PLANTEAMIENTOS

El aumento de la producción de leche de cabra Murciano-Granadina, el auge que en los últimos años ha tenido la producción artesanal de queso en la Región de Murcia, y la reciente obtención de la Denominación de Origen Protegida para el queso de cabra de la Región, justifican el establecimiento de parámetros que definan la calidad del queso de cabra, así como el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías queseras. Todo ello encaminado a la obtención de un producto que resulte homogéneo a la vez que atractivo para el consumidor.

El queso de cabra de Murcia, por su alta calidad y sus excelentes y peculiares características organolépticas, se ha convertido en un producto muy apreciado en el mercado regional y nacional representando el 30% y el 65% de las ventas totales, respectivamente. Gracias al apoyo del Gobierno Regional, también empieza a ser conocido en el extranjero exportándose de forma estable a Estados Unidos, Alemania e Italia fundamentalmente.

A pesar de su relevancia comercial y económica no existía ningún estudio que revelara las características físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales del queso de Murcia. Así, en una amplia revisión bibliográfica de los quesos de cabra españoles, realizada por Franco *et al.* (2001), tan solo se dio una descripción de esta variedad de queso y de su proceso de elaboración, al no existir datos sobre sus características bioquímicas y microbiológicas.

En la literatura científica tan sólo se han detectado diversos trabajos referidos a la caracterización química de la leche de la cabra Murciano-Granadina, a la mejora cualitativa y cuantitativa de la producción lechera por selección del ganado, al efecto del periodo de la lactación sobre la capacidad quesera de la leche de cabra, y a parámetros comerciales y de fabricación del queso de cabra en Murcia (Falagan *et al.*, 2000; Serradilla *et al.*, 2001; López *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 1996).

La aplicación de una adecuada tecnología de fabricación de los quesos o los intentos de mejora de su calidad (uniformidad, aspecto, aceptabilidad general, etc...) exige un profundo conocimiento de sus características físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y organolépticas.

En el empeño de incrementar el éxito comercial del queso de Murcia al Vino, se considera fundamental la diversificación de productos, siempre que se acojan al Reglamento de la Denominación de Origen. Así, sería posible realizar la coagulación de la leche por otras enzimas coagulantes diferentes a la quimosina del cuajo animal, confiriendo al queso unas características sensoriales diferentes y a su vez muy apreciadas.

El coagulante vegetal crudo, obtenido fundamentalmente a partir de flores de cardos de las especies *Cynara cardunculus* y *Cynara humilis*, se ha utilizado con gran éxito como coagulante de la leche en la elaboración de algunas variedades de quesos de oveja: españolas como el queso de los Pedroches (Fernández-Salguero y Sanjuán, 1999), el queso de La Serena (Fernández del Pozo *et al.*, 1988a) o el queso "Torta del Casar" (Pouillet *et al.*, 1991); y portuguesas como el queso Serra (Macedo *et al.*, 1993b) o el Picante (Freitas y Malcata, 1998). Estos quesos además de presentar unas características organolépticas peculiares y muy apreciadas por el consumidor, que se traduce en una textura más fina y mayor untuosidad en la degustación, así como en la fortificación del aroma y sabor, presentan la ventaja de estar elaborados con proteinasas obtenidas de forma natural, pudiendo además ser destinados al mercado de productos vegetarianos.

Con objeto de resolver los problemas sanitarios y tecnológicos que planteaba la utilización de extractos acuosos crudos de las flores del cardo *C. cardunculus*, se desarrolló y patentó un producto liofilizado como coagulante vegetal (Fernández-Salguero *et al.*, 2000). La obtención de este coagulante estandarizado e higiénico permite la elaboración de partidas de queso de leche de oveja más uniformes, mejorando su calidad microbiológica, sin modificar significativamente las características bioquímicas, físico-químicas y sin que se pierdan las excelentes cualidades sensoriales que caracterizan y diferencian a los quesos elaborados con coagulante vegetal (Fernández-Salguero *et al.*, 2002; Tejada y Fernández-Salguero, 2003).

La utilización del coagulante vegetal en la elaboración de quesos de leche de cabra aún no está muy extendida, entre otras causas porque tradicionalmente se le conferían a estos quesos, de forma totalmente injustificada, un intenso y desagradable sabor amargo por la acumulación de péptidos amargos. Este fenómeno tan sólo se ha detectado en quesos de leche de vaca elaborados con coagulante vegetal, donde las ciproquinas actúan de forma más intensa que la quimosina sobre las regiones voluminosas e hidrofóbicas de la α_1 -caseína y la β -caseína hidrolizando todos los enlaces peptídicos y produciendo péptidos potencialmente amargos (Barbosa *et al.*, 1976; Macedo *et al.*, 1993b; Macedo *et al.*, 1996). En quesos elaborados con leche de oveja o cabra, debido a las notables diferencias existentes entre las caseínas de estas especies con respecto a las caseínas de la leche de vaca, y debido a la especificidad de las cinasas, la formación de estos péptidos no es tan patente, no manifestándose tan intensamente este sabor amargo.

Actualmente, el coagulante vegetal se utiliza de forma incipiente, y exitosa, en la elaboración de algunos quesos de cabra del suroeste español, como el queso Los Ibores. No obstante, los estudios realizados para determinar el efecto de estas proteinasas vegetales sobre las características físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales durante la maduración de quesos elaborados con leche de cabra son aún muy escasos. Tan sólo se ha estudiado el efecto del coagulante vegetal fresco sobre las características bioquímicas de una variedad de queso de cabra portugués obteniendo resultados muy alentadores (Sousa y Malcata, 1997a y b). Recientemente, Pino (2007) ha estudiado el efecto de la utilización de dos tipos de coagulantes, uno vegetal liofilizado y un cuajo animal, en la elaboración de una variedad del queso de Los Pedroches elaborado con leche de cabra, pero no existen trabajos similares en otras variedades de quesos de cabra.

Otro de los objetivos de la industria quesera para aumentar sus beneficios (tanto en el ámbito de la tecnología de elaboración, como por las ventajas económicas que conlleva) es acortar el periodo de maduración de los quesos, sin que la calidad de los mismos se vea afectada.

En la Denominación de Origen de algunas variedades de queso españolas (Idiazabal, Manchego, Ibores, Murcia al Vino), se permite la elaboración de

quesos de diferentes tamaños, comercializándose los mas pequeños con un menor tiempo de maduración.

De hecho, la Legislación española (Anónimo, 2006) establece que aquellos quesos con pesos por debajo de 1.5Kg pueden llamarse curados a los 45 días de maduración, mientras que aquellos con pesos superiores necesitarían 105 días.

El Reglamento de la Denominación de Origen del queso de Murcia al Vino permite su comercialización en tiempos diferentes dependiendo de su tamaño. De hecho, esta variedad se está comercializando a partir de los 30 y 45 días de maduración, dependiendo de que se trate de un queso de formato pequeño o grande. No obstante, no se conocen los efectos que este tamaño tiene sobre las características bioquímicas, microbiológicas, ni sensoriales de los mismos.

Hay pocos trabajos que estudien dicho efecto. Hasta el momento, tan sólo se había estudiado el efecto del tamaño del queso sobre las características bioquímicas en el queso Canestrato Pugliese (Santoro y Faccia, 1998; Faccia *et al.*, 2003); un queso muy grande (7Kg) y con elevado tiempo de maduración (240 días), en comparación con la mayoría de variedades de queso existentes.

Para la consolidación en el mercado del queso de cabra de Murcia al Vino se debe potenciar su calidad y las peculiaridades que lo distinguen, para lo cual es fundamental realizar una caracterización tecnológica, bioquímica, microbiológica y sensorial del mismo durante su maduración.

De igual forma, para incrementar su competitividad en el mercado y mantener una demanda estable es imprescindible el desarrollo de nuevos productos cada vez más especializados y diferenciados, como el queso de Murcia al Vino elaborado con coagulante vegetal liofilizado. Por último, es necesario determinar cuál es el efecto del tamaño sobre las características del mismo.

2.2. OBJETIVOS

1. Realizar la caracterización físico-química, bioquímica, microbiológica y sensorial del queso de Murcia al Vino a lo largo de su maduración, con

objeto de extraer conclusiones de aplicación en la mejora de su tecnología de elaboración y calidad.

2. Elaborar el queso de Murcia al Vino utilizando un coagulante vegetal liofilizado, para diversificar y especializar su producción; analizando el efecto de dicho coagulante sobre las características del queso, y, estableciendo las diferencias con respecto al elaborado con cuajo.
3. Analizar el efecto del tamaño de los quesos sobre las características composicionales, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales de los quesos de Murcia al Vino, a lo largo del periodo de maduración, con objeto de adelantar su comercialización.

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ELABORACIÓN DEL QUESO

Se han elaborado 9 lotes de 5 quesos, a partir de tres partidas de leche pasteurizada de cabras de la raza Murciano-Granadina, en una quesería industrial de la región de Murcia (**Figura 3**). Cada partida de leche se dividió en tres lotes, dos de ellos se coagularon de forma tradicional utilizando un cuajo animal (CAP y CAG), y el tercero utilizando un coagulante vegetal liofilizado (CV) obtenido a partir de cardos silvestres de la especie *C. cardunculus* tal y como describen Fernández-Salguero *et al.* (2002).

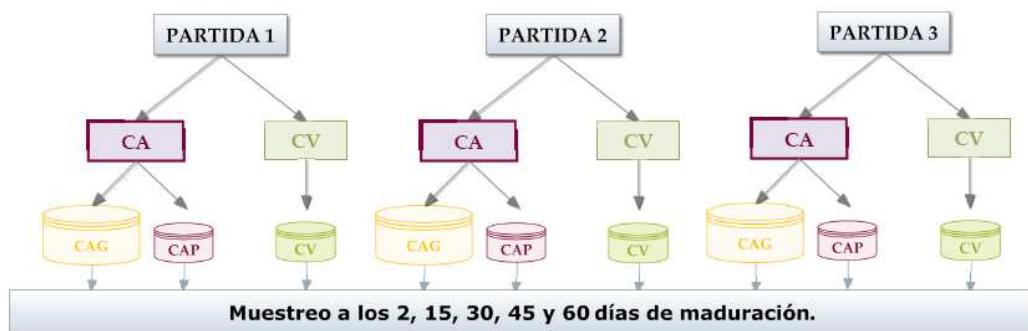


Figura 3. Esquema de elaboración de las distintas partidas de queso

Los quesos se elaboraron en una quesería industrial siguiendo la metodología establecida en la Denominación de Origen del Queso de Murcia al Vino (Anónimo, 2001) procurando idénticas condiciones en todos los lotes (**Figura 4**). Para la elaboración de cada uno de los lotes se utilizó leche pasteurizada a la que se añadieron dos cultivos iniciadores comerciales preincubados en la leche a 32°C (0,25 g del cultivo iniciador STA (BIOSTAR), de bacterias termófilas homofermentativas (*Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*) y 0,09 g del

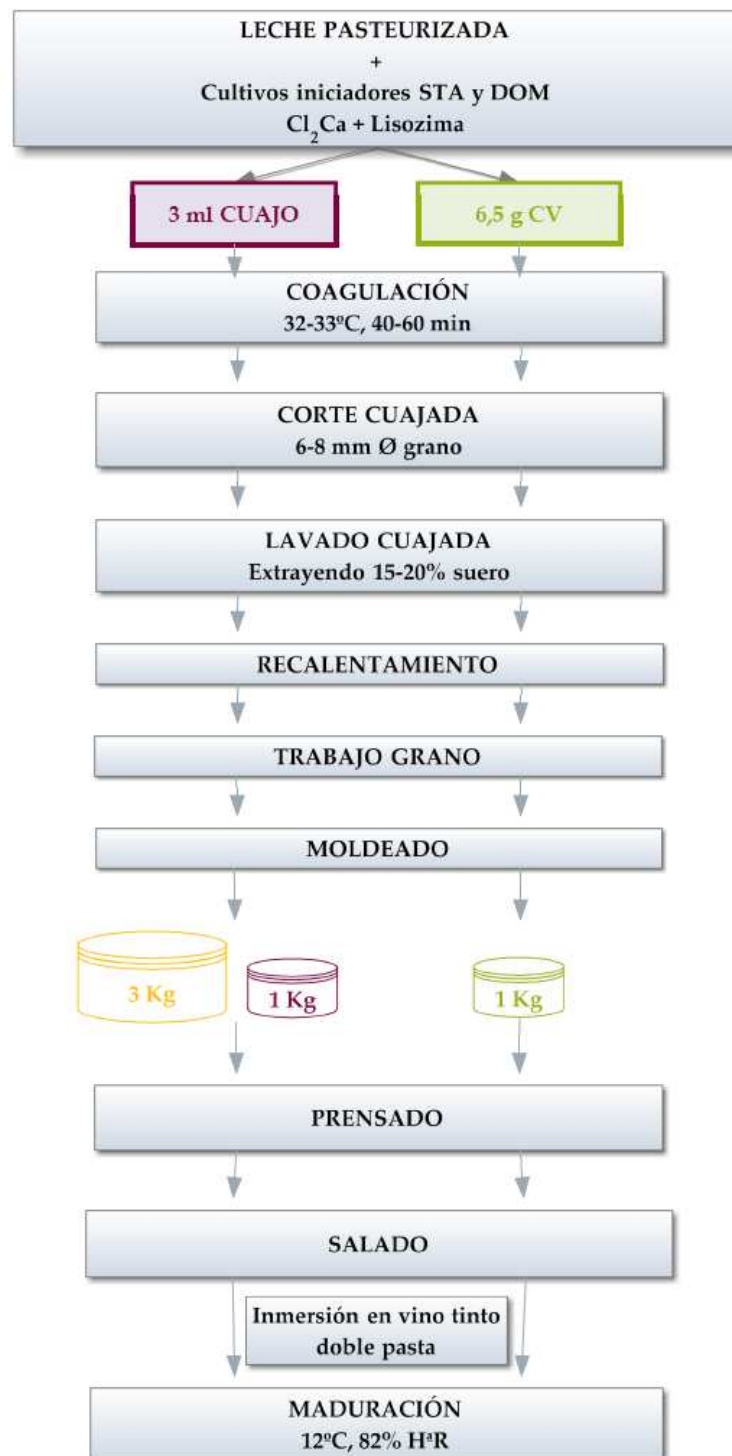


Figura 4. Diagrama de elaboración del Queso de Murcia al Vino

cultivo iniciador DOM de bacterias mesófilas homofermentativas (*Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*). Transcurridos 20 minutos se añadieron 17 ml de Cl_2Ca (36%) y 4 ml de lizozima (clorhidrato de lizozima BIOSTAR), y se realizó el proceso de cuajado entre 32°C y 33°C de temperatura, durante 40-60 minutos. Para elaborar los quesos de cuajo animal se añadieron a 50 l de leche, 3 ml de extracto de cuajo (BIOSTAR 1:50.000, quimosina 93,7%, pepsina 6,3%, Valmojado, Toledo), y para los quesos de coagulante vegetal, se añadió a 50 l de leche, 6,5 g del coagulante vegetal, previamente preparado.

La cantidad de coagulante vegetal utilizada en cada fabricación se determinó con el método de Berridge descrito por la IDF (1987) y viene expresado en unidades coagulantes (UC) que se definen como la cantidad de extracto requerido para coagular 10 ml de leche en 100 s. El CV en polvo utilizado mostró 0,012UC, lo que equivale a 1:22.000 poder (cantidad de leche, en gramos o en mililitros, que 1 gramo o un mililitro de cuajo va a poder coagular a 35°C en 40 minutos).

Una vez obtenida la cuajada fue sometida a cortes sucesivos hasta obtener un diámetro del grano de 6 a 8 mm, y a su lavado, extrayendo de un 15 a un 20% del suero y añadiendo posteriormente agua. Tras el lavado, se procedió a su recalentamiento (incrementando la T^a de 3 a 5°C por encima de la T^a de cuajado), y al trabajo del grano de forma poco intensa, alternando la agitación con el reposo, hasta que este adquirió una consistencia suave.

Finalmente los lotes de cuajada obtenidos con el coagulante vegetal y la mitad de los obtenidos con el cuajo animal, fueron introducidos en moldes cilíndricos lisos de 1 Kg y con paño. Para el moldeo de los otros tres lotes obtenidos con cuajo animal se utilizaron moldes de 3 Kg microperforados.

Los moldes pequeños fueron prensados (1,5 bar durante 1 h, 2,5 bar durante 1 h y 3,5 bar durante 1 h) hasta alcanzar pH 5,4-5,5, mientras que para los grandes se aplicó una presión máxima de 2,5 durante 3 h aproximadamente.

Posteriormente, los quesos grandes fueron salados mediante inmersión en suero refrigerado con una concentración salina de 17° Baumé (25% w/w) durante 20 horas, mientras que los pequeños sólo permanecieron 8 horas. Después, los quesos fueron oreados, para posteriormente ser madurados en cámara con una humedad relativa del 82% y una temperatura de 12°C.

Durante este periodo de maduración, se efectuó el baño de los quesos, sumergiéndolos en vino tinto doble pasta de la Región de Murcia, y se realizaron las prácticas de volteo, limpieza, así como los tratamientos externos correspondientes.

Durante el periodo de maduración, se utilizó una pieza de cada lote para su análisis físico-químico a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. El análisis sensorial tan sólo se realizó en los quesos con 30, 45 y 60 días de maduración.

3.2. OBTENCIÓN DEL COAGULANTE VEGETAL LIOFILIZADO

El coagulante vegetal liofilizado se obtuvo según el procedimiento descrito por Fernández-Salguero *et al.* (2002) y Tejada *et al.* (2003).

Tras macerar flores desecadas de cardos de la especie *C. cardunculus* durante 24 horas a temperatura ambiente, en una relación peso volumen de aproximadamente 1-2/10, se obtuvo un extracto acuoso que, tras reposar durante 24 horas a temperatura ambiente, fue tamizado a través de varios paños con la finalidad de eliminar las impurezas. El filtrado obtenido se distribuyó en placas de vidrio de gran diámetro (contenido aproximado de 60 ml) y se congeló a una temperatura comprendida entre - 25°C y - 35°C.

Una vez congelados los extractos, se introdujeron las bandejas o placas en la cámara de liofilización, para que tuviera lugar el proceso de desecación al vacío mediante sublimación. Las condiciones en las que se llevó a cabo este proceso de liofilización fueron: temperatura del condensador -30°C a -4°C aproximadamente, presión de la cámara 4-13 Pa y tiempo de liofilización 48 horas (Fernández-Salguero *et al.* 2000).

El polvo liofilizado obtenido, al tratarse de un producto higroscópico, se envasó herméticamente y se conservó en congelación hasta su utilización.

3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

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 2 cortes radiales convergentes al centro del queso utilizando un cuchillo de hoja puntiaguda, para conseguir un sector que, después de ser despojado de la corteza superficial no consumible, alcanzara un peso superior a 250 g. Posteriormente, el producto se preparó adecuadamente para la realización del análisis sensorial, tras lo cual, se trituró, obteniéndose las muestras para el análisis físico-químico. Se depositaron en frascos de cierre hermético, de donde se obtuvieron las alícuotas correspondientes a cada tipo de análisis.

En primer lugar se determinaron los parámetros inmediatos (pH, humedad y ácido láctico), y se conservó la muestra en frascos en el interior de un arcón congelador a -25°C , hasta realizar los análisis no inmediatos, así como para disponer de muestras de reserva.

Todos los análisis se realizaron por duplicado, siendo los resultados la media aritmética de los mismos.

3.4. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

Se detalla a continuación el material de laboratorio empleado, diferenciando por un lado el utilizado para el análisis físico-químico, y por otro, el utilizado en el análisis microbiológico. Para técnicas analíticas concretas se detallará el equipo especial utilizado cuando se describan dichas técnicas (Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Electroforesis en Gel de poliacrilamida, Urea-PAGE).

3.4.1 Análisis físico-químico

- Agitador de tubos IKA-MS2 Minishaker.
- Agitador magnético IKA Labortechnik RH Basic.
- Arcón congelador BOSCH.
- Balanza analítica Precisa XB 320M.
- Balanza electrónica de precisión Precisa XT 220.
- Baño termostático JULABO Shaketemp SW 22 con fluctuación térmica de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

- Batería de digestión BÜCHI K-424.
- Unidad de destilación BÜCHI B-324.
- Centrifuga Gerber-Lacta.
- Centrifuga Centrifuge 5810 eppendorf con tacómetro incorporado.
- Centrifuga refrigerada HARAEUS Biofuge stratos.
- Desionizador MILLIPORE ELIX 3UV.
- Espectrofotómetro VARIAN CARY 50bio.
- Estufa para desecación por convección natural memmert.
- Frigorífico BOSCH.
- Homogenizadora ultraturrax IKA T18 basic.
- Horno mufla digitalizado con pirómetro. P-Selecta Selec-Horn.
- Campana de flujo WALDNER KLV3.
- pH-metro digital WTW Inolab.
- Picadora Moulinex 320 MX.
- Liofilizador Thermo Savant ModulyoD Freeze Dryer con bomba Savant VLP200.

Además del material detallado se utilizó gran variedad de material fungible de uso común en laboratorio. Las soluciones acuosas fueron preparadas con agua destilada, salvo en el caso de las preparaciones acuosas utilizadas en HPLC y técnicas específicas como determinación de cloruros en las que se utilizó agua ultra pura. Los productos químicos utilizados fueron en general Sigma-Aldrich y Sharlau de calidad reactivo p.a. o químicamente puros. Para técnicas de HPLC se utilizaron reactivos calidad HPLC.

3.4.2. Análisis microbiológico

El equipo instrumental empleado fue el siguiente:

- Autoclave P-Selecta Autotester-E 30l DRY.
- Campana de flujo laminar Telstar AV-100.

- Cronómetro analógico Dolmy.
- Estufas de cultivo P-Selecta de fluctuación térmica $\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Jarra anaerobiosis
- Homogeneizador IUL Instrument masticator.
- Centrífuga de microtubos eppendorf centrifuge 5415 D.
- Micropipeta METTLER Toledo Volumate.
- Placas calefactoras magnéticas P-Selecta Univeba 400 y P-Selecta Multimatic- 5N.

Además se utilizó numeroso material de vidrio de uso común en laboratorios de microbiología. Los medios de cultivo y suplementos utilizados en los análisis microbiológicos fueron, Merk, Biolife, Panreac y Sigma-Aldrich. Para la preparación de los medios de cultivo se empleó agua destilada y las soluciones acuosas se elaboraron con agua destilada o desionizada, según el caso.

3.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

3.5.1. pH

La determinación potenciométrica del pH se realizó mediante lectura directa, introduciendo el electrodo combinado del pH-metro en un homogeneizado de queso.

3.5.2. Sólidos Totales

Se obtuvieron restando el valor de la humedad a 100. La humedad se determinó por desecación en estufa de aire caliente ($105\pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta peso constante (British Standards Institution, B.S. 770, 1963), siguiendo las indicaciones de la técnica descrita por Kosikowski y Mistry (1997).

3.5.3. Grasa

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

3.5.4. 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 (A.O.A.C., 1990)

3.5.5. Proteína

La cantidad de proteína se determinó multiplicando el nitrógeno total por 6,38 (factor de conversión para productos lácteos) determinado según la técnica de Kjeldahl (A.O.A.C., 1990).

3.5.6. Cloruro sódico

Los cloruros totales se determinaron siguiendo el método de Volhard modificado, según las indicaciones de Kosikowski y Mistry (1997), añadiendo a la muestra, tras su mineralización con ácido nítrico y oxidación simultánea con permanganato potásico, 2 ml de nitrobenzeno con objeto de eliminar las fases de decantación, y titulando con tiocianato potásico utilizando sulfato férrico amónico tetrahidratado en solución saturada.

3.5.7. Acidez titulable

La acidez, expresada como ácido láctico, se cuantificó de acuerdo con las indicaciones de la A.O.A.C. (1990), llevando a cabo una titulación con NaOH 0,1N y utilizando fenolftaleína como indicador.

3.5.8. Determinación del valor calórico

El valor calórico del queso, expresado como energía metabolizable (EM), se determinó aplicando a la composición química obtenida anteriormente, los factores de conversión de 4 Kcal/g proteína, 9 Kcal/g grasa y 3,62 Kcal/g de ácido láctico, según McCance y Widdowson (1993). No se determinó el contenido de

lactosa del queso debido a que ésta desaparece en los primeros días de maduración, y aumenta el producto de su fermentación, el ácido láctico, que se considera que sí puede producir energía metabolizable.

La energía total se determinó mediante calorimetría directa (ETD), cuantificando la energía calorífica liberada tras la combustión de la muestra en condiciones adiabáticas, tal y como describen las instrucciones del equipo, (IKA-Calorimetersystem C4000 Adiabatic).

El valor calórico total (ET) del queso se obtuvo según Kathleen y Escott (2001) multiplicando su composición química por los factores de conversión teóricos del calorímetro: 4,10 Kcal/g; 9,45 Kcal/g y 5,65 Kcal/g para hidratos de carbono, grasa y proteína, respectivamente.

3.5.9. Análisis de la composición mineral

La preparación de la muestra para el análisis de la composición mineral se realizó según el método de Osborne y Voogt (1986) siguiendo el procedimiento descrito por Moreno *et al.* (1994a y b), mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama para el Cu, Fe, Zn, Mn, Ca y Mg, utilizándose la variante de la emisión atómica para el análisis de Na y K. Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 2380, empleándose acetileno como combustible y aire como oxidante.

Para la determinación del fósforo total se aplicó el método de Mattson y Swartling (1954)

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, salvo 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 y para la determinación del Ca y Mg se adicionó cloruro de lantano en una proporción de 0,27%, con el objeto de evitar interferencias aniónicas que pudieran afectar al resultado del análisis.

-Las condiciones instrumentales establecidas para la determinación de cada uno de los elementos minerales considerados se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones instrumentales para espectrofotometría de absorción atómica

Elemento	λ /slip	Nebulizador	Ángulo del mechero	Corrector de fondo
Cu	324,8/07	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 diariamente 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. Las diferentes curvas patrón de microminerales y macrominerales se representan en las **Figuras 5** y **6**, respectivamente, junto con su ecuación y el coeficiente de correlación r^2 obtenido.

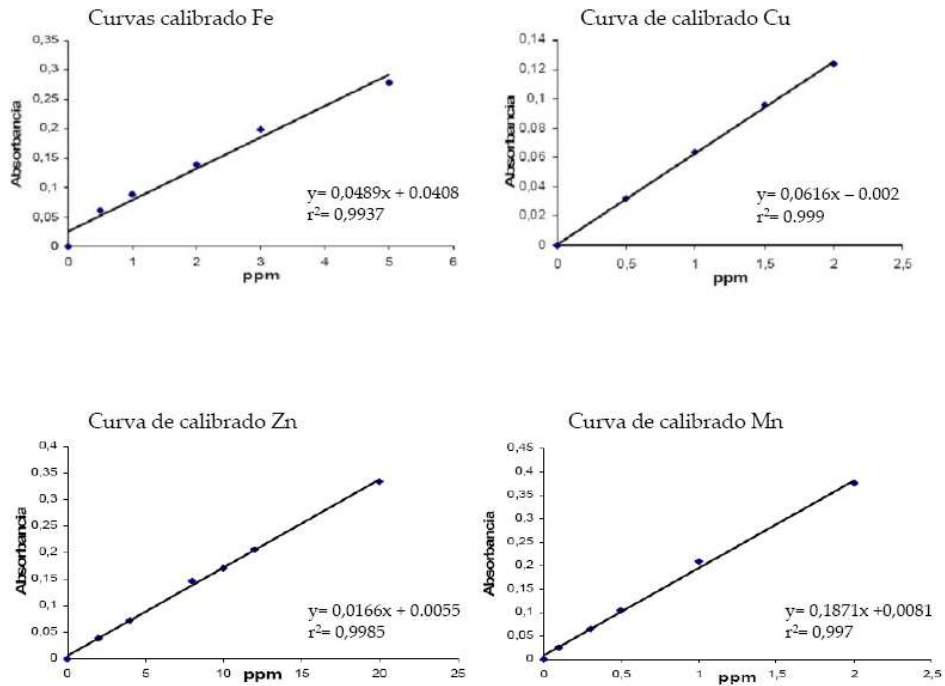


Figura 5. Curvas de calibrado de los microminerales

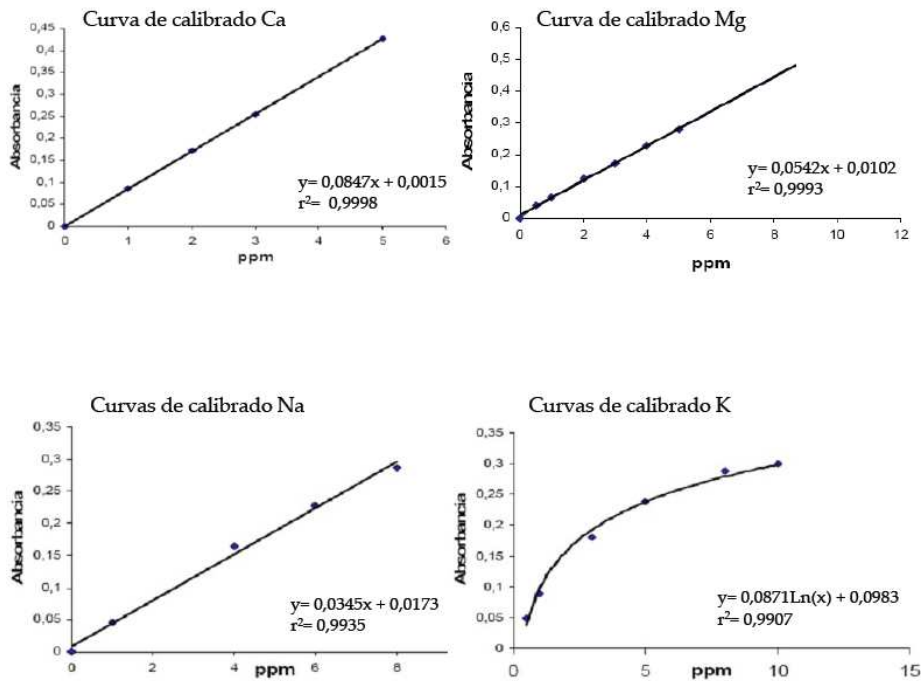


Figura 6. Curvas de calibrado de los macrominerales

3.5.10. Análisis de los ácidos grasos

La extracción de la grasa del queso se realizó según las indicaciones de la Norma de la FIL (1966). Para la preparación de esteres metílicos se siguió el método descrito por Christopherson y Glass (1969), de acuerdo con la Norma UNE 55-118 (1979), y en las condiciones descritas por Fernández-Salguero *et al.* (1986), usando como catalizador hidróxido potásico.

Del sobrenadante obtenido se tomaron las alícuotas que se inyectaron directamente en el cromatógrafo. El área de cada pico y el porcentaje relativo de cada una de ellas fueron proporcionadas directamente por el integrador.

Para la obtención de los AGE se utilizó el método propuesto por Gómez *et al.* (1987). Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Series II, de ionización de llama de hidrógeno (FID), con columna HP-5 Cross-linked 5% Fenil Metil Siloxano de 30 metros de longitud, con un diámetro interno de 0,32mm y un grosor de fase estacionaria de 0,25µm. Como gas portador se utilizó nitrógeno, y helio como gas auxiliar con un flujo total de 30 ml/m. Los gases para la llama fueron hidrógeno (40 ml/m) y aire sintético (415 ml/m). La temperatura del inyector fue de 250°C y la del detector de 275°C; la relación de split 100:1, y con una presión en cabeza de columna de 10psi. La rampa de temperatura aplicada en la columna fue 60°C durante 3 minutos, posteriormente se pasó de 60 a 180°C a una velocidad de 10°C/minuto, para mantenerse a esta temperatura durante 15 minutos. Finalmente se aumentó la temperatura de 180 a 220°C a una velocidad de 20°C/minuto, manteniéndose esta temperatura durante 10 minutos.

3.6. EVALUACIÓN DE LA PROTEOLÍISIS EN EL QUESO

3.6.1. Determinación de las fracciones nitrogenadas

En la **Figura 7** se esquematizan los métodos utilizados para determinar las fracciones nitrogenadas de las muestras de quesos a lo largo de la maduración.

Para la determinación de los compuestos nitrogenados se utilizaron los extractos de queso descritos en el fraccionamiento seguido por Kuchroo y Fox (1982).

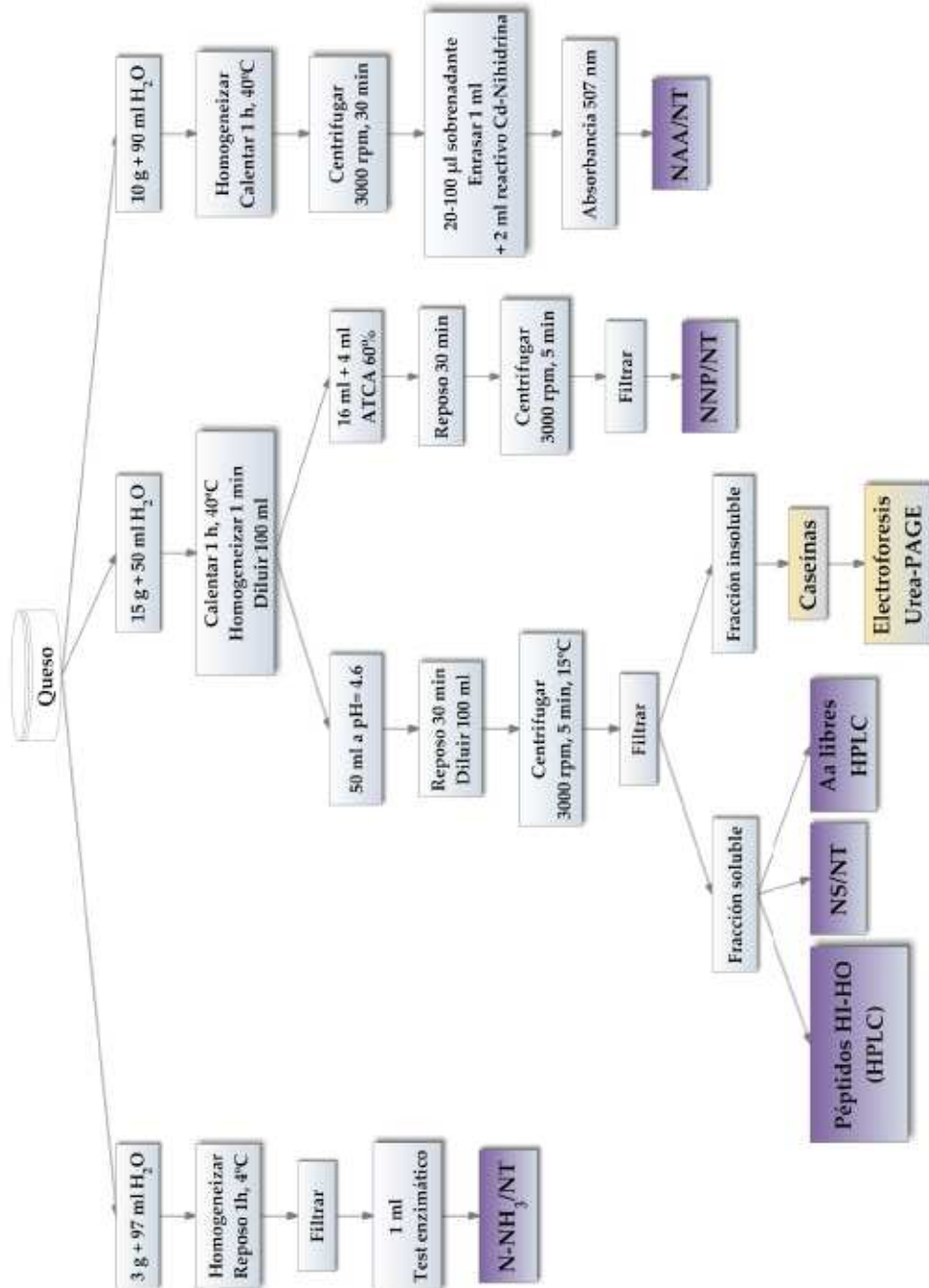


Figura 7. Esquema de los métodos utilizados para determinar las fracciones nitrogenadas de los quesos a lo largo de la maduración

3.6.1.1. *Nitrógeno soluble (NS)*: Se determinó a partir de una suspensión de queso obtenida al homogeneizar 15 g de queso en 50 ml de agua, tras haberla liberado de la fracción insoluble a pH 4,6 (Lenoir, 1963) por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1990).

Reactivos

- Solución de hidróxido sódico 0,1 N.
- Solución de hidróxido sódico al 35%.
- Ácido Sulfúrico 98 %.
- HCl 1 y 0,1 N.
- Rojo de Metilo al 1%.
- Catalizador Kjeldahl, Selenio.

Procedimiento

Se mezclaron 15 g de queso con 50 ml de agua. Tras 1 hora en el baño maría a 40°C, se homogeneizó durante 1 minuto 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. Una vez transcurridos 30 minutos, se diluyó a 100ml con agua destilada 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 hasta conseguir un volumen aproximado de 100 ml. 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, evidenciado por el viraje de color que se produce en el indicador, rojo de metilo. Los resultados se expresaron en gramos de nitrógeno soluble por 100 gramos de nitrógeno total.

3.6.1.2. *Nitrógeno no proteico (NNP)*: El NNP se determinó 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 agua. Transcurridos 30 minutos, se realizó una centrifugación a 3.000 rpm

durante 5 minutos. Tras el filtrado se tomaron 5 ml que fueron sometidos a digestión con 10 ml de ácido sulfúrico y una tableta de catalizador Kjeldahl selenio, determinando la cantidad de nitrógeno mediante la técnica de Kjeldahl (A.O.A.C., 1990) como se ha descrito anteriormente para el NS.

3.6.1.3. *Nitrógeno aminoacídico (NAA)*: El NAA se determinó utilizando el método que Folkertsman y Fox (1992) propusieron para la cuantificación de los aminoácidos libres totales, basándose en la mayor reacción de la cadmio-ninhidrina con los grupos amino de los aminoácidos libres que con los correspondientes a pequeños péptidos (Doi *et al.*, 1981).

Reactivos:

Reactivo de la cadmio-ninhidrina: Se obtuvo mezclando 0,8 g de ninhidrina con 80 ml de etanol absoluto y 10 ml de ácido acético glacial. Finalmente, se añadió 1 g de cloruro de cadmio disuelto en 1 ml de agua destilada. El reactivo fue preparado inmediatamente antes de ser utilizado o conservado en refrigeración a una temperatura de 2-4°C no más de una semana, al abrigo de la luz.

- Etanol al 99,5%.
- Ácido acético glacial.
- Cloruro de cadmio (CdCl₂).

Procedimiento:

A 10 g de queso se le añadieron 90 ml de agua destilada, homogenizándose la mezcla en un omni-mixer a 7.000 rpm durante 1 minuto. La mezcla se mantuvo a 40°C durante 1 hora y se centrifugó durante 30 minutos a 3.000 rpm, obteniéndose un sobrenadante correspondiente al nitrógeno soluble en agua y del cual se tomaron alícuotas de 20 a 100 µl, dependiendo de la concentración de aminoácidos esperada, completándose hasta 1 ml con agua destilada. Se añadieron 2 ml de reactivo de la cadmio-ninhidrina, y 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 evidencia la reacción. Por último, se determinó la concentración de aminoácidos mediante medida espectrofotométrica 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 leucina, expresando los resultados como mg leucina/100 g queso y como NAA/NT respectivamente (**Figura 8**).

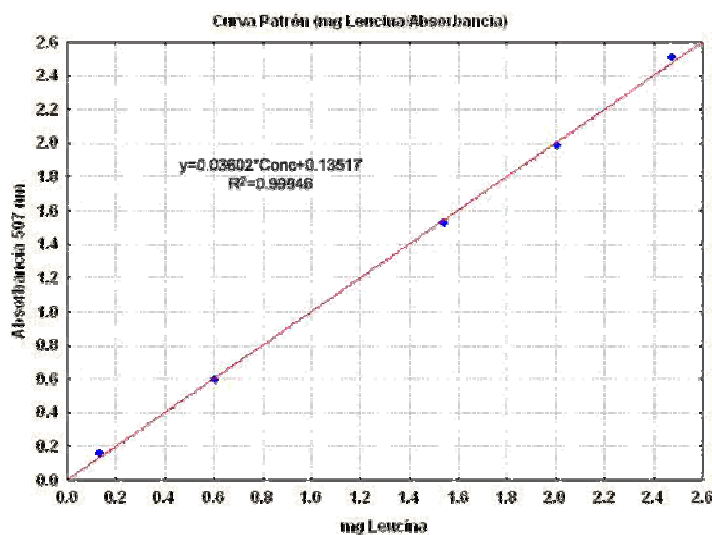


Figura 8. Curva patrón para la determinación de leucina

3.6.1.4. Nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$):

El $N-NH_3$ se determinó mediante método enzimático de Boehringer Mannheim, siguiendo el procedimiento descrito por Rohm y Jaros (1997a).

En presencia de glutamato deshidrogenasa (GIDH) y nicotinamin adenin dinucleótido reducido (NADH), el amoníaco 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 amoníaco. El NADH se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm.

Procedimiento:

Se homogeneizaron 3 g de queso en 97 ml de agua destilada a 9.500 rpm, mediante Omni-mixer, durante 1 minuto. El homogeneizado se filtró tras 1 hora de almacenamiento en refrigeración (Rohm y Jaros, 1997a). Se añadió 1 ml de la solución 1 junto con una tableta de NADH en una cubeta para espectrofotómetro,

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. Se midió la absorbancia de la solución después de 5 minutos a 20-25°C (A1). Se adicionaron 0,020 ml de la solución 2 (GIDH) con la finalidad de provocar la reacción. Tras mezclar, y esperar 20 minutos, se leyó la absorbancia de la solución A2. Los cálculos se realizaron según la siguiente expresión:

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

dónde E es el coeficiente de extinción del NADH340, (6,3); d es el camino óptico (1 cm); v es el volumen de muestra (0,1), V= 3,020 , peso molecular (pm 17,03) y $\Delta A = (A_1 - A_2)$ muestra - (A1-A2) blanco. El resultado está expresado en gramos amoníaco/ litro de solución de la muestra. Debido a que sólo se detectó una relación lineal entre 0,2 y 8 µg de amoníaco, la cantidad de éste en la cubeta no debe sobrepasar estos límites, de no ser así, habría que diluir la muestra. La concentración de amoníaco será muy alta si A1-A2 es mayor que 0,500 (365 nm).

3.6.1.5. El cálculo del *nitrógeno de las proteínas* (NP), *nitrógeno de las caseínas* (NC), *nitrógeno de los polipéptidos* (Npp), y *nitrógeno de los péptidos* (Np), se hizo siguiendo el planteamiento de Lenoir (1963) y Fernández-Salguero (1978), calculando estas fracciones por diferencia de los datos obtenidos experimentalmente en las fracciones descritas anteriormente (NS, NNP, NAA y N-NH₃), mediante las expresiones siguientes:

$$NP = 100 - NNP$$

$$NC = 100 - NS$$

$$Npp = NS - NNP$$

$$Np = NNP - (NAA + N-NH_3)$$

3.6.2. Determinación de péptidos hidrófobos e hidrófilos

Los péptidos contenidos en el extracto que se obtiene de la fracción nitrogenada soluble en agua, se separaron en un HPLC marca VWR (Darmstadt, Alemania), en fase reversa, siguiendo el método de González de Llano (1995).

Después del análisis se integró el área de los péptidos excluyendo los aminoácidos. Los péptidos separados entre 10 y 35 min se consideraron hidrófilos y los separados entre los minutos 35 al 80 fueron considerados hidrófobos. La cantidad de péptidos hidrófilos e hidrófobos se expresan como unidades cromatográficas por gramo de materia seca.

Procedimiento:

A 15 g de queso se le añadieron 50 ml de agua y se mantuvieron a 40°C durante 1 hora. Posteriormente, se homogeneizó en ultra-turrax durante 1 minuto llevándose hasta 100 ml con agua ultra pura. De este homogeneizado se tomaron 50 ml ajustándose el pH a 4,6.

Se dejó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se filtró y se almacenó el sobrenadante en botes de cierre hermético a -80°C, donde permanecieron hasta su análisis.

La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna Scharlau Nucleosil column (250 × 4.6 mm), situada en un horno modelo Labchrom L-7350 a 40°C. Seguidamente se inyectaron 20 µl de muestra, previamente filtrados con filtros millipore de 0,45 µm de tamaño de poro, con un autoinyector modelo ELITE Labchrom L-2200.

Los solventes utilizados para la separación fueron: solvente A: 0,05% de ácido trifluoracético (TFA) en agua, y solvente B: 0,035% de TFA en acetonitrilo, agua 90:10 (v:v).

El método se configuró como un gradiente lineal en el que se pasó de un 3% de solvente B y 97% de solvente A, hasta 50% de solvente B y 50% de solvente A, en un tiempo de 38 minutos.

La detección se realizó con un detector Diode array modelo Labchrom L-7455, a una longitud de onda de 214 nm, en la cual los péptidos presentan mayor absorbancia.

Una vez efectuada la separación cromatográfica, se determinó el área de integración de los péptidos en base al tiempo de retención de los mismos. Con el sistema de solventes empleado los péptidos hidrófilos aparecen en primer lugar y posteriormente los péptidos hidrófobos. El primer grupo, o porción de péptidos

hidrófilos, lo integraron aquellos con tiempos de retención comprendidos entre 10 minutos y 35 minutos. El segundo grupo, el de péptidos hidrófobos, lo integraron aquellos con tiempos de retención comprendidos entre 35 minutos y 80 minutos, tiempo que se corresponde con la finalización de la elución de péptidos.

La relación péptidos hidrófobos/hidrófilos se obtuvo dividiendo el área total de los picos de la fracción de péptidos hidrófobos entre el área total de los picos integrados en la fracción de péptidos hidrófilos.

3.6.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Este análisis electroforético se llevó a cabo sobre 10 mg de extractos de queso pH 4,6-insoluble desecados en polvo. La electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%C, 4%T, pH 8,9) se realizó usando mini-Protean 3 electrophoresis (Bio-Rad Laboratories Ltd., Watford, Herts, UK) de acuerdo al método de Andrews (1983) con las modificaciones descritas por Shalabi y Fox (1987), siendo los geles coloreados por el método de Blaskely y Boezi (1977).

Preparación de las muestras

Las fracciones insolubles a pH 4,6 del queso fueron preparadas siguiendo el método de Kuchroo y Fox (1982a) modificado por Sousa y McSweeney (2001). Tras congelar a -20°C , y liofilizar, se pesaron 10 mg del liofilizado disolviéndose en una solución compuesta por 0,75 g Tris, 49 g urea, 0,4 ml de HCl al 37%, 0,7 ml de 2-mercaptoetanol y 0,15 g de azul de bromofenol disuelto y enrasado en 100 ml con H_2O .

Preparación de los geles

Antes de la preparación de la unidad electroforética se prepararon dos tampones, un tampón gel de apilamiento, compuesto por 4,15 g Tris-hidroximetil-metilamina, 150 g urea, 2,2 ml de HCl al 37%, disuelto y enrasado a 500 ml de agua y pH ajustado a 7,6 con HCl 2N y un tampón gel de separación, compuesto por 32,15 g Tris-hidroximetil-metilamina, 192,85 ml HCl al 37% disuelto y enrasado a 500 ml de H_2O y ajustado a pH 8,9 con HCl 2N.

El gel de separación se obtuvo mezclando 52,5 ml del tampón gel de separación, 22,5 ml de solución de acrilamida y 0,375 g N, N, N',N', mutilen

bisacrilamida. Posteriormente se filtro a través de papel de filtro Whatman N° 113 y se le añadieron 37,5 µl de N, N, N', N', tetrametileten diamina (TEMED).

Previamente a su vertido en la unidad electroforética, se le añadieron 282 µl de persulfato amónico al 10% p/v en agua para iniciar la polimerización. El gel todavía líquido fue vertido entre las dos placas que sirven de soporte para que resultara un gel con un grosor de 1 mm, una vez que tuvo lugar la polimerización completa a los 40-60 minutos.

La preparación del gel de apilamiento se realizó a partir de 45 ml de tampón gel de apilamiento, 5 ml de solución acrilamida y 0,1g N, N', N', metilbisacrilamida. Mas tarde se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 113 y se le añadieron 25 µl de TEMED. Antes de ser vertido en la unidad electroforética, se le añadió 300 µl de persulfato amónico al 10% p/v en agua para iniciar la polimerización. A continuación, se colocó una estructura con forma de peine que delimita los pocillos donde se depositó la muestra. Una vez completada la polimerización a los 60 minutos fue retirado el peine.

Proceso de separación de las caseínas

Se depositaron 8 µl de muestra dentro de cada pocillo. El sistema tampón de los electrodos utilizado está formado por 15 g TRIS y 73 g de glicina disueltos y enrasados a 5 l con agua destilada. Una vez que los geles fueron sometidos a una carrera inicial durante 30-40 minutos a 280 V, se procedió a realizar la carrera, a través del gel de apilamiento, durante 4-5 horas a 300 V. Durante la operación el sistema se refrigeró mediante un sistema de recirculación de agua fría.

Sistema de revelado

Como sistema de revelado de las bandas electroforéticas se utilizó una solución de azul brillante Coomassie G250 (Blaskesley y Boezi, 1977) operando como se describe a continuación: 1 l de ácido sulfúrico 1M fue añadido a 1 l de una solución acuosa de azul Coomassie al 0,2% y mezclado durante toda una noche. La solución fue entonces filtrada a través de filtros de papel Whatman N° 1, de forma que 9 volúmenes del filtrado se mezclaron con 1 volumen de hidróxido potásico 10 M. Se añadió una cantidad tal de ácido tricloroacético (ATC) suficiente para obtener una solución final al 12% de ATC.

Los geles se mantuvieron en inmersión en la solución de tinte durante toda la noche, procediéndose a su desteñido final con agua destilada hasta que el fondo se vio limpio.

Cuantificación de las bandas

La cuantificación de las bandas se realizó con el programa Master TotalLab v.1.0 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala), que permite el análisis de imágenes digitalizadas de geles electroforéticos.

3.6.4. Determinación de aminoácidos libres

Los aminoácidos libres se identificaron y cuantificaron mediante derivatización y análisis por RP-HPLC, siguiendo el procedimiento utilizado por Pino (2007). Se tomaron 10 ml del extracto obtenido para la determinación del NS en agua (**Figura 7**), y se mezclaron con 2 ml de ácido sulfosalicílico al 15% (ASS), usado como agente precipitante previo al análisis de aminoácidos obteniendo una concentración final de un 2,5% p/v de ASS. El pH del sobrenadante obtenido tras una centrifugación se ajustó a un valor de 4.0 y se almacenó en un recipiente adecuado a -80°C hasta la realización del análisis cromatográfico.

La derivatización en precolumna fue realizada con o-phthaldialdehído (OPA) como proponen Jones *et al.* (1981).

La separación cromatográfica se llevó a cabo a 30°C utilizando para ello una columna C18 ODS Ultrasphere (250 x 4,6 mm y tamaño de partícula 5 µm) (Beckman Instruments, Inc, Fullerton, CA, USA). La configuración del fluorímetro fue: 16 µl flujo de célula, excitación en rango de 305 a 375 nm, emisión entre 430 y 470 nm, tiempo constante de 0,5 segundos y una sensibilidad de 0,02 unidades. El gradiente de elución usado para la separación de los derivados del OPA fue: solvente A: tetrahidrofurano:metanol:acetato sódico 0,05 M y pH 5,9 (1:19:80), y solvente B: metanol:acetato sódico 0,05 M y pH 5,9 (80:20). El programa de gradientes se definió de la forma siguiente: composición inicial 0%B, paso isocrático a 0% de B durante 1 minuto, paso lineal hasta 14% de B en 5 minutos, paso isocrático de 14% de B durante 5 minutos, paso lineal hasta 50% de B en 5 minutos, paso isocrático de 50% de B durante 4 minutos, paso lineal hasta 100%

de B en 12 minutos, paso isocrático de 100% B durante 8 minutos. El flujo de operación se fijó en 1,2 ml/minuto.

La cuantificación de los aminoácidos libres se realizó mediante la utilización de patrones externos. Se prepararon soluciones de distintas concentraciones, comprendidas entre 0,2 mg/l y 37 mg/l, de los siguientes aminoácidos: ácido aspártico (Asp), serina (Ser), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), lisina (Lis), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe), glutamina (Gln), asparagina (Asn), triptófano (Trp), ácido gama-aminobutírico (GABA), taurina (Tau) y ornitina (Orn), que fueron inyectadas para examinar la relación lineal entre cantidad de aminoácido y área de los picos obtenidos. Con estas soluciones se procedió de la misma manera que con las muestras de queso y se prepararon las curvas de calibración para la cuantificación de los mismos.

Validación del método RP-HPLC para aminoácidos libres.

Los 21 aminoácidos patrones inyectados fueron resueltos en 45 minutos. Se inyectaron cantidades crecientes de aminoácidos estándares (entre 0,2 mg/L y 40 mg/L), para examinar la relación lineal entre las cantidades de aminoácidos estándares y el área de los picos obtenidos. El rango lineal, el coeficiente de determinación, repetitividad y los parámetros de validación del método analítico, incluyendo la sensibilidad analítica, el límite de detección y límite de cuantificación obtenido, se muestran en la **Tabla 4**. En general, los resultados de los parámetros de validación fueron fiables y satisfactorios.

Aminoácido	LD (10 mg/L)	LQ (10 mg/L)	γ (10 ⁴ L/mg)	Rango lineal (10mg/L)	Repetibilidad (%)	R2
Asp	0,27	0,83	2,69	0,83-38	3,3	0,99
Asn	0,12	0,37	1,7	0,37-39	2	0,99
Glu	0,15	0,46	2,55	146-40	4,5	0,99
His	0,23	0,71	1,28	0,71-39	6,2	0,99
Ser	1,04	3,15	1,52	3,71-37	5,8	0,99
Gln	0,62	1,88	1,91	1,88-39	7,6	0,99
Arg	0,47	1,43	1,51	1,43-39	4,9	0,99
Gly	0,61	1,84	0,94	1,84-38	8	0,99
Thr	0,13	0,4	1,19	0,40-40	4,1	0,99
Tau	0,98	2,98	1,07	2,98-41	5,1	0,99
Ala	0,29	0,88	0,52	0,88-39	8,9	0,99
Tyr	0,51	1,54	1,32	1,54-39	3,6	0,99
Gaba	0,34	1,04	0,96	1,04-38	7,1	0,99
Trp	0,44	1,33	0,74	1,33-39	13	0,99
Met	0,42	1,28	1,5	1,28-38	7,3	0,99
Phe	0,47	1,41	1,77	1,41-39	5,2	0,99
Val	1,18	3,58	1,35	3,58-38	6,4	0,99
Leu	0,41	1,25	0,82	1,25-40	5,9	0,99
Ile	0,57	1,71	1,87	1,71-38	5	0,99
Orn	0,67	2,02	0,77	2,02-40	5,8	0,99
Lys	0,43	1,32	0,99	1,32-40	8	0,99

Parámetros de validación para una curva de calibrado realizada con nueve concentraciones diferentes y analizada por triplicado

Tabla 4. Validación de la determinación simultánea de aminoácidos en una curva de calibrado

La repetibilidad es un parámetro que contribuye a estimar la precisión del método. La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea (Quattrochi *et al.*, 1992). La repetibilidad se estimó mediante 9 determinaciones de concentraciones diferentes con tres repeticiones de cada una. La linealidad de un método analítico cuantifica a la proporcionalidad entre la concentración de un analito y su respuesta. Es recomendable la realización de un mínimo de 5 determinaciones con concentraciones diferentes para establecer linealidad. El coeficiente de correlación de la muestra (r) es una estimación de la asociación lineal que existe entre dos variables x e y (Walpole y Myers, 1991). El coeficiente de correlación se utilizó para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto:

$$y = a + bx$$

dónde “y” es la señal medida, “a” es la ordenada al origen, “b” es la pendiente y “x” la concentración del analito en estudio. Para cada aminoácido se obtuvo una curva de calibración después de inyectar y analizar 9 concentraciones diferentes por triplicado.

Para cada curva se aplicó el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados y se obtuvieron los parámetros de la ecuación (1).

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. La sensibilidad de la técnica se estimó calculando los siguientes parámetros: sensibilidad analítica, límite de detección y límite de cuantificación.

La sensibilidad analítica es una relación entre la pendiente de la curva de calibración y la desviación estándar de la medida. La sensibilidad analítica (γ) se calculó según Arancibia y Escandar (1999):

$$\gamma = \frac{b}{S_R}$$

siendo S_R la desviación estándar de los residuos y “b” la pendiente de la recta. El límite de detección (LD), se concreta como la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración. El LD se calculó según lo propuesto por la Food and Drug Administration (FDA, 1996):

$$LD = 3.3 \left(\frac{S_R^{bc}}{b} \right)$$

donde “ S_R^{bc} ” corresponde a la desviación estándar de los residuos correspondientes a una curva de calibrado en la zona de bajas concentraciones del

analito en estudio. El límite de cuantificación (LQ) corresponde a la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración. Al igual que el LD, el LQ se calculó según lo propuesto por la Food and Drug Administration (FDA, 1996):

$$LQ = 10 \left(\frac{S_R^{bc}}{b} \right)$$

Se denomina rango lineal al intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar la medida por interpolación en una curva estándar (Quattrochi *et al.*, 1992). El rango lineal se expresó como el intervalo comprendido entre el LQ y la máxima concentración del analito en estudio para la cual se probó el método.

En la **Figura 9** se muestra un cromatograma de los patrones de aminoácidos necesarios para realizar la curva de calibrado.

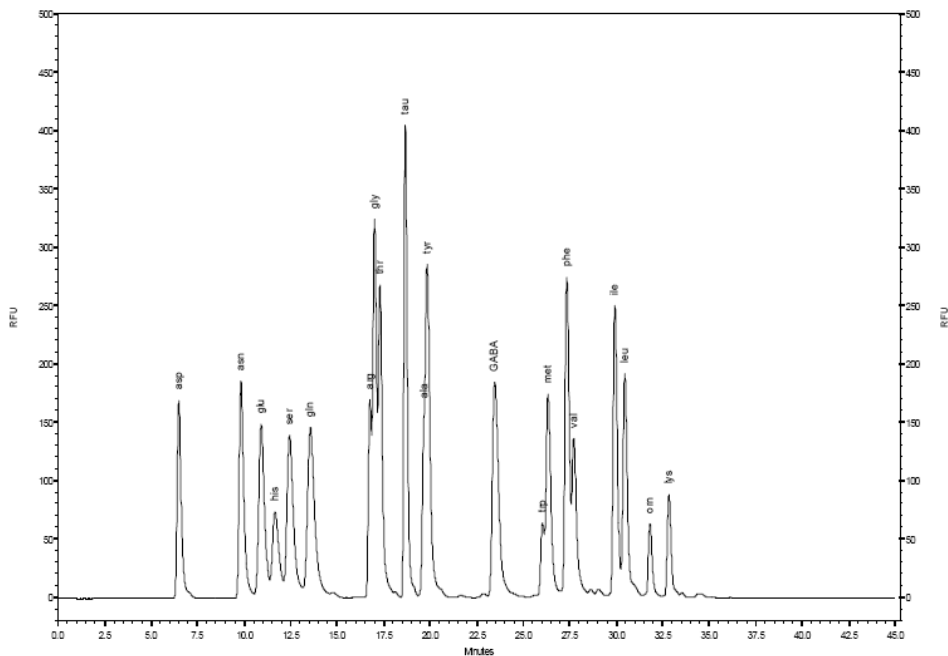


Figura 9. Cromatograma RP-HPLC de los patrones para la determinación simultánea de los aminoácidos necesarios para la elaboración de curvas de calibrado

3.7. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

3.7.1. Recogida de muestras

La toma de muestras de leche para los análisis microbiológicos se llevó a cabo en el mismo momento de la elaboración de los quesos.

El día de la elaboración de los quesos se tomaron por duplicado muestras de leche fresca sin pasteurizar y muestras de leche pasteurizada. Dichas muestras fueron recogidas en condiciones asépticas, en frascos estériles, y mantenidas en refrigeración hasta su análisis en el mismo día de la recogida.

La toma de muestras de los quesos para los análisis microbiológicos fue realizada a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración, según la metodología descrita por Beerens y Luquet (1990), para quesos de pasta semi-dura siguiendo el procedimiento de Sánchez (1999) y adaptada por Vioque *et al.* (2000).

3.7.2. Preparación de diluciones decimales

10 ml de leche o 10g de queso, (recogidos según los procedimientos descritos anteriormente y en los días también mencionados), fueron homogeneizados, con 90 ml de una solución de citrato sódico al 2% (p/v) a una temperatura de 45°C o con 90 ml de caldo de peptona para los análisis a realizar sobre petrifilm.

A partir de esta primera dilución decimal, se prepararon las dos series de diluciones decimales, una con caldo de peptona, para la determinación en petrifilm (coliformes totales, levaduras y mohos) y otra con la solución de citrato para el resto de recuentos.

3.7.3. Determinaciones microbiológicas

3.7.3.1. Crecimiento en PCA

Siguiendo las recomendaciones de la APHA (1985) se realizó una siembra en masa depositando 1 ml de la dilución correspondiente, en placas de Petri estériles a las que se adicionó aproximadamente 15 ml de agar para recuento en placa (PCA, Merck ref.1.05463), licuado y mantenido a 45-50°C, y agitándose con

movimientos circulares y de vaivén consiguiendo que el inóculo se distribuyera en el agar de forma homogénea. La incubación se llevó a cabo a 30°C durante 72 horas, realizándose a continuación el recuento de colonias visibles, para las placas que tenían entre 30 y 300 colonias. Los resultados se expresaron en forma de log ufc/ml o g.

3.7.3.2. *PetrifilmTM para Coliformes totales*

Se utilizaron placas 3MTM PetrifilmTM para recuento de Coliformes, a los que se le inoculó 1 ml de las diluciones de queso correspondientes realizadas con caldo de peptona, Panreac ref.413795.1210. Se incubaron e interpretaron las placas según métodos aprobados por la AFNOR ISO 4832 (3M-01/2-09/89 A).

3.7.3.3. *Crecimiento en agar KF*

Se realizó el recuento después de sembrar 0,1 ml de la dilución correspondiente en superficie sobre agar KF-Streptokokken-Agar (Basis), Merck ref.1.10707, bien seca. El inóculo se extendió con ayuda de un asa acodada estéril, incubando a 37°C durante 24-48 horas. Durante la preparación del medio de cultivo se le añadió 10 ml/litro de una solución al 1% de TTC (2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro, Merck).

3.7.3.4. *Crecimiento en agar Rogosa*

De acuerdo a las recomendaciones de la APHA (1985), el recuento se llevó a cabo tras la siembra e incubación de 1 ml de las diluciones de muestra correspondientes en agar Rogosa SL, (Panreac ref.413800 1210), a 30°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis.

3.7.3.5. *Crecimiento en agar M₁₇*

El recuento se realizó tras la siembra de 1 ml en agar M₁₇, Biolife (code 401719), durante 72 horas a 30°C, de acuerdo a las recomendaciones de la APHA (1985)

3.7.3.6. Crecimiento en agar MSE

Tal y como establecen las recomendaciones de la APHA (1985), se realizó la siembra en superficie de 0,1ml del inóculo en agar MSE, Biolife (code 401738), y su incubación a 25°C durante 72 horas.

3.7.3.7. Petrifilm™ para Levaduras

El recuento de levaduras se llevó a cabo con placas 3MTM Petrifilm™ para recuento selectivo de Levaduras, colocando 1 ml de la dilución correspondiente de muestra e incubando durante 5 días a 20-25°C (método AOAC® Official Method SM 997.02).

3.8. EVALUACIÓN DE LOS ATRIBUTOS SENSORIALES

3.8.1. Análisis descriptivo

Se realizó un análisis sensorial de cada uno de los quesos de los 3 lotes a los 30, 45 y 60 días de maduración mediante un panel de catadores conformado por 10 personas, siguiendo la metodología descrita en Tejada *et al.* (2000). Las sesiones de evaluación sensorial se llevaron a cabo en salas de catas dotadas de un área de prueba con iluminación adecuada y exenta de olores, y un área de preparación de muestras adecuadamente separada de la anterior.

En esta última área se prepararon las muestras, mediante los equipos y utensilios adecuados, y se presentaron de acuerdo a los hábitos de consumo, en pequeñas piezas triangulares, de escaso grosor, codificadas con números de tres cifras para evitar sesgos de preferencias individuales, y dispuestas en un orden determinado para evitar sesgos de posición. Se colocaron en el área de prueba en bandejas de plástico, las cuales se introdujeron junto a un cuestionario de cata.

Para valorar las características sensoriales se utilizó una prueba descriptiva, de calificación con escalas no estructuradas de aproximadamente 15 cm, (Amerine *et al.*, 1965). Y para la interpretación de los resultados de calificaciones se requirió de 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 (**Figura 10**), se recogieron 3 atributos de olor (intensidad, ácido y picante), 4 de apariencia interna (color y tamaño, número y distribución de ojos), 3 de textura (dureza, firmeza y cremosidad) y 5 de sabor (intensidad, picante, ácido, salado y amargo). Además, se evaluó la aceptación general del olor, apariencia interna, textura y sabor, así como la aceptación general del queso.

NOMBRE	FECHA	MUESTRA
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:		
A) APARIENCIA INTERNA		
Color <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
Núm. ojos <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy numerosos 10</i>
Tam. ojos <i>0 muy pequeños</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy grandes 10</i>
Dist. ojos <i>0 muy irregular</i>	<i>5 normal</i>	<i>uniforme por toda la pasta 10</i>
Aceptación <i>0 defectuoso</i>	<i>5 medio</i>	<i>excelente 10</i>
B) OLOR		
Intensidad <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intensa 10</i>
Ácido <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
Picante/vino <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
Aceptación <i>0 defectuoso</i>	<i>5 medio</i>	<i>excelente 10</i>
C) TEXTURA		
Dureza <i>0 muy blando</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy duro 10</i>
Desmoronamiento <i>0 fundente</i>	<i>5 medio</i>	<i>arenoso 10</i>
Cremosidad <i>0 no cremoso</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy cremoso 10</i>
Aceptación <i>0 defectuosa</i>	<i>5 regular</i>	<i>excelente 10</i>
D) SABOR		
Intensidad <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intensa 10</i>
Picante <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
Ácido <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intenso 10</i>
Salado <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intensa 10</i>
Amargo <i>0 ausencia</i>	<i>5 medio</i>	<i>muy intensa 10</i>
Aceptación <i>0 ausencia</i>	<i>5 normal</i>	<i>excelente 10</i>
Aceptabilidad General <i>0</i>	<i>5</i>	<i>10</i>

Figura 10. Modelo de ficha de evaluación sensorial

3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el correspondiente tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico SPSS Versión 15 para Windows.

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, de dos factores con repetición. Un diseño factorial con varias medidas por casilla, que se ajustó al siguiente modelo:

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

Donde μ es la media general; P_i es el efecto del tipo de coagulante o el tamaño del queso utilizado en la elaboración del queso; T_j es el efecto del tiempo de maduración; PT_{ij} expresa el efecto de la interacción; y ϵ_{ijk} el efecto del individuo k (parámetro determinado en queso) dentro de la combinación ij . Este efecto incluye todo lo que no se controla y su conjunto constituye el denominado error o varianza residual.

Una vez determinada la existencia de diferencias significativas entre las diferentes variables se aplicó la prueba LSD (mínima diferencia significativa), para realizar una comparación múltiple de medias, solamente en aquellos casos en los que el ANOVA fue significativo.

Una vez realizado el análisis de diferencias significativas y establecidas las correlaciones entre los mismos, se realizaron diversos análisis multidimensionales, como el análisis de componentes principales (ACP) y análisis discriminante (AD).

El análisis discriminante es una técnica estadística multivariante que permite establecer una función a partir del cálculo de la distancia de Mahalanobis, que asigna a los grupos observados un grupo teórico. Cuanto mayor sea el porcentaje de coincidencia entre el grupo asignado y el grupo de origen mejor será el modelo discriminante. Para establecer la discriminación hay que determinar las distancias entre los grupos en el espacio multidimensional, definidas por las distancias de los cuadrados de Mahalanobis entre los centroides de grupo.

Este análisis discriminante es un método explicativo y predictivo. Explicativo en cuanto que permite justificar la pertenencia a uno u a otro grupo, de los elementos en función de los valores de sus variables. Y predictivo, en cuanto que a partir de las funciones obtenidas puede predecirse a qué grupo pertenece un elemento que no forma parte de los estudiados, y del cuál se conoce el valor de las variables, pero se desconoce a qué grupo pertenece. Para la realización del análisis discriminante se empleó el método estándar con una tolerancia de 0,01.

El AD se aplicó buscando varios objetivos como:

- Determinar las variables con mayor capacidad diferenciadora de los distintos grupos de queso de Murcia al Vino, es decir, seleccionar las características en que más se diferencian los grupos.
- Evaluar si con relación a las variables físico-químicas, bioquímicas, microbiológicas y sensoriales se detectan diferencias entre quesos elaborados con diferente coagulante (vegetal liofilizado y cuajo) y diferente tiempo de maduración.
- Obtener unas funciones que puedan utilizarse para predecir a que grupo pertenece cada queso, y la distancia establecida entre los diferentes grupos.

La Lambda de Wilks es el cociente entre el determinante de la matriz de variación dentro de los grupos y el determinante de la variación total. La Lambda de Wilks toma valores desde 1 (la capacidad de discriminación es nula) hasta 0 (máxima capacidad de discriminación de la variable).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL QUESO DE MURCIA AL VINO DURANTE SU MADURACIÓN. EFECTO DEL TIPO DE COAGULANTE.

A la hora de exponer y discutir los datos obtenidos tras los análisis de los quesos, la estructura que se seguirá en la exposición será la siguiente.

En primer lugar se comentarán los resultados de los quesos elaboradas con cuajo animal para caracterizar el queso de Murcia al Vino “estándar” (elaborado tal y como establece su Reglamento de la Denominación de Origen), así como la evolución de sus características a lo largo de la maduración.

En segundo lugar, se analizará el efecto que pudiera tener la utilización de un coagulante vegetal, sobre las características del queso obtenidas anteriormente.

4.1.1. Composición y características físico-químicas

4.1.1.1. *Composición general*

En la **Tabla 5** se presentan los valores obtenidos (medias y desviaciones estándar) para los parámetros físico-químicos y composicionales (pH, acidez titulable (AT), sólidos totales (ST), grasa, proteínas, cenizas y NaCl) analizados en los lotes de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con el coagulante vegetal en polvo (CV), a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de su maduración. De igual forma, se muestran los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas realizada mediante el test LSD.

4.1.1.1.a) pH y Acidez Titulable (AT)

En las **Figuras 11** y **12** se representan la evolución de los valores (medias y desviación estándar) de pH y AT respectivamente, a lo largo del periodo de maduración (2, 15, 30, 45 y 60 días) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal (CV).

Tabla 5. Cambios en las características físico-químicas y composicionales de las muestras de queso de Murcia al Vino (media \pm SD) obtenidas con coagulante vegetal en polvo (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración

Coagulante	Días de maduración				
	2	15	30	45	60
CV					
pH	5,38 \pm 0,19 ^d	5,24 \pm 0,22 ^{bcd}	5,07 \pm 0,12 ^{ab}	5,10 \pm 0,13 ^b	5,33 \pm 0,11 ^d
AT ²	1,64 \pm 0,49 ^b	1,84 \pm 0,47 ^c	2,02 \pm 0,34 ^d	2,05 \pm 0,29 ^d	2,14 \pm 0,2 ^e
ST ¹	53,96 \pm 4,63 ^a	59,34 \pm 2,57 ^b	61,34 \pm 2,96 ^{bc}	63,60 \pm 2,73 ^{cde}	65,97 \pm 2,54 ^e
Grasa ²	58,80 \pm 1,74 ^a	59,89 \pm 3,20 ^a	60,15 \pm 2,70 ^a	58,84 \pm 1,26 ^a	58,16 \pm 1,66 ^a
Proteína ²	34,59 \pm 1,05 ^a	33,77 \pm 0,82 ^a	34,13 \pm 1,49 ^a	33,78 \pm 0,51 ^a	32,70 \pm 1,17 ^a
Cenizas ²	5,36 \pm 0,86 ^a	5,42 \pm 0,31 ^a	5,71 \pm ,40 ^a	5,72 \pm 0,32 ^a	6,00 \pm 0,18 ^a
NaCl ²	1,85 \pm 0,38 ^a	2,26 \pm 0,07 ^b	2,28 \pm 0,26 ^b	2,36 \pm 0,28 ^b	2,48 \pm 0,39 ^b
CA					
pH	5,36 \pm 0,17 ^d	5,22 \pm 0,24 ^{bcd}	5,07 \pm 0,13 ^{ab}	5,02 \pm 0,06 ^a	5,16 \pm 0,05 ^{bc}
AT ²	1,47 \pm 0,39 ^a	1,69 \pm 0,50 ^b	1,87 \pm 0,51 ^c	1,97 \pm 0,34 ^d	2,11 \pm 0,22 ^{de}
ST ¹	53,34 \pm 2,71 ^a	58,35 \pm 2,70 ^b	60,26 \pm 1,87 ^{bcd}	63,17 \pm 2,41 ^{cde}	63,84 \pm 2,87 ^{de}
Grasa ²	60,71 \pm 2,40 ^a	60,24 \pm 1,43 ^a	59,88 \pm 2,08 ^a	56,79 \pm 2,42 ^a	60,32 \pm 0,44 ^a
Proteína ²	34,43 \pm 1,99 ^a	34,26 \pm 1,64 ^a	34,34 \pm 1,45 ^a	34,68 \pm 0,97 ^a	33,81 \pm 1,96 ^a
Cenizas ²	5,31 \pm 0,80 ^a	6,04 \pm 0,37 ^a	5,93 \pm 0,36 ^a	5,65 \pm 0,15 ^a	6,24 \pm 0,66 ^a
NaCl ²	1,88 \pm 0,38 ^a	2,44 \pm 0,24 ^b	2,24 \pm 0,18 ^b	2,33 \pm 0,24 ^b	2,48 \pm 0,28 ^b

¹ Expresados como gramos por 100 g queso

² Expresados como gramos por 100 g de sólidos totales

^{a-e} Resultados del test LSD. Medias del mismo parámetro en la misma fila sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

Los valores de pH de los quesos se vieron afectados significativamente ($p < 0,05$) por el tiempo de maduración observándose una evolución muy irregular durante todo el periodo estudiado. Los valores de AT también se modificaron significativamente ($p < 0,05$) durante la maduración observándose una evolución ascendente. Durante los primeros 15 días de maduración se produce una acidificación del queso, que se refleja en un notable incremento de la AT (**Figura 12**) (aproximadamente un 20 %) acompañado de un importante descenso del pH (**Figura 11**), debido a la escasa capacidad tampón de la masa del queso, como consecuencia de la desmineralización durante el proceso de coagulación y desuerado.

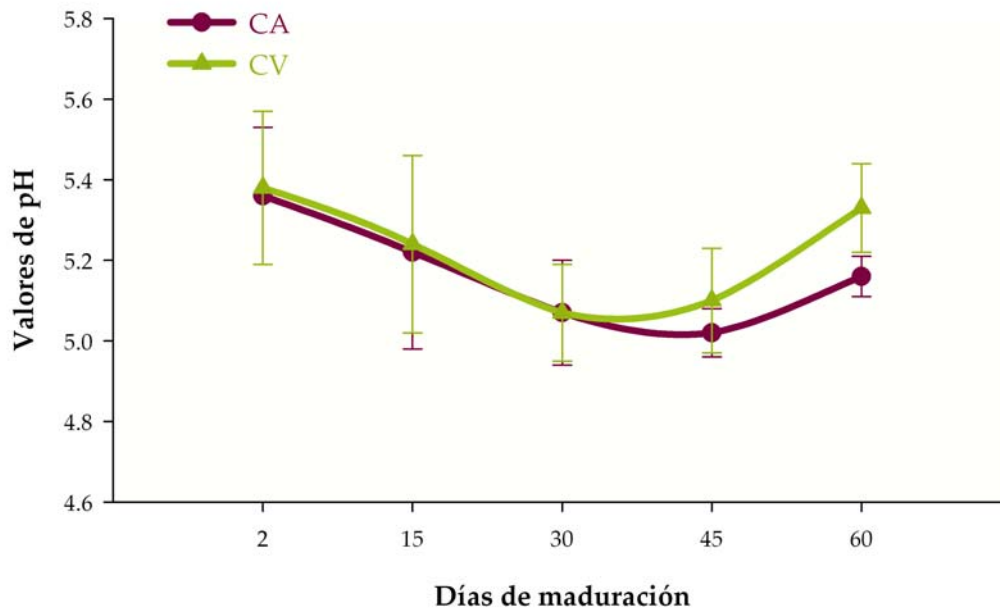


Figura 11. Evolución del pH a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

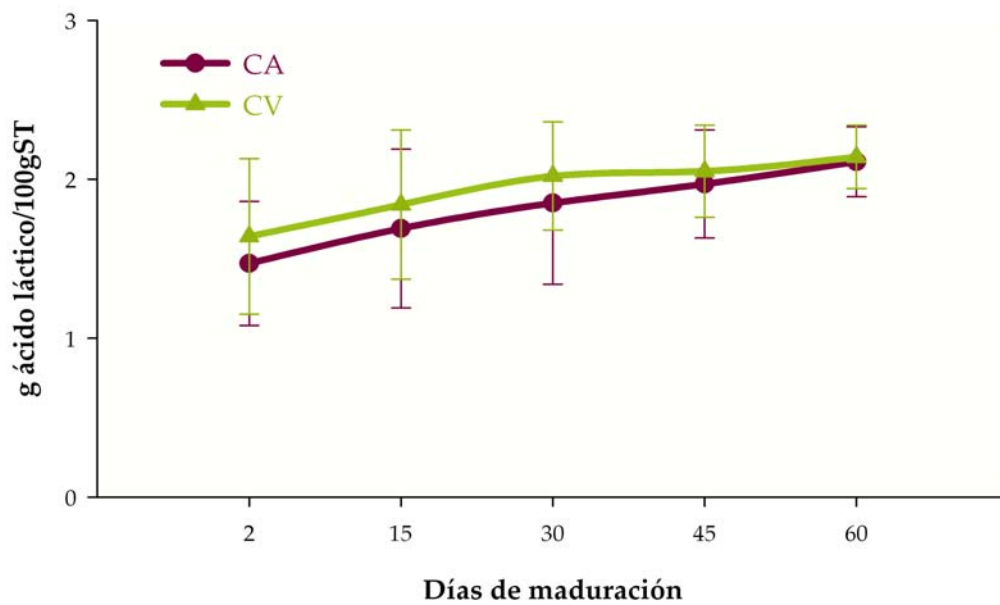


Figura 12. Evolución de la AT a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

Este descenso progresivo en los valores del pH durante los primeros días de maduración también es observado en otras variedades de queso. Así, Guizani *et al.* (2005), atribuyeron este descenso inicial a la actividad metabólica de varios grupos de microorganismos (como *Lactococcus* o *Lactobacillus*), que muestran valores grandes de crecimiento en la cuajada. Del mismo modo, esta tendencia del pH fue encontrada también en el queso de La Serena (Fernández del Pozo *et al.*, 1988a) en el queso Torta del Casar (Poulet *et al.*, 1991), en el queso de Los Pedroches (Pino, 2007) y en el queso Xinotyri (Bontiris *et al.*, 2008) entre otros.

Al final de la maduración, se observa un importante aumento de los valores de pH, estableciéndose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los quesos con 45 y 60 días. Sin embargo, los valores de la AT siguen incrementándose (entre un 6 y un 11%), a pesar del aumento del pH, llegando a establecerse también diferencias significativas entre los quesos con 45 y 60 días. Esta evolución es similar a la observada por otros autores en quesos de oveja (Mas *et al.*, 2002 y Tejada *et al.*, 2003); y puede estar provocada, por el efecto alcalinizante que tienen diversas sustancias procedentes de la hidrólisis de compuestos nitrogenados no proteicos. No obstante, Fresno *et al.* (1996), sugieren que el pequeño incremento de pH que observaron en el queso Armada a lo largo del periodo de maduración, podría determinar una mayor capacidad tampón de la cuajada.

A los 60 días de maduración los valores de pH son ligeramente superiores a los encontrados en otras variedades de quesos de cabra como el Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003), el queso Gredos (Medina *et al.*, 1992), Cendrat del Montsec (Carretero *et al.*, 1992), el queso Cameros (Olarte *et al.*, 1999), el queso Serra (Macedo *et al.*, 2004), el queso Teleme (Mallatou *et al.*, 2003) o el queso Urfa (Atasoy y Türkoglu, 2009), siendo similares a los valores observados en otros quesos como el queso Ibores (Mas *et al.*, 2002), el Armada (Fresno *et al.*, 1996), varios quesos Manchegos (Ballesteros *et al.*, 2006) o el Majorero (Calvo *et al.*, 2007) e inferiores a los observados en queso Sainte-Maure (Pierre *et al.*, 1999), o en quesos semicurados de Tenerife (Pelaez-Puerto *et al.*, 2004).

La evolución ascendente de la AT, también ha sido observada en otros quesos de cabra como el Valdeteja (Carballo *et al.*, 1994), Ibores, Cadiz y Málaga (Fernández-Salguero *et al.*, 1997) y Majorero (Fernández-Salguero *et al.*, 1981). Como en la mayoría de los quesos, a partir de las 2-3 semanas de maduración se

agota la lactosa y no aumenta el ácido láctico resultante de su fermentación por las bacterias ácido-lácticas (Macedo *et al.*, 1997a; Fresno *et al.*, 1996). El incremento del índice de acidez, a partir de este momento, podría estar provocado por el aumento de aminoácidos libres y ácidos grasos libres, que también resultan titulados por la disolución de NaOH. De hecho, se ha observado una evolución similar ($r^2=0,9$) del ácido láctico con respecto a la concentración total de aminoácidos en todos los lotes de queso estudiados.

Los valores de la AT de los quesos con 60 días son similares a los detectados en el queso Armada (Fresno *et al.*, 1996) o Majorero (Fernández-Salguero *et al.*, 1981). Por otra parte, en quesos de cabra Alhama de Granada y Aracena Fernández-Salguero y Gómez (1997) encontraron valores de 2,50 y 2,86g/100g de ES, respectivamente, mientras que se encuentran valores inferiores en quesos como el Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003), Ibore (Marcos *et al.*, 1985), el queso curado de Cádiz con 1,44 g/100g de ES (Fernández-Salguero y Gómez, 1997), o queso Valdeteja, donde Alonso-Calleja *et al.* (2002) encontraron contenidos de AT (% ST) ligeramente inferiores a los encontrados en este estudio.

Los valores de pH de los quesos se vieron afectados significativamente por el tipo de coagulante usado ($p<0,05$). Hasta los 30 días de maduración no se detectaron diferencias significativas entre el pH de los quesos elaborados con diferente coagulante, pero a partir de este momento, el pH de los quesos elaborados con CV se incrementó más intensamente, alcanzando a los 60 días de la maduración, valores de 5,33 y de 5,16, para los quesos elaborados con CV y con CA, respectivamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos en diversos quesos de oveja (Tejada *et al.*, 2003; Vioque *et al.*, 2000). Este hecho puede estar provocado, como se ha demostrado en quesos de oveja elaborados con coagulante vegetal (Tejada *et al.*, 2003; Vioque *et al.*, 2000), a la mayor actividad proteolítica de las cinasas sobre las caseínas, lo que da lugar a una mayor concentración de sustancias nitrogenadas de carácter alcalino. De hecho se ha detectado una correlación positiva muy significativa ($p<0,01$) entre algunas fracciones nitrogenadas como el Nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$) y el pH en los quesos a los 45 y 60 días de maduración.

Por otro lado, Núñez *et al.* (1991) encontraron en queso de la Serena elaborado con leche de oveja y CV, valores superiores de pH en comparación con los elaborados con cuajo animal, debido a que estos últimos retuvieron mayor cantidad de suero que los primeros, mientras que Sanjuán *et al.* (1998) prácticamente no encontraron diferencias en el queso de Los Pedroches elaborado con ambos tipos de coagulante. Pino *et al.* (2009) muestran valores ligeramente superiores, aunque sin diferenciación significativa, entre quesos de leche de cabra elaborados con los dos tipos de coagulantes. Por tanto, se puede afirmar que el tipo de coagulante condiciona el valor del pH del queso aunque su efecto dependerá también de la tecnología empleada en la fabricación del mismo.

Los valores de AT de los quesos también se vieron afectados significativamente ($p < 0,05$) por el tipo de coagulante usado. La AT fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los quesos elaborados con CV que en los elaborados con cuajo animal hasta los 30 días de maduración, probablemente debido a la mayor concentración de aminoácidos libres de carácter ácido detectados en los primeros, provocada por una mayor actividad proteolítica. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el queso de los Pedroches (Pino, 2007) o en diversos quesos de oveja (Tejada *et al.*, 2003; Vioque *et al.*, 2000).

4.1.1.1.b) Sólidos totales (ST)

En la **Figura 13** se representa la evolución de los valores de los sólidos totales a lo largo del periodo de maduración (2, 15, 30, 45 y 60 días) de quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal (CV). Los resultados vienen expresados como gramos de sólidos totales (ST)/100g de queso.

El contenido de ST del queso de Murcia al Vino se vió afectado de manera altamente significativa ($p < 0,001$) por el tiempo de maduración, observándose una evolución ascendente durante todo el periodo estudiado. Este incremento es debido a la evaporación en superficie y al intercambio de productos volátiles (agua, amonio, ácidos grasos, etc,...) entre el queso y su medio ambiente (Hassouna *et al.*, 1996).

En líneas generales, los valores de ST detectados en los primeros días de maduración son más elevados que en otras variedades de queso. Así, en el queso Cameros (Olarte *et al.*, 2000), o en el queso Los Pedroches (Pino, 2007) se

observaron valores de 48,75 y 48,14g ST/100 g queso, respectivamente, a los 2 días de maduración, inferiores a los 53,34 g ST/100g queso observados en este trabajo. Esto, posiblemente pudiera ser debido al intenso lavado al que es sometida la pasta antes del moldeado durante la elaboración del queso de Murcia al Vino.

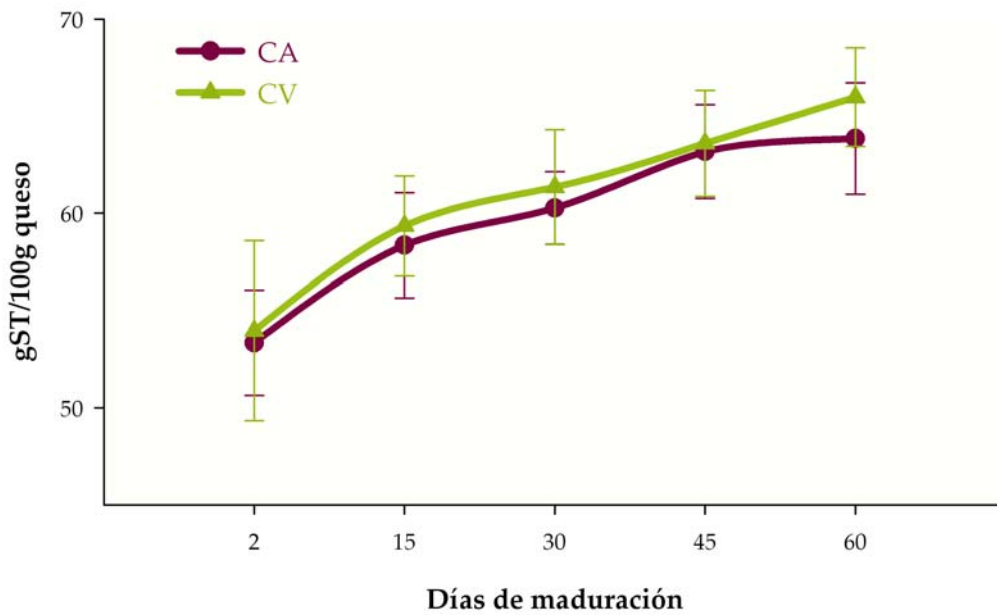


Figura 13. Evolución de los sólidos totales a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

A los 60 días de maduración se alcanzaron valores próximos a los de 64 g ST/100g queso, cifras superiores a las encontradas para otros quesos de cabra como el Cendrat del Montsec (Carretero *et al.*, 1992), variedades de quesos extremeños (Vidal-Aragón *et al.*, 1994), de Málaga y Cádiz (Marcos *et al.*, 1983; Fernández-Salguero y Gómez, 1997) o Ibores (Mas *et al.*, 2002); similares al queso Sainte-Maure (Pierre *et al.*, 1999), o Majorero (Calvo *et al.*, 2007) e inferiores a las detectadas en quesos como el Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003), el Armada (Fresno *et al.*, 1996), el queso Cameros (Olarte *et al.*, 2000) o en queso griego Xinotyri (Bontinis *et al.*, 2008) que llegaron a alcanzar valores de 78,0, 78,21, 83,32, y 82,87 g /100 g queso respectivamente.

Se produce en los quesos de nuestro estudio un incremento moderado de ST, de alrededor del 10%, similar al observado en el queso Ibores (Mas *et al.*, 2002), aunque menor que en otras variedades de quesos de cabra en las que el porcentaje de humedad relativa durante la maduración fue muy inferior al nuestro (65-70%) (Fresno *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 2003; Bontinis *et al.*, 2008).

La gran variabilidad de valores en cuanto a este parámetro citados por los diferentes autores (Fernández-Salguero y Gómez, 1997; Olarte *et al.*, 2000; Alonso-Calleja *et al.*, 2002) en quesos elaborados con leche de cabra, es debida fundamentalmente a las diferencias en el proceso de elaboración, al formato que presenten los quesos, y a las condiciones climáticas de humedad relativa y de temperatura a las que se someten durante la maduración.

El contenido de ST del queso de Murcia al Vino no se vió modificado significativamente ($p > 0,05$) por el tipo de coagulante utilizado. En otros quesos de oveja y de cabra elaborados con coagulante vegetal como el queso Serra, (Sousa *et al.*, 1997b), o el queso de Los Pedroches (Fernández-Salguero y Sanjuán, 1999; Tejada, 2001 y Pino, 2007), tampoco se detectaron diferencias significativas entre el contenido de ES de las partidas de queso elaboradas con cuajo animal y con coagulante vegetal.

4.1.1.1.c) Grasa

La evolución de los valores de grasa (media y desviaciones estándar) de los quesos elaborados con CA y con CV, a lo largo del periodo de maduración, se muestran en la **Tabla 5** y se representan en la **Figura 14**. Los resultados vienen expresados como gramos de grasa/100g de ST.

Atendiendo al contenido de grasa observado, el queso de Murcia al Vino puede ser considerado como un queso graso (Anónimo, 1991). Los contenidos de grasa de los quesos analizados (**Figura 14**), a pesar de poder sufrir alguna fluctuación puntual, no se modificaron significativamente por el tiempo de maduración ($p > 0,05$), alcanzando a los 60 días de ésta, unos valores medios de 60,32 g/100g ST. Los valores de grasa observados en el queso de Murcia al Vino son similares a los encontrados en otras variedades de quesos como el Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003), el queso Armada (Fresno *et al.*, 1996), el queso Sainte-Maure (Pierre *et al.*, 1999) o el Cendrat del Montsec (Carretero *et al.*, 1992),

aunque superiores a los detectados por distintos autores en otros quesos como el queso Ibores, con un 50,72% (Mas *et al.*, 2002), el queso Majorero con 90 días de maduración, con un 53,26% (Martín-Hernández *et al.*, 1992), los quesos de cabra extremeños (Vidal-Aragón *et al.*, 1994), diversos quesos de cabra elaborados con tecnología del Manchego (Cabezas *et al.*, 2005), o el queso de Los Pedroches (Pino, 2007). De la misma forma, en el queso Cameros artesanal, Olarte *et al.* (2000), observaron valores de grasa entre 47,19 y 51,40%, mientras que Fernández-Salguero y Gómez (1997) encontraron para quesos de cabra Alhama de Granada, Aracena y Curado de Cádiz valores de 54,4 %, 52,7 % y 52,1 %, respectivamente.

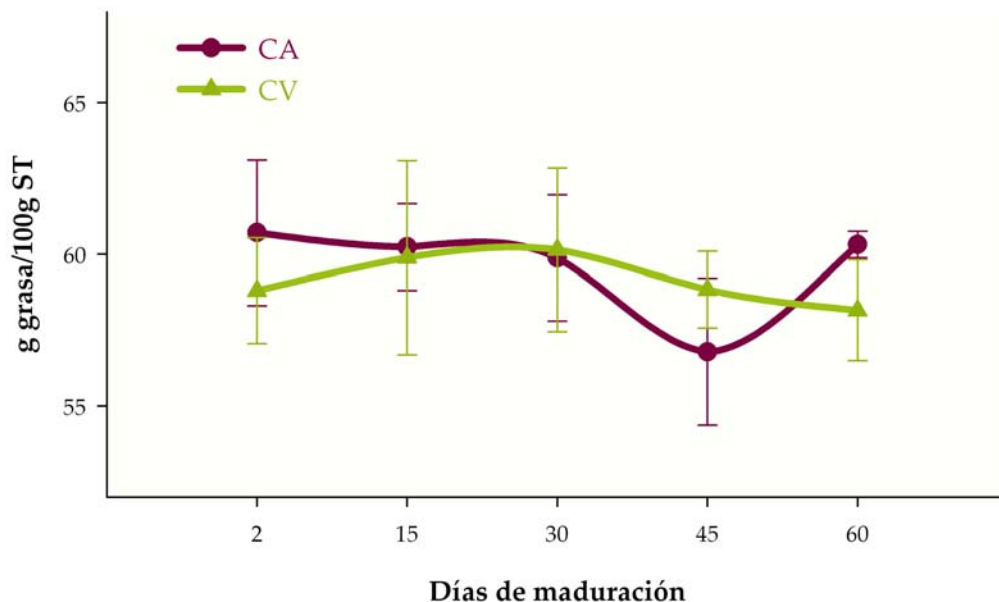


Figura 14. Evolución de la grasa a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuaajo animal (CA)

El tipo de coagulante utilizado tampoco modificó significativamente ($p > 0,05$) el contenido de grasa de los quesos, aunque los elaborados con CA presentaron en líneas generales valores ligeramente superiores. Este hecho coincide con lo observado en diversas variedades de quesos tanto de cabra, como de oveja. Así, Pino (2007), en el queso de Los Pedroches, elaborado con leche de

cabra, y con dos tipos diferentes de coagulantes, encontró valores superiores de grasa, no significativos, para quesos elaborados con cuajo animal frente a los coagulados con el coagulante vegetal liofilizado (57,24 y 55,55 g grasa/100g ST, respectivamente). Sousa y Malcata (1997a), observaron en quesos elaborados con leche de cabra y CV, valores de 45,14 g grasa/ST para quesos con 68 días de maduración, algo inferior al obtenido en este estudio en quesos con 60 días, para el mismo coagulante ensayado. Tejada *et al.* (2003), y Prados (2005) tampoco encuentran diferencias significativas entre los contenidos de grasa de partidas elaboradas con cuajo animal y coagulante vegetal en polvo en el queso de Los Pedroches y en quesos de tipo Manchego elaborados con leche de oveja. Por tanto, parece ser que estas diferencias pueden ser debidas más a la técnica de elaboración y variabilidad del contenido graso inicial de la leche de partida, que al tipo de coagulante utilizado.

4.1.1.1.d) Proteína

En la **Figura 15** se muestran las medias y desviaciones estándar de los valores del contenido de proteína de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y con coagulante vegetal en polvo (CV) a lo largo del periodo de maduración (2, 15, 30, 45 y 60 días). Los resultados vienen expresados como gramos de proteína/100g de ST.

No se observan modificaciones significativas ($p > 0,05$) en el contenido proteico de los quesos a lo largo de toda su maduración. Los valores medios que alcanzaron a los 60 días de maduración fueron de 33,81 y de 32,70 g proteína/100g ST, respectivamente. Estos valores fueron superiores a los detectados en quesos extremeños (Vidal-Aragón *et al.*, 1994), Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003) o Ibores (Mas *et al.*, 2002), similares a los detectados para el queso Armada (Fresno *et al.*, 1996), Cameros artesanal (Olarte *et al.*, 2000) e inferiores para el queso Cendrat del Montsec (Carretero *et al.*, 1992) y Majorero (Martín-Hernández *et al.*, 1992). Fernández-Salguero y Gómez (1997) obtuvieron para quesos comerciales de cabra de las variedades Alhama de Granada, Aracena y Curado de Cádiz valores de proteína en extracto seco de 39,21%, 37,5% y 40,8%, respectivamente.

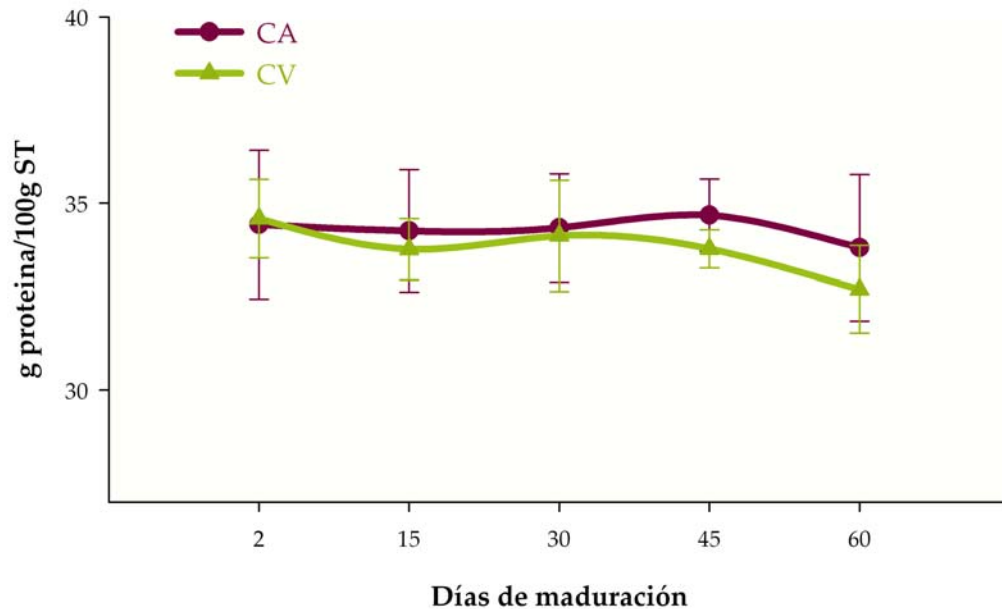


Figura 15. Evolución de la proteína a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

El tipo de coagulante utilizado tampoco afectó de forma significativa ($p > 0,05$) al contenido de proteína de los quesos. Sousa y Malcata (1997a) hallaron en el queso de cabra elaborado con CV, un porcentaje medio de 30,02% a los 68 días de maduración, similares a los observados en este estudio. En diversos estudios comparativos de quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal en polvo elaborados con leche de oveja, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al contenido de proteína (Tejada, 2001; Vioque, 2002; Prados, 2005), aunque Freitas *et al.* (1996) detectaron en queso Picante elaborado con cuajo animal porcentajes de proteína significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los observados en quesos obtenidos mediante CV.

4.1.1.1.e) Cenizas

La evolución del contenido en cenizas a lo largo del periodo de maduración (2, 15, 30, 45 y 60 días) de los quesos elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal (CV), se representan en la **Figura 16**, de manera comparada

junto con la evolución del contenido en NaCl de los quesos. Los resultados vienen expresados como gramos de cenizas/100g de ST.

Como se puede observar, el contenido en cenizas de los quesos no se modificó significativamente ($p>0,05$) durante la maduración, aunque se observa una tendencia ligeramente ascendente. Este hecho coincide con lo observado en otros quesos de cabra, como el queso de Los Pedroches (Pino, 2007), queso curado de Cádiz (Fernández-Salguero y Gómez, 1997) o en quesos de cabra elaborados con la tecnología del queso Manchego (Cabezas *et al.*, 2005), que presentan valores similares a los detectados para el queso de Murcia al Vino. Por otra parte, los quesos de nuestro estudio alcanzan valores muy superiores a los obtenidos en los quesos Armada (Fresno *et al.*, 1996), Cendrat del Montsec, (Carretero *et al.*, 1992), Majorero (Fernández-Salguero *et al.*, 1981) o Babia- Laciana (Franco *et al.*, 2003), e inferiores a los encontrados para quesos como el Alhama de Granada o el Aracena, que presentaron valores medios de 8,19 y de 7,32 g cenizas/100g ES respectivamente (Fernández-Salguero y Gómez, 1997).

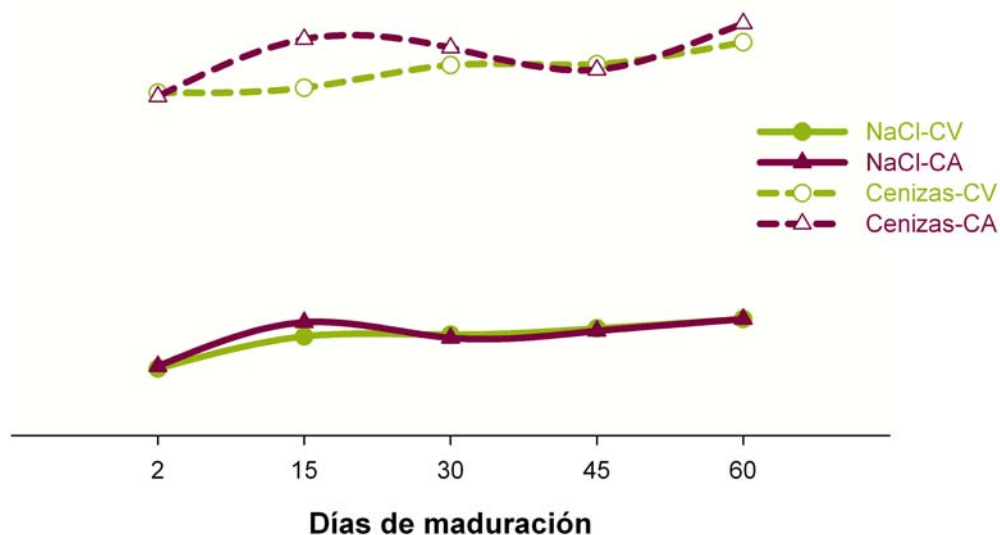


Figura 16. Comparación de la evolución del contenido de cenizas y NaCl a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

El hecho de que los valores de las cenizas sean menores en los primeros días de la maduración de los quesos coincide, en la mayoría de ellos, con los valores más bajos que presentan para el contenido en NaCl (**Figura 16**). Esto podría deberse a que el descortezado que sufren los quesos en la toma de muestras disminuye la cantidad de sal que presentan aquellos que tienen 2 días mientras que, en días posteriores esta sal, va a ir difundiendo hacia el interior de la masa del queso.

El tipo de coagulante utilizado para elaborar los quesos tampoco afectó de forma significativa ($p > 0,05$) al contenido de cenizas de los mismos, aunque los valores detectados para las piezas elaboradas con CA fueran ligeramente superiores a los encontradas para las elaboradas con CV. De igual manera ocurre en otros tipos de quesos elaborados con leche de oveja en los que se ensayaron ambos tipos de coagulantes (Tejada *et al.*, 2003; Prados, 2005).

4.1.1.f) NaCl

En la **Figura 16** se representa la evolución del contenido en NaCl de los quesos a lo largo de la maduración, expresándose los resultados como g de NaCl/100 g de ST.

Se observa un incremento altamente significativo ($p < 0,001$) en el contenido de NaCl de los quesos a lo largo de su maduración, hasta alcanzar 2,48 g/100g ST. El aumento, se produce fundamentalmente en los primeros 15 días de maduración, incrementándose los valores, en este intervalo de tiempo, alrededor de un 90%. Este aumento coincide con el que experimentan también los valores de los ST en esos días, habiéndose detectado una correlación positiva ($p < 0,05$) entre ambos parámetros. Este hecho se debe a que la penetración de la sal se produce por difusión desde la corteza al interior de la masa del queso, al mismo tiempo que sale el agua, estando ambos procesos de difusión, cuantitativamente relacionados (Walstra *et al.*, 2001).

La evolución observada es muy similar a la detectada en otras variedades de quesos de cabra como el Armada (Fresno *et al.*, 1995), el Majorero (Calvo *et al.*, 2007) o el Urfa (Atasoy y Türkoglu, 2009); o en quesos de oveja (Galán, 2008), y en queso Picante (Freitas y Malcata, 1996), entre otros.

Los valores alcanzados a los 60 días de maduración fueron semejantes a los obtenidos en los quesos Ibores (Mas *et al.*, 2002), Armada (Fresno *et al.*, 1996) o quesos de cabra extremeños (Vidal-Aragón *et al.*, 1994) y superiores al Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003).

La cantidad de NaCl de los quesos no se vió modificada significativamente por el tipo de coagulante empleado ($p > 0,05$).

4.1.1.1.g) Análisis multivariante

Análisis discriminante (AD)

- Aplicación con respecto al tiempo de maduración

En la **Tabla 6** se representan los principales valores de Lambda de Wilks y de F calculados para las variables físico-químicas determinadas analíticamente en los quesos. En dicha Tabla se puede observar que los ST y el pH son las variables que más han contribuido en la diferenciación de los diferentes periodos de maduración, con valores de F y de Lambda de Wilks de 17,52 y 5,95 y 0,21 y 0,44, respectivamente.

Tabla 6. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	ST	pH	grasa	proteína	AT	cenizas	NaCl
Lambda de Wilks	0,21	0,44	0,81	0,68	0,84	0,86	0,83
Valor F	17,52	5,95	1,14	2,23	0,93	0,77	0,97

En la **Tabla 7** se observan las distancias establecidas entre los diferentes periodos de maduración. Las diferencias menos marcadas se detectaron entre los quesos madurados durante 30 y 45 días, que presentaron una distancia de los cuadrados de Mahalanobis de 2,8. En otras variedades de queso en las que se aplicó el AD, variedades elaboradas tanto con leche de cabra (Pino, 2007), como en oveja (Tejada, 2001 o Galán, 2008), la distancia menor se estableció entre los quesos elaborados entre los 15 y los 30 días. Por otra parte y como era esperado, la máxima distancia se establece entre los quesos madurados durante 2 y 60 días.

Tabla 7. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis

	2	15	30	45	60
2	0,0	17,7	40,2	52,9	68,1
15	17,7	0,0	7,7	12,1	20,3
30	40,2	7,7	0,0	2,8	11,5
45	52,9	12,1	2,8	0,0	7,7
60	68,1	20,3	11,5	7,7	0,0

Si comparamos la distancia que existe entre los grupos, en los mismos periodos de tiempo (periodos de 15 días), podemos comprobar que la mayor diferencia se establece en los primeros días, entre los quesos elaborados de 2 y 15 días, presentando un valor de distancia de cuadrados de Mahalanobis de 17,7. Esto sugiere que es en este periodo de tiempo de la maduración, cuando los quesos sufren una transformación más intensa en sus características físico-químicas.

A partir de las variables se obtuvieron las funciones de clasificación y con ellas, la matriz de clasificación (**Tabla 8**), en la cual aparecen correctamente clasificados el 80% del total de los quesos. Todos los quesos con 15 días de maduración se clasificaron correctamente, mientras que sólo el 66,67 % de los quesos con 45 y 60 días lo hicieron de manera adecuada, clasificándose incorrectamente y confundiendo entre ellos y con los de 30 días de maduración.

Tabla 8. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	2	15	30	45	60
2	83	5	1	0	0	0
15	100	0	6	0	0	0
30	83	0	0	5	1	0
45	67	0	0	1	4	1
60	67	0	0	1	1	4
Total correcto	80	5	7	7	6	5

Tal y como podemos observar en la **Tabla 9**, si se aplicara el AD a los quesos elaborados con CV por separado, se obtendría una mejor clasificación de los quesos. Todos ellos se clasificarían correctamente a excepción de los quesos de 45 días, que se confundirían con los de 30. La misma matriz de clasificación se obtendría si se aplicase el análisis para los quesos CA independientemente.

Tabla 9. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Quesos elaborados con CV correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	2	15	30	45	60
2	100	3	1	0	0	0
15	100	0	3	0	0	0
30	100	0	0	3	0	0
45	67	0	0	1	2	0
60	100	0	0	0	0	3
Total correcto	93	3	3	4	2	3

Mediante las dos primeras funciones canónicas (FC) se representan en un diagrama de dispersión (**Figura 17**) los quesos con 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

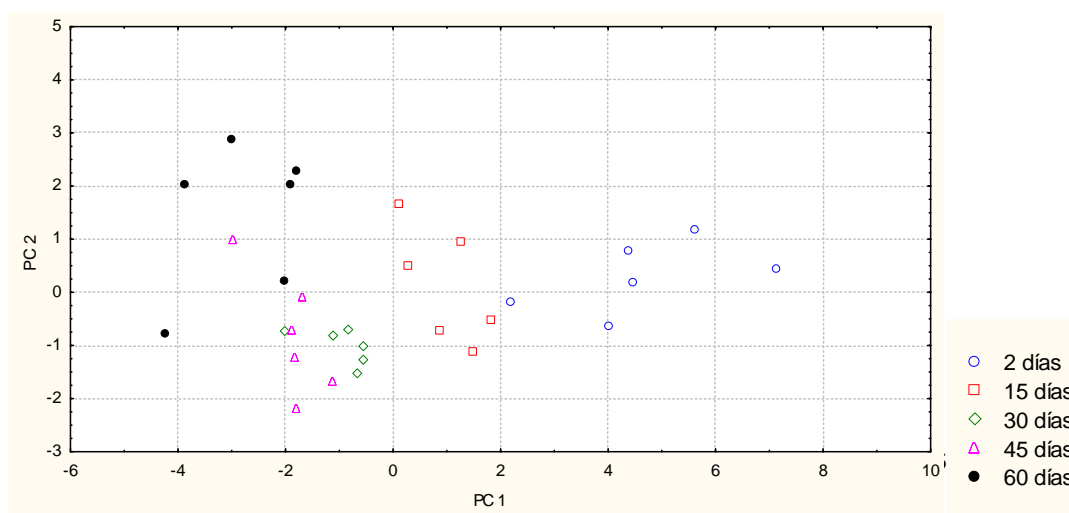


Figura 17. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2

- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante

Como se puede observar en la **Tabla 10**, fueron las cenizas y el ácido láctico, las variables que presentaron mayor capacidad discriminante en los quesos elaborados con los diferentes coagulantes.

Tabla 10. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tipo de coagulante

	ST	pH	grasa	proteína	AT	cenizas	ClNa
Lambda de Wilks	0,98	0,77	0,998	0,87	0,71	0,67	0,96
Valor F	0,34	6,76	0,03	4,63	9,02	10,75	0,97

Por su parte, entre los quesos elaborados con CV y con CA se establecen unas distancias de 3,4.

La función de clasificación clasificó correctamente el 80% de los quesos (**Tabla 11**). En ella se puede comprobar que el 73% de los quesos elaborados con CV se clasificaron correctamente ya que de los 15, 11 se discriminaron perfectamente, mientras que 4 de ellos se confundieron con los elaborados con CA. Con respecto a los quesos elaborados con CA, estos se clasificaron de manera correcta en un 87%, confundiéndose sólo 2 piezas de las 15, con aquellas elaboradas con CV.

Tabla 11. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	CA	CV
CA	87	13	2
CV	73	4	11
Total correcto	80	17	13

4.1.1.2. Composición Mineral

En la **Tabla 12** se muestran las medias y las desviaciones estándar de los macrominerales (mg/100g ST) y microminerales ($\mu\text{g}/100\text{g ST}$), de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración. De igual forma, se presentan los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas mediante el test LSD.

4.1.1.2.a) Macrominerales

Tal y como se puede apreciar en las **Figuras 18 y 19**, el contenido de los minerales asociados mayoritariamente a la micela de la caseína, es decir, el calcio (Ca) y el fósforo (P), muestran un descenso significativo ($p < 0,05$) durante los primeros días de maduración, para posteriormente estabilizarse al final de la misma.

Este hecho coincide con el descenso en los valores del pH, así como, con el incremento de la AT. De esta manera, se observa una evolución similar entre el pH y el Ca y el P ($r^2=0,87$), y contraria entre la AT y el Ca y el P ($r^2=0,90$ y $0,93$, respectivamente).

La acidificación observada durante los primeros días de la maduración alcanza valores máximos, alrededor de los 21 días de la misma (Macedo y Malcata, 1997b), y viene acompañada de la solubilización progresiva del fosfato cálcico coloidal, así como de los cationes vinculados al complejo de la caseína (De la Fuente *et al.*, 1997), que por lo tanto, disminuirán conforme aumenten los valores de AT.

Esta evolución fue observada también por otros autores en quesos como el Armada (Fresno *et al.*, 1996), el Serra (Macedo *et al.*, 1996), tipo Manchego (Moreno *et al.*, 1994b; Prados, 2005), el Xinotyri (Bontiris *et al.*, 2008), o el de Los Pedroches (Pino, 2007) entre otros.

Los valores de calcio y fósforo detectados en el queso de Murcia al Vino, son inferiores a los observados por Franco *et al.* (2003), Fresno *et al.* (1996), Fernández-Salguero y Gómez (1997), o García *et al.* (2006), en los quesos Babia-Laciana, Armada, Alhama de Granada y quesos de cabra canarios, respectivamente. Por

otra parte, son similares a los valores medios encontrados por Fernández-Salguero y Gómez (1997) en queso Aracena (con 851 mg/100 g ES) aunque superiores a los detectados en otros quesos de cabra (Fresno *et al.*, 1995; Fernández-Salguero y Gómez, 1997; Cabezas *et al.*, 2005, Bontiris *et al.*, 2008).

Tabla 12. Valores medios y desviaciones estándar de macrominerales (mg/100g ST) y microminerales ($\mu\text{g}/100\text{g ST}$) en las muestras de Queso de Murcia al Vino obtenidas con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración

Coagulante	Días de maduración				
	2	15	30	45	60
CV					
Ca ¹	988 ± 43 ^b	850 ± 37 ^c	798 ± 30 ^{cd}	754 ± 13 ^d	766 ± 34 ^d
P ¹	706 ± 29 ^a	634 ± 12 ^{ab}	620 ± 35 ^b	628 ± 60 ^{ab}	626 ± 66 ^b
Na ¹	481 ± 21 ^b	585 ± 55 ^c	777 ± 24 ^{cd}	1095 ± 63 ^e	1075 ± 64 ^e
K ¹	147 ± 11 ^a	153 ± 5 ^a	158 ± 5 ^a	164 ± 11 ^a	158 ± 15 ^a
Cu ²	406 ± 14 ^a	393 ± 24 ^a	316 ± 18 ^b	305 ± 25 ^b	350 ± 21 ^{ab}
Mn ²	83 ± 17 ^a	85 ± 5 ^a	98 ± 6 ^a	83 ± 6 ^a	94 ± 1 ^a
Fe ²	580 ± 102 ^a	521 ± 86 ^b	468 ± 52 ^{bc}	472 ± 101 ^{bc}	508 ± 148 ^{bc}
Zn ²	4813 ± 280 ^a	4636 ± 80 ^{ab}	3967 ± 251 ^b	4422 ± 80 ^{ab}	4024 ± 258 ^b
Ca/P	1,40 ± 0,06 ^{ab}	1,34 ± 0,04 ^b	1,29 ± 0,09 ^b	1,20 ± 0,09 ^b	1,22 ± 0,09 ^c
CA					
Ca ¹	1123 ± 67 ^a	948 ± 91 ^b	912 ± 67 ^b	901 ± 115 ^{bc}	895 ± 42 ^{bc}
P ¹	762 ± 48 ^a	664 ± 35 ^a	643 ± 36 ^{ab}	626 ± 118 ^b	620 ± 50 ^b
Na ¹	317 ± 24 ^a	674 ± 34 ^{cd}	882 ± 52 ^{de}	919 ± 43 ^{de}	1019 ± 35 ^e
K ¹	152 ± 14 ^a	176 ± 17 ^{ab}	176 ± 35 ^{ab}	182 ± 28 ^b	178 ± 27 ^{ab}
Cu ²	396 ± 13 ^a	329 ± 4 ^{ab}	363 ± 7 ^{ab}	359 ± 10 ^{ab}	301 ± 14 ^b
Mn ²	93 ± 1 ^a	96 ± 2 ^a	94 ± 5 ^a	92 ± 3 ^a	84 ± 10 ^a
Fe ²	541 ± 25 ^{ab}	540 ± 63 ^{ab}	496 ± 31 ^{bc}	488 ± 30 ^{bc}	419 ± 84 ^c
Zn ²	5028 ± 368 ^a	4903 ± 197 ^a	4262 ± 69 ^{ab}	4658 ± 47 ^{ab}	3954 ± 389 ^b
Ca/P	1,47 ± 0,05 ^a	1,43 ± 0,07 ^{ab}	1,42 ± 0,03 ^a	1,44 ± 0,04 ^{ab}	1,44 ± 0,03 ^{ab}

¹ Expresados como mg/100 g ST

² Expresados como $\mu\text{g}/100\text{g ST}$

^{a-e} Medias sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

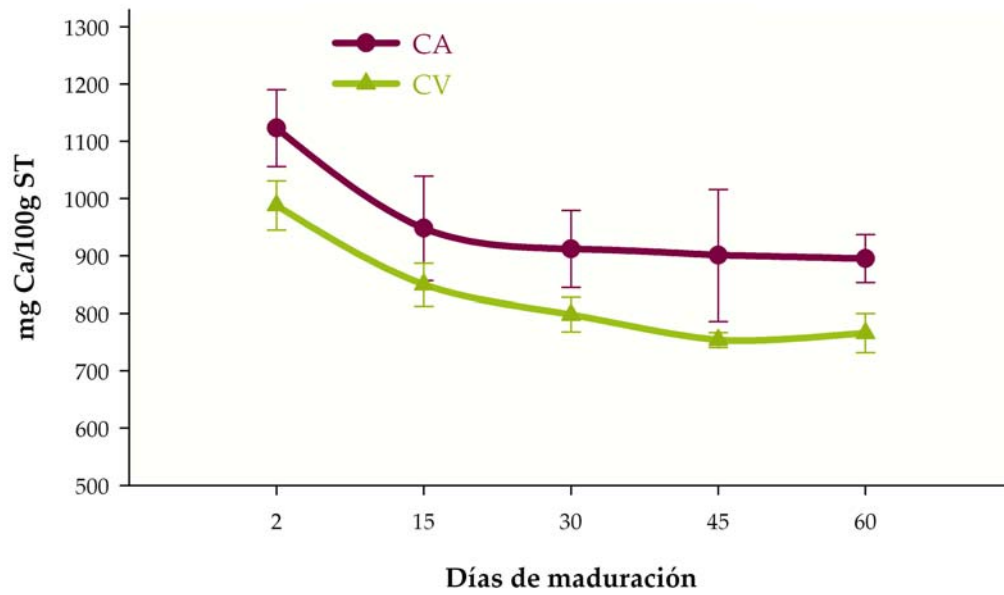


Figura 18. Evolución del contenido en Ca (en mg/100 g ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

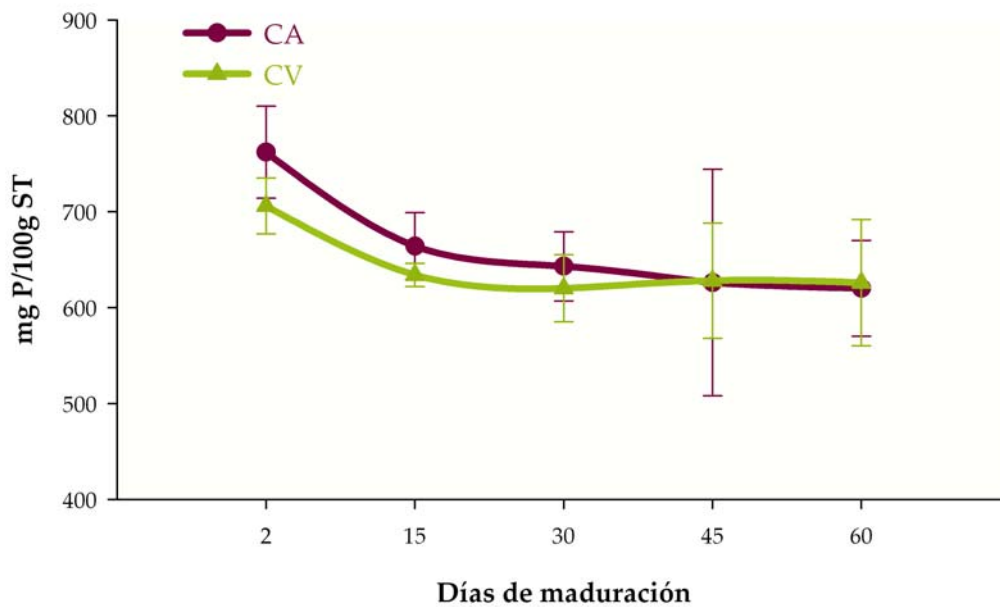


Figura 19. Evolución del contenido en P (en mg/100g ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

Esta variabilidad en el contenido de calcio, podría deberse a las características de las leches de las partidas con las que se elaboraron cada tipo de queso (empleo de leches crudas o pasteurizadas, o perteneciente a diferentes estaciones del año).

En la **Figura 20** se puede observar que la evolución de la relación Ca/P, descendió significativamente ($p < 0,05$) a lo largo de la maduración de los quesos. Este hecho se debe a que los niveles de Ca disminuyeron más intensamente que los niveles de P, hecho que coincide con otros autores como Lucey y Fox, 1993; Fresno *et al.*, 1996 o Le Graet *et al.*, 1999, que estudiaron el efecto de la acidificación sobre esta relación a lo largo de la maduración de diversos quesos. Las mayores pérdidas que sufre el Ca en relación con las del P como consecuencia de la acidificación, podrían explicarse por la estructura de la micela de las caseínas así como por las características de los enlaces establecidos en ella por ambos elementos. Y es que, alrededor del 40% del fosfato se encuentra en la micela de caseína esterificado por las caseínas α_{s1} , α_{s2} , β y k , y no se solubiliza cuando el pH desciende. Mientras, el calcio micelar se encuentra casi en su totalidad en combinación iónica con residuos cargados, bien de caseína, o bien de citrato y fosfato, esterificado o no (Walstra *et al.*, 1987), por lo que se va a solubilizar con mayor facilidad que el fósforo, cuando se acidifica el entorno. En este estudio se ha detectado una correlación negativa ($p < 0,05$) entre la acidez de los quesos y la relación Ca/P. Por otra parte, el menor tamaño molecular del ión calcio con respecto al fosfato, podría también contribuir a que sus pérdidas fuesen mayores debido a su mayor movilidad (Kinstedt y Kosikoswski, 1988).

Por otra parte, diversos autores han observado que a medida que aumenta el tiempo de maduración se producen pequeñas migraciones de calcio hacia las porciones más externas del queso (Le Graet *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 1994b), y que existe una correlación negativa ($p < 0,05$) entre la acidez de los quesos y la relación Ca/P (Tejada *et al.*, 2003; Fernández-Salguero *et al.*, 2002).

Los contenidos de calcio de los quesos elaborados con CV fueron significativamente ($p < 0,05$) más bajos que los elaborados con CA desde los 2 días de maduración, no observándose diferencias significativas ($p > 0,05$) en los contenidos de fósforo. Por esta razón, se detectan diferencias significativas ($p > 0,05$) en la relación Ca/P de los dos tipos de quesos. Relación que también presenta valores significativamente mayores en las muestras elaboradas con CA. Este mismo fenómeno también ha sido observado en queso de oveja (Sanjuán *et al.*, 1998) probablemente debido a que en los quesos elaborados con CV, en los cuales el tiempo de coagulación de la leche fue mayor, se produce una menor retención de fósforo y calcio que en los elaborados con CA. Del mismo modo, Czulak *et al.* (1970), observaron en el queso Cheddar, que un largo contacto de la cuajada con el suero provocaba un descenso en los contenidos de calcio y fósforo de los mismos. La mayor AT detectada en los quesos elaborados con CV también pudo influir en que estos quesos presentaran valores más bajos de Ca.

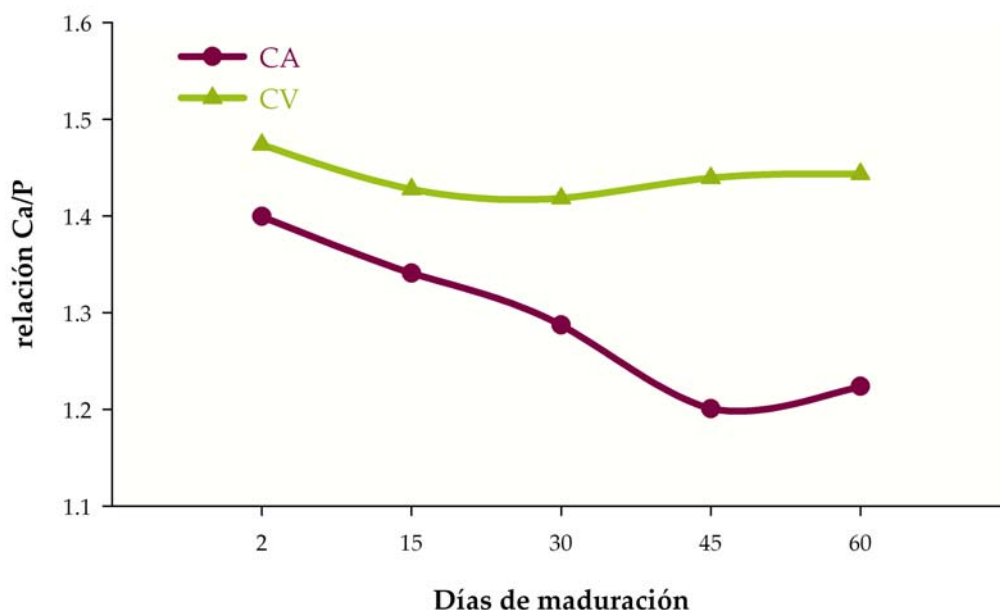


Figura 20. Evolución de la relación Ca/P a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

El contenido en sodio (Na) (**Figura 21**) de los quesos se modificó significativamente ($p < 0,05$) a lo largo de todo el periodo de la maduración de los

mismos. Se ha observado, como cabría esperar, una correlación positiva ($p < 0,05$) entre esta cantidad de Na y la concentración de sal de los quesos y, una evolución muy similar, con un fuerte incremento durante los primeros días de maduración. Estos resultados coinciden con lo observado en los quesos Armada (Fresno *et al.*, 1996) y Sainte- Maure (Pierre *et al.*, 1999).

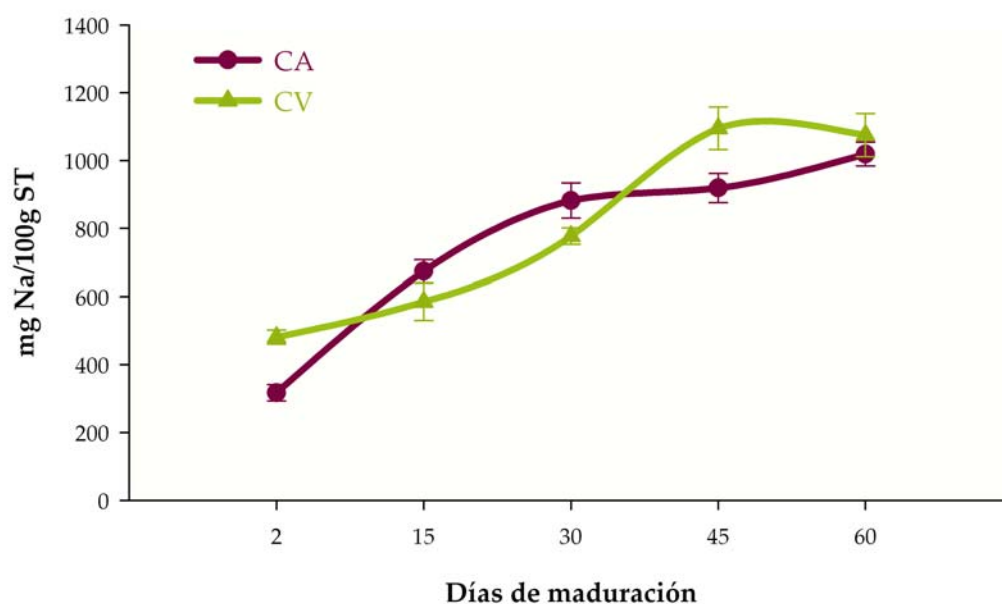


Figura 21. Evolución del contenido en Na (en mg/100g ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

Los valores detectados fueron muy similares a los encontrados en el queso Armada, elaborado con leche de cabra, que presentó valores medios de 1.050 mg/100g de ES (Fresno *et al.*, 1996), en queso de cabra semicurado producido en Tenerife en donde se encontraron valores de 1.020 o 1.090 mg de Na/100g de ES (Herrera *et al.*, 2006; García *et al.*, 2006), el queso de Los Pedroches (Pino, 2007) con 835 mg/100g ES, o el queso Aracena (Fernández-Salguero y Gómez, 1997); superiores a los de los quesos Sainte-Maure (Pierre *et al.*, 1999) y Babia-Laciana (Fresno *et al.*, 1995) y algo inferiores a los observados en el queso Valdeteja (Fresno *et al.*, 1995), en el queso Alhama de Granada (Fernández-Salguero y Gómez, 1997), o en el queso Majorero (Marcos *et al.*, 1985), donde se encontraron

valores medios de 1.605, y 1.171 mg de Na/100g ES, respectivamente. Estas diferencias pueden deberse al método de elaboración del queso, al tiempo que permanece éste en la salmuera, así como, a la concentración de NaCl de la misma.

Se puede observar que los quesos elaborados con CV presentan un contenido medio en Na ligeramente superior al observado en quesos elaborados con CA, sin embargo, estas diferencias no son significativas ($p > 0,05$). Este hecho también fue observado en el queso de oveja por Sanjuán *et al.* (1998).

El contenido de potasio (K) de los quesos aumentó ligeramente a lo largo de la maduración (**Figura 22**), aunque sólo se establecieron diferencias significativas ($p < 0,05$) al final de la misma, en los quesos elaborados con CA. Se observan valores similares a los detectados en otros quesos de cabra (Fresno *et al.*, 1995; Pierre *et al.*, 1999), e inferiores a quesos como el Armada (Fresno *et al.* 1996), Xinotyri (Bontinis *et al.*, 2008), o Los Pedroches (Pino, 2007), con valores medios de 224, 254, y 206 mg K/100g ES, respectivamente. En el queso de Málaga y en el queso de Cádiz, ambos elaborados con leche de cabra, Marcos *et al.* (1983) indicaron valores de 284 y 233 mg de K/100g ES. Por otro lado, en un estudio similar en queso Majorero y queso Ibores, Marcos *et al.* (1985) hallaron valores medios de 280 y 225 mg/100 ES, respectivamente.

El contenido en K también se vió modificado por el tipo de coagulante empleado, observándose valores más elevados en CA, al igual que en los contenidos en Ca. No obstante, sólo se establecieron diferencias significativas a los 45 días de maduración ($p < 0,05$). Este hecho puede estar provocado por las diferencias en AT detectadas entre los dos tipos de quesos. Como consecuencia de una mayor acidificación de la cuajada en los quesos elaborados con CV, los minerales, principalmente los que no se encuentran en el fosfato cálcico coloidal asociados a la micela, se eliminan en el lactosuero (Prieto *et al.*, 2002); siendo las pérdidas mayores, a medida que la acidez es mayor. Por otra parte, Almenara *et al.* (2007), han comprobado en quesos de cabra que, la eliminación en el suero como consecuencia de la acidez, es mayor en el caso del K y Mg.

En otras variedades de quesos elaborados con CV y leche de oveja (Prados, 2005; Tejada, 2001) y de cabra (Pino, 2007) no se han observado diferencias significativas, aunque también se observaron valores más elevados en quesos elaborados con CA.

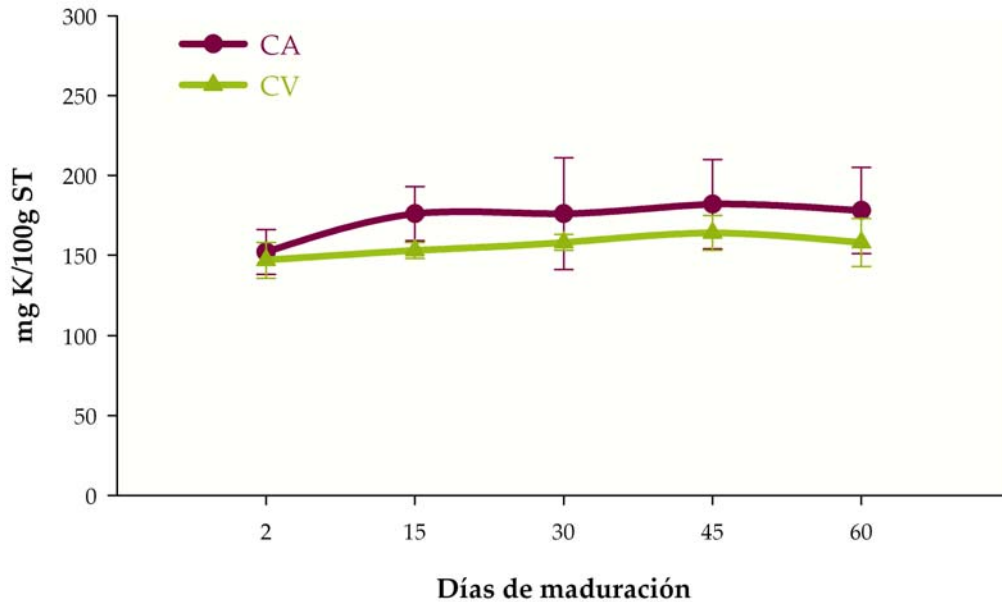


Figura 22. Evolución del contenido en K (en mg/100g ST) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

4.1.1.2.b) Microminerales

En la **Tabla 12** y las **Figuras, 23, 24, 25** y **26** se muestran las medias y las desviaciones estándar (en $\mu\text{g}/100\text{g ST}$), de los microminerales cobre (Cu), manganeso (Mn), hierro (Fe) y cinc (Zn), de los quesos elaborados con coagulante vegetal en (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración. De igual forma, se presentan los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas mediante el test LSD.

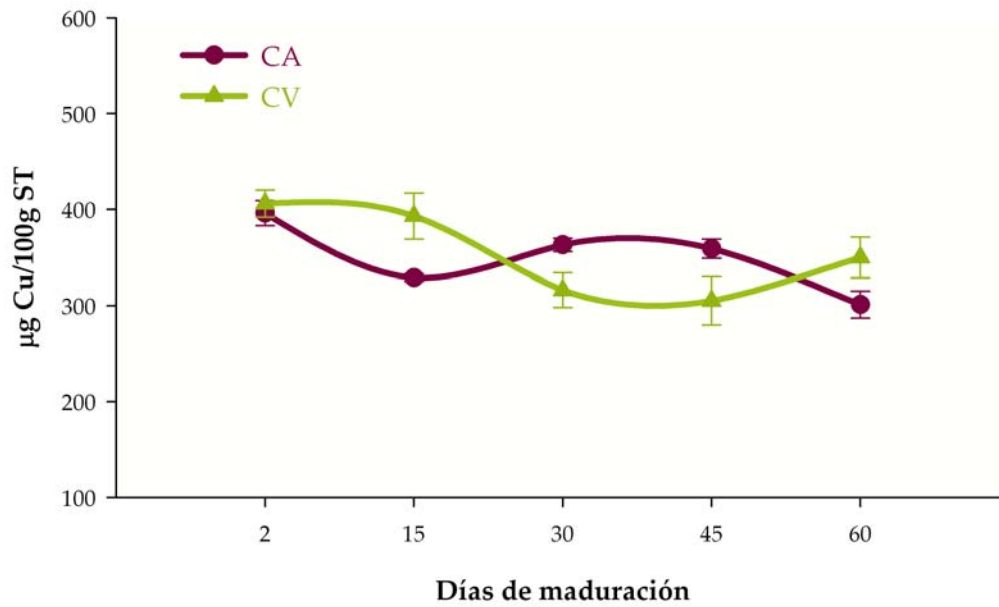


Figura 23. Evolución del contenido de Cu (en $\mu\text{g}/100\text{g ST}$) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

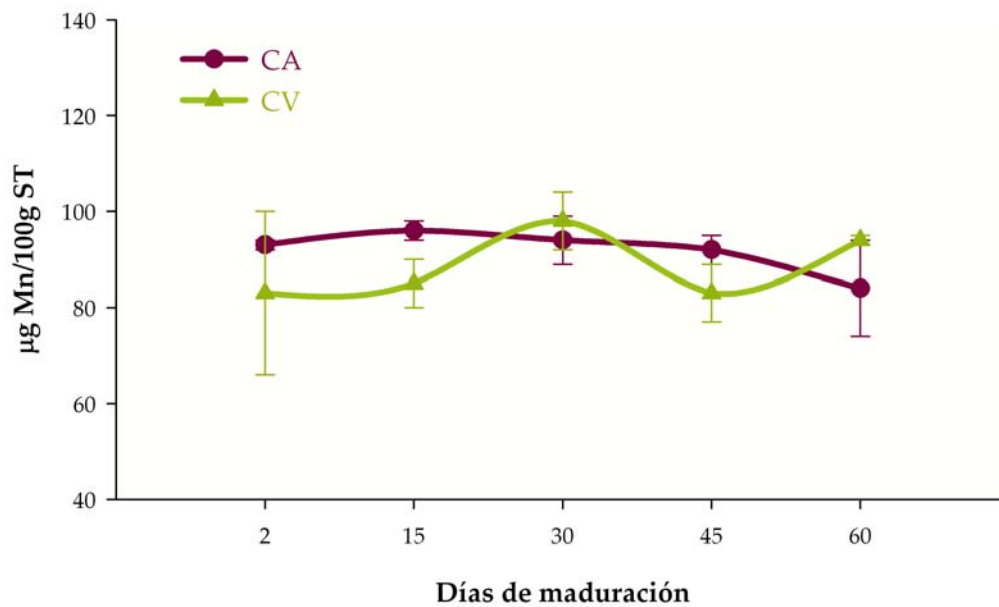


Figura 24. Evolución del contenido de Mn (en $\mu\text{g}/100\text{g ST}$) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

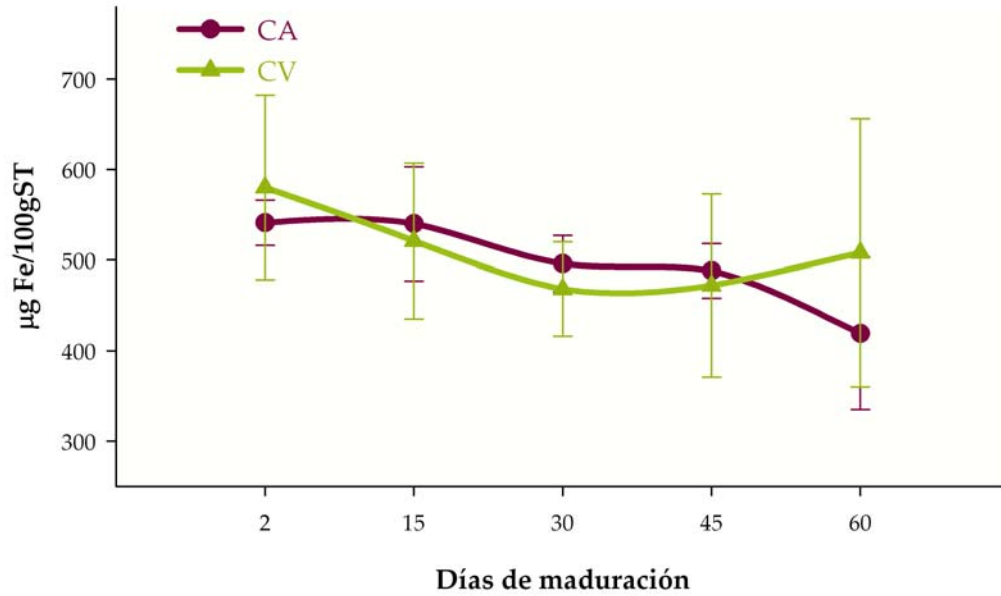


Figura 25. Evolución del contenido de Fe (en $\mu\text{g}/100\text{g ST}$) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

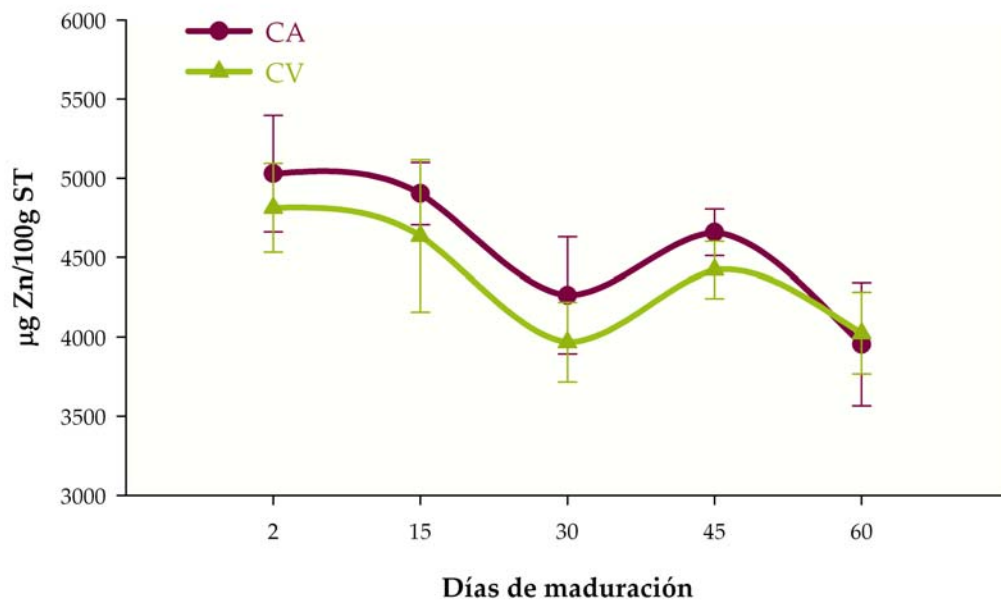


Figura 26. Evolución del contenido en Zn (en $\mu\text{g}/100\text{g ST}$) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA)

Como suele ser habitual en quesos, el Zn y el Fe fueron los microelementos más abundantes en todos los lotes, mientras que los contenidos de manganeso y cobre fueron los más bajos.

Se ha observado para todos los microminerales estudiados, una tendencia descendente en su concentración a lo largo de la maduración, aunque sólo en el caso del Cu, Zn y Fe, se detectaron unas diferencias significativas ($p < 0,05$); no así para el Mn ($p > 0,05$). En el queso Armada (Fresno *et al.*, 1996) y en otros quesos de oveja (Moreno *et al.*, 1994a; Macedo *et al.*, 1997b) o de vaca como el queso Prato (Cichoski *et al.*, 2002) se observó una tendencia muy similar.

Al comparar nuestros datos con los obtenidos por otros autores observamos que, Fernández-Salguero y Gómez (1997), detectaron en los quesos de Alhama de Granada y Aracena valores inferiores para la mayoría de los microminerales estudiados. En el queso Majorero se han observado valores muy similares para el Zn y algo inferiores para Fe y Cu (Fernández-Salguero *et al.*, 1981). En el queso Armada (Fresno *et al.*, 1996) se observaron valores inferiores para Cu, Zn y Fe, mientras que en el Babia-Laciana (Fresno *et al.*, 1995) fueron superiores para el Zn, Fe y Cu. En quesos canarios semiduros (García *et al.*, 2006) y en el queso de Los Pedroches se observan valores medios superiores para el Fe e inferiores para el Cu y el Zn, mientras que Almenara *et al.* (2007) apuntó en quesos elaborados con leche de cabra Majorera valores de Fe inferiores a los nuestros y superiores en Cu y Zn (con 1,01, 0,74 y 18,81 mg/Kg queso fresco, respectivamente).

Los contenidos de manganeso no se modificaron significativamente ($p > 0,05$) durante la maduración, alcanzando valores de 84 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ES. Resultado similar al encontrado en queso Armada (Fresno *et al.*, 1996) y en queso Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003) con valores medios de manganeso de 89 y 139 mg/100g de ES, respectivamente. Igualmente en queso de cabra Ibores y Majorero (Marcos *et al.*, 1985) y en queso Alhama de Granada (Fernández-Salguero y Gómez, 1997) encontraron valores superiores a los hallados en este trabajo, mientras que en el queso de Los Pedroches (Tejada, 2001; Pino, 2007) y en el queso Prato (Cichoski *et al.*, 2002) se detectaron valores inferiores a los nuestros.

Las diferencias encontradas entre el contenido de minerales de las diferentes variedades de queso se deben, fundamentalmente, a distintos factores como la tecnología utilizada para la elaboración del queso, la raza de las cabras de donde

proceda la leche, la estación del año de producción de la misma, el régimen de explotación o el tipo de alimentación de los animales.

El tipo de coagulante no afectó de forma significativa ($p > 0,05$) a los contenidos de los microminerales del queso de Murcia al Vino, aunque se observan valores ligeramente superiores en las muestras elaboradas con CV.

Se han encontrado en la bibliografía resultados similares a los nuestros. Sánchez (1999) en quesos artesanos, y Tejada (2001) y Prados (2005) en el queso de Los Pedroches, detectaron también mayores contenidos de hierro y manganeso en los quesos elaborados con CV respecto a los elaborados con CA, a partir del día 30 de su maduración; no encontrando diferencias significativas para el contenido en Zn o en Cu.

Teniendo en cuenta que, al haber utilizado la misma leche y la misma tecnología de elaboración en todos los lotes de quesos, el contenido ligeramente superior de estos microminerales en las piezas elaboradas con el CV sólo puede atribuirse a la mayor presencia de estos elementos en el extracto vegetal del cardo. Sanjuán *et al.* (1998) sólo detectó diferencias significativas para los contenidos en Zn en los lotes de quesos elaborados con cuajo animal. Pino (2007), detectó en un queso de leche de cabra un mayor contenido de Fe en los quesos elaborados con un CV, que en los elaborados con CA (con valores de 477 y 450 $\mu\text{g}/100\text{g ST}$ respectivamente a los 60 días de maduración). Los valores para el Mn, al contrario que sucede en el queso de Murcia al Vino, fueron mayores en los quesos elaborados con CA (presentando valores de 60 $\mu\text{g}/100\text{g ST}$ frente a los 42 $\mu\text{g}/100\text{g ST}$ de los quesos elaborados con CV). Mientras que, no observó diferencias significativas entre los quesos elaborados con CA y CV, en los contenidos en Zn y en Cu.

4.1.1.2.c) Análisis multivariante

Análisis discriminante (AD)

- Aplicación con relación al tiempo de maduración

Tal y como se puede comprobar en la **Tabla 13**, después de aplicar el AD a los elementos minerales analizados, siguiendo los mismos criterios que los utilizados en el apartado anterior, las variables Na, Cu y Zn son las que contribuyen en mayor medida a la diferenciación de los quesos con distinto tiempo de maduración, presentando valores de F y de Lambda de Wilks de 340,72, 211,18 y 209,69, respectivamente, y de 0,01, 0,02 y 0,02, respectivamente.

Tabla 13. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	Ca	P	Na	K	Cu	Mn	Fe	Zn
Lambda de Wilks	0,06	0,04	0,01	0,05	0,02	0,23	0,03	0,02
Valor F	67,95	121,14	340,72	92,51	211,18	14,90	141,04	209,69

Al observar las distancias establecidas entre los distintos periodos de maduración (**Tabla 14**), vemos que las diferencias menos marcadas se establecen entre los quesos madurados con 2 y 15 días, presentando una distancia de los cuadrados de Mahalanobis de 235,78. En otras variedades de queso revisadas en la bibliografía (Tejada, 2001 y Pino, 2007), el AD estableció la menor distancia entre los quesos elaborados entre los 15 y 30 días y los 15 y 60 días, respectivamente. Y, como también era de esperar, la máxima distancia se estableció entre los quesos madurados durante 2 y 60 días.

Tabla 14. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis

	2	15	30	45	60
2	0,0	235,8	307,9	1428,3	3261,2
15	235,8	0,0	428,7	933,0	2712,7
30	307,9	428,7	0,0	711,2	1898,0
45	1428,3	933,0	711,2	0,0	493,9
60	3261,2	2712,7	1898,0	493,9	0,0

A partir de las funciones de clasificación, se obtuvo la matriz de clasificación (Tabla 15) en la que aparecen la totalidad de los quesos correctamente clasificados.

Tabla 15. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	2	15	30	45	60
2	100	6	0	0	0	0
15	100	0	6	0	0	0
30	100	0	0	6	0	0
45	100	0	0	0	6	0
60	100	0	0	0	0	6
Total correcto	100	6	6	6	6	6

En la Figura 27 y mediante las dos primeras funciones canónicas, se representa en un diagrama de dispersión los quesos con 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

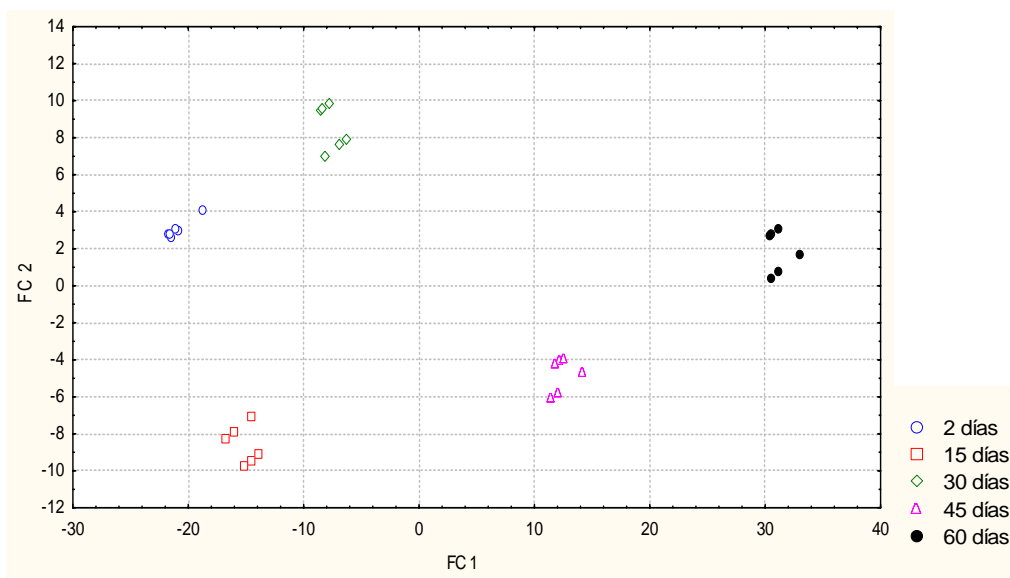


Figura 27. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2

- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante

En la **Tabla 16** se pueden observar los valores de Lambda de Wilks y F de los elementos minerales, determinados en relación al tipo de coagulante empleado en su elaboración. Son el Ca, el P, y el Na, las variables que presentaron mayor capacidad discriminante de los quesos elaborados con los diferentes coagulantes, ya que muestran valores de Lambda de Wilks y de valor F de 0,15, 0,49 y 0,57, y de 114,79, 22,01 y 16,13, respectivamente.

Tabla 16. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	Ca	P	Na	K	Cu	Mn	Fe	Zn
Lambda de Wilks	0,15	0,49	0,57	0,99	0,98	0,86	0,88	0,97
Valor F	114,79	22,01	16,13	0,20	0,53	2,73	2,95	0,67

Hay que destacar que los valores de Lambda de Wilks de algunos minerales, están muy próximos a la unidad, indicando una escasa capacidad discriminante. Este es un resultado coincidente con el hecho de no haber encontrado, en líneas generales, diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el contenido de minerales de los quesos elaborados con CV y CA.

Mediante la función discriminante obtenida podemos clasificar correctamente el 100 % de los quesos como se observa en la matriz de clasificación (**Tabla 17**), discriminándose perfectamente los quesos elaborados con distinto coagulante.

Tabla 17. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	CA	CV
CA	100	15	0
CV	100	0	15
Total correcto	100	15	15

4.1.1.3. Ácidos grasos

La **Tabla 18** muestra los valores de las concentraciones de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos totales), de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración.

Los valores de los ácidos grasos esterificados no se modificaron de forma significativa ($p < 0,05$) a lo largo de la maduración, coincidiendo con los resultados obtenidos en otras variedades de queso de cabra (Marcos *et al.*, 1984; Gómez *et al.*, 1987; Gómez *et al.*, 1991; Fernández-Salguero y Gómez, 1997).

Los ácidos grasos más abundantes a los 60 días, en el queso de Murcia elaborado con CA fueron el ácido palmítico (C_{16:0}) y el ácido oleico (C_{18:1}), (con valores de 28,66% y 19,14%, respectivamente) seguidos del ácido esteárico (C_{18:0}) y el mirístico (C_{14:0}), que representan aproximadamente el 70% del total de los ácidos grasos. Estos valores coinciden con los encontrados en los quesos Cendrat del Montsec (Carretero *et al.*, 1992), Badaia (Marcos *et al.*, 1985), Palmero (Gómez *et al.*, 1991) y queso Urfa (Atasoy y Türkoglu, 2009). En otras variedades de queso de cabra como los de Cádiz, Málaga, Aracena y Sierra Morena (Fernández-Salguero y Gómez, 1997), o en quesos de cabra elaborados con tecnología del queso Manchego (Póveda *et al.*, 2006), el ácido oleico presentó valores ligeramente superiores a los del ácido palmítico.

En la **Tabla 19** se representa la evolución de las concentraciones relativas de ácidos grasos de cadena corta, media y larga, así como de ácidos grasos insaturados y saturados (en porcentaje sobre los valores totales) para los quesos elaborados con CA y con CV.

Tabla 18. Evolución de los ácidos grasos esterificados (g/100g ácidos grasos) de muestras de queso de Murcia al Vino obtenidas con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración

Coagulante	Días de maduración									
	2		15		30		45		60	
	CV	CA	CV	CA	CV	CA	CV	CA	CV	CA
C4:0	2,80	2,28	2,13	1,81	2,68	1,56	2,24	1,24	1,64	1,63
C6:0	3,32	2,65	2,52	2,24	3,33	2,06	2,72	1,52	2,08	2,12
C8:0	3,93	3,09	2,96	2,77	4,01	2,64	3,29	1,98	2,61	2,69
C10:1	0,23	0,19	0,19	0,16	0,23	0,18	0,21	0,13	0,17	0,17
C10:0	12,41	10,00	9,65	9,54	12,57	9,50	10,73	7,36	8,88	9,39
C12:0	4,53	3,99	3,91	3,92	4,57	3,98	4,22	3,35	3,75	3,91
C13:0	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06
C14:0i	0,09	0,19	0,08	0,06	0,08	0,10	0,10	0,07	0,10	0,08
C14:1	0,08	0,09	0,05	0,08	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05
C14:0	9,67	9,32	9,25	9,46	9,68	9,53	9,63	9,00	9,33	9,45
C15:0i	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,16	0,14	0,14	0,14	0,14
C15:1	0,20	0,20	0,20	0,19	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
C15:0	0,59	0,60	0,61	0,61	0,61	0,63	0,62	0,62	0,62	0,61
C16:0i	0,22	0,27	0,24	0,19	0,23	0,26	0,23	0,24	0,24	0,24
C16:1	0,55	0,58	0,58	0,58	0,57	0,60	0,58	0,61	0,61	0,59
C16:0	26,75	27,84	27,95	28,56	26,53	28,56	27,77	29,87	28,81	28,66
C17:0i	0,27	0,29	0,30	0,31	0,28	0,31	0,30	0,32	0,32	0,31
C17:1	0,25	0,25	0,25	0,26	0,24	0,26	0,25	0,27	0,26	0,26
C17:0	0,46	0,49	0,51	0,53	0,49	0,54	0,51	0,57	0,55	0,53
C18:2	2,61	3,08	3,03	3,08	2,73	3,15	2,90	3,35	3,19	3,11
C18:1	17,19	18,84	19,23	19,25	16,91	19,34	18,19	21,20	19,70	19,40
C18:3	2,63	2,94	2,99	2,98	2,57	2,98	2,78	3,24	3,07	3,04
C18:0	10,38	11,68	11,98	12,02	10,33	12,14	11,21	13,33	12,38	12,15
C19:0	0,56	0,63	0,64	0,67	0,59	0,67	0,62	0,73	0,68	0,66
C20:1	0,04	0,06	0,07	0,08	0,00	0,08	0,05	0,08	0,09	0,09
C20:0	0,04	0,05	0,21	0,05	0,17	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05
C21:1	0,00	0,21	0,08	0,20	0,00	0,22	0,20	0,23	0,22	0,21
C21:0	0,00	0,00	0,18	0,17	0,12	0,19	0,13	0,19	0,19	0,18
TOTAL	100,01	100,01	99,99	99,96	99,99	100,02	100	100,01	100	99,99

Tabla 19. Concentraciones relativas de los ácidos grasos (% de los valores totales) de los quesos de Murcia al Vino obtenidos con coagulante vegetal (CV) y cuajo animal (CA) a lo largo de la maduración

	Días de maduración									
	2		15		30		45		60	
	CV	CA	CV	CA	CV	CA	CV	CA	CV	CA
Cadena corta	9,14	8,03	7,61	6,82	10,02	9,26	8,25	7,34	6,33	6,45
Cadena media	27,07	24,34	23,20	23,28	26,27	23,41	25,02	22,31	22,35	23,11
Cadena larga	63,79	68,13	69,19	69,90	63,71	67,33	66,74	70,35	71,32	70,44
PUFA	5,24	6,02	6,02	6,06	5,30	6,13	5,69	6,59	6,26	6,16
MUFA	18,54	20,40	20,65	20,82	18,21	20,94	19,74	22,78	21,31	20,97
Insaturados	23,78	26,42	26,85	27,06	23,63	25,57	25,56	27,96	27,76	27,30
Saturados	76,22	74,08	73,15	72,94	76,37	74,43	74,44	72,04	72,24	72,70
C _{12:0} /C _{10:0}	0,37	0,38	0,41	0,41	0,40	0,42	0,39	0,39	0,42	0,42

Se puede ver que los porcentajes medios de ácidos grasos de cadena corta (C_{4:0} + C_{6:0} + C_{8:0}), media (C_{10:0} + C_{10:1} + C_{12:0} + C_{13:0} + C_{14:0i} + C_{14:1} + C_{14:0}) y larga (desde C_{15:0i} a C_{21:0}) fueron de 8,16 %, 24,51 % y 67,38 %, respectivamente. Aunque los ácidos grasos de cadena media y larga presenten altas concentraciones, no contribuyen decididamente al flavor de los quesos (Freitas y Malcata, 1998). Se han encontrado porcentajes de ácidos grasos muy similares a los nuestros en quesos turcos como el Urfa (Atasoy y Türkoglu, 2009), donde aparecen valores de 4,0, 25,1 y 70% para los ácidos grasos de cadena corta, media o larga, respectivamente. No obstante, otros autores como Marcos *et al.* (1984) y Gómez *et al.* (1987) observaron en el queso de los Ibores valores ligeramente superiores para los ácidos grasos de cadena corta y larga (10,89% y 26,41%, respectivamente) e inferiores (61,75%) para los ácidos grasos de cadena larga.

Se observa que los ácidos caprílico (C_{8:0}), mirístico (C_{14:0}) y palmítico (C_{16:0}) son los principales ácidos grasos de cadena corta, media y larga, respectivamente. En general, los porcentajes de ácidos grasos esterificados obtenidos son muy similares a los observados en otras variedades de queso de cabra aunque, como se

ha dicho anteriormente, existen algunas excepciones en donde se han observado mayores porcentajes de C_{16:0} y menores de C_{18:1}.

Desde un punto de vista nutricional, es importante destacar el contenido de ácidos grasos insaturados del queso de Murcia al Vino. Todos los quesos estudiados contienen más de un 25%, de los cuales el ácido oleico (C_{18:1}), es el mayoritario (**Figura 28**).

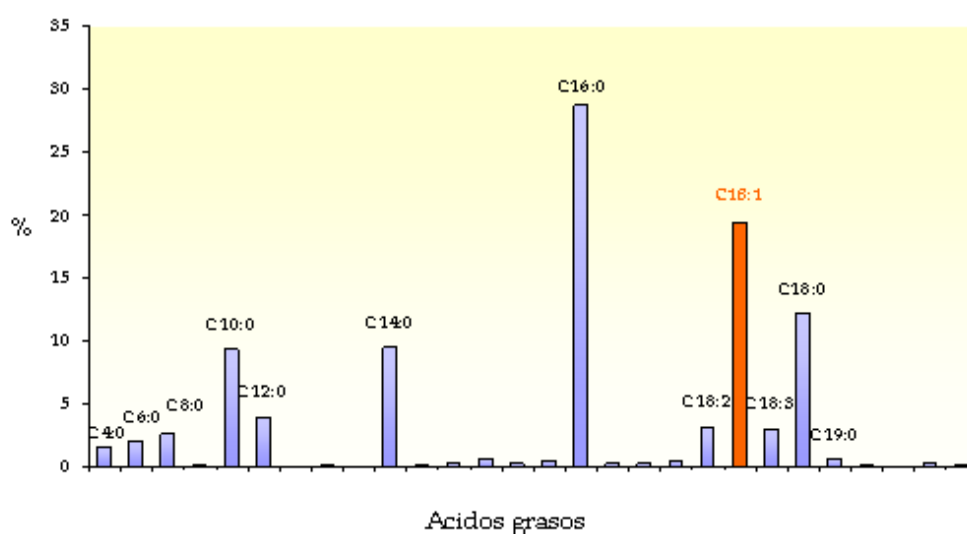


Figura 28. Porcentaje de ácidos grasos esterificados en el queso de Murcia al Vino

En el queso de Murcia al Vino la relación C_{12:0} /C_{10:0} se mantiene en los rangos característicos de los quesos de cabra, cuyo valor es de 0,4, muy distinto de los valores que presentan quesos de vaca y oveja que presentan valores de 1,16 y 0,6, respectivamente (Iverson y Sheppard, 1989).

El tipo de coagulante utilizado tampoco afectó de forma significativa ($p > 0,05$) a los porcentajes de ácidos grasos esterificados de los quesos, coincidiendo con lo observado en quesos de oveja (Tejada *et al.*, 2003; Sanjuán *et al.*, 2002).

4.1.1.4. Valor calórico

En la **Tabla 20**, se muestran las medias y desviaciones estándar de las Kilocalorías obtenidas por cada 100g de queso para los quesos elaborados con cuajo animal y vegetal a lo largo de la maduración. Los valores de las kilocalorías se calcularon a partir de la composición química de los quesos (Energía total digerible (ETD), y Energía metabolizable (EM)), y mediante la bomba calorimétrica (Energía total (ET)).

Tabla 20. Energía total (ET), energía metabolizable (EM) y de energía total digerible (ETD) (valores de Kcal/100g queso) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV

	Días de maduración				
	2	15	30	45	60
CA					
ET	407 ± 19 ^a	444 ± 26 ^a	458 ± 18 ^a	470 ± 14 ^a	485 ± 26 ^b
ETD	392 ± 23 ^a	415 ± 16 ^b ^c	444 ± 25 ^a	458 ± 31 ^b	470 ± 31 ^b
EM	368 ± 12 ^b	400 ± 23 ^c	412 ± 18 ^b	415 ± 10 ^c	438 ± 21 ^c
CV					
ET	408 ± 37 ^a	451 ± 17 ^a	468 ± 19 ^a	479 ± 23 ^a	493 ± 16 ^b
ETD	386 ± 49 ^a	421 ± 27 ^b	438 ± 23 ^b	454 ± 27 ^b	462 ± 23 ^b
EM	363 ± 26 ^b	404 ± 16 ^c	421 ± 14 ^b	427 ± 20 ^c	436 ± 10 ^c

a-c. Valores dentro de la misma columna sin superíndice coincidente son diferentes estadísticamente ($p < 0,05$).

En la **Figura 29** y **30** se representan los valores medios y las desviaciones estándar de las Kilocalorías obtenidas por 100g de queso para los quesos elaborados con CA y CV a partir de la composición química (ETD y EM) y mediante la bomba calorimétrica (ET).

Se observa un incremento altamente significativo ($p < 0,001$) de la energía total (ET y ETD) y la metabolizable (EM) a lo largo de la maduración de los quesos, tanto para los elaborados con CA como con CV. Este hecho se corresponde con el incremento que experimentan los sólidos totales durante este periodo. Evoluciones ascendentes similares durante la maduración también se han detectado en otras variedades de queso de cabra, como el Armada (Fresno *et al.*, 1996), el Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003), o el queso de los Pedroches (Pino, 2007), en los cuales la EM se incrementó desde 334, 285 y 359 Kcal EM/100 g, a los

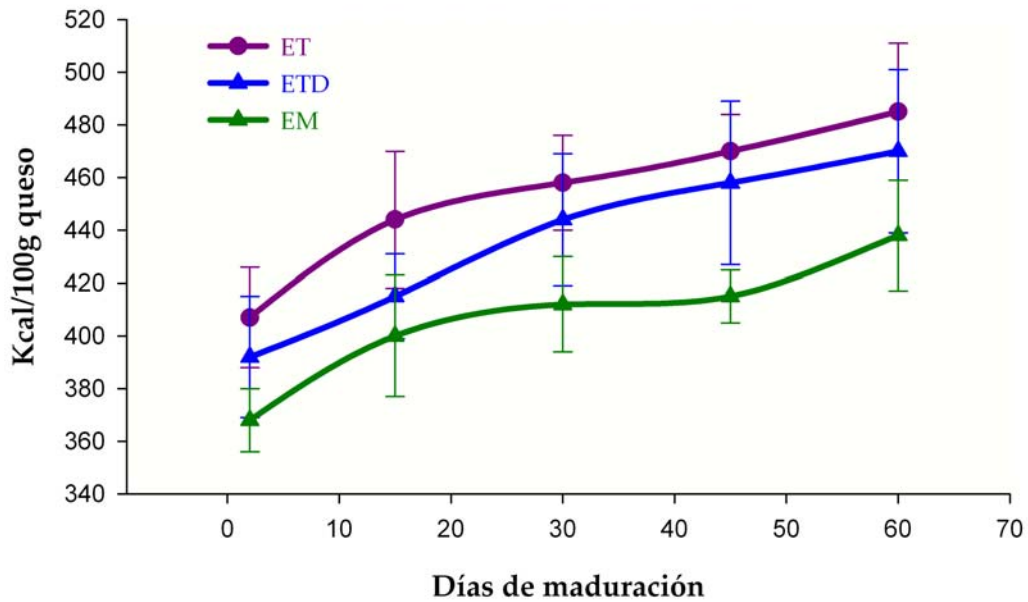


Figura 29. Evolución del contenido calórico (en kilocalorías/100g queso) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con cuajo animal (CA)

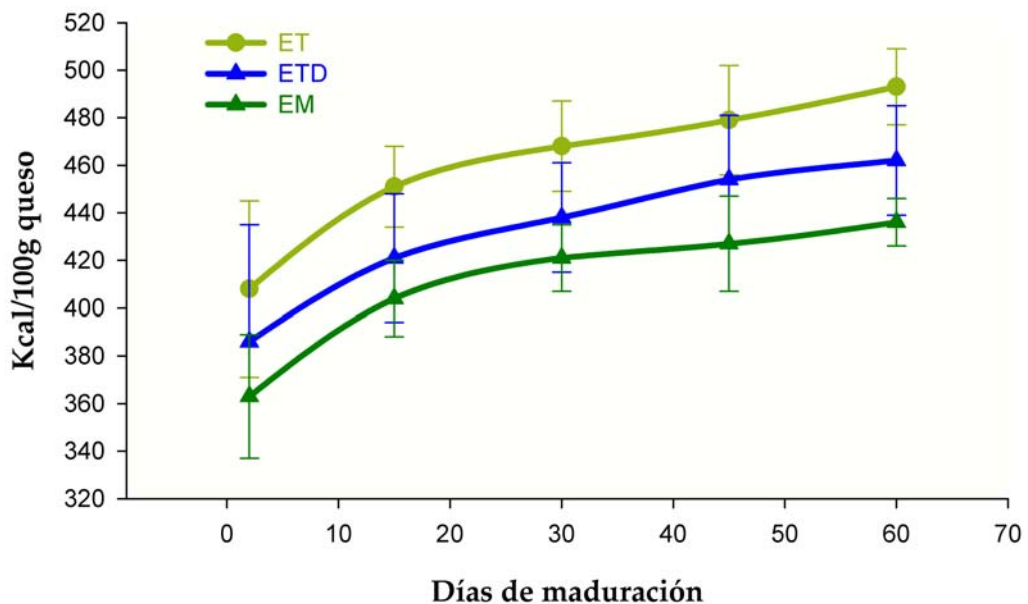


Figura 30. Evolución del contenido calórico (en kilocalorías/100g queso) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con coagulante vegetal (CV)

2 días, hasta los 534, 535 y 415 Kcal EM/100 g a los 60 días, respectivamente.

El mayor incremento en el valor calórico se ha detectado durante los primeros 15 días de maduración (una media de 35 Kcal EM/100g) para ir descendiendo a medida que esta avanza debido a que las mayores pérdidas de humedad se producen precisamente durante este periodo.

El método utilizado afectó de forma significativa ($p < 0,05$) a la determinación de valor calórico. De esta manera la energía bruta de los quesos, calculada por el calorímetro, fue superior a la determinada según Kathleen y Escott (2001), aunque en todos los casos no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Este hecho puede ser debido a que se comete mayor error a la hora de determinar la composición química de los quesos, que en la medición única que se hace con la bomba calorimétrica.

Como cabría esperar, los valores resultantes para la ET y ETD son superiores a los de la EM en los 2 tipos de quesos, ya que en esta última se tienen en cuenta las pérdidas digestivas y urinarias que se producen en el organismo (Kathleen y Escott, 2001). Por esta razón, para calcular esta EM, se utilizan factores de conversión ligeramente inferiores a los utilizados para calcular la energía bruta (Mataix, 2002). Además, se emplea, junto con la proteína y la grasa, el ácido láctico en lugar de la lactosa, ya que se considera que ésta sufre un proceso de fermentación y desaparece durante los primeros días de la maduración (Tejada, 2001).

Para observar mejor el efecto del coagulante sobre la energía del queso, en la **Figura 31** se representa la evolución del contenido calórico (en Kcal de ET/100g queso) de las piezas elaborados con CA y CV, a lo largo de toda la maduración. El tipo de coagulante utilizado en la elaboración de los quesos, no afectó de forma significativa ($p > 0,05$) a los valores de ET, ETD y EM; dado que tampoco se detectaron cambios significativos en la composición bruta de los quesos, tal y como se ha comentado en el apartado 4.1.1.1. Pino, (2007) en un estudio en queso de cabra de los Pedroches elaborados con dos tipos de coagulantes, tampoco encontró diferencias significativas en su contenido calórico (que fue de 415 y de 423 Kcal EM/ 100g queso para los quesos elaborados con CA y CV respectivamente). No obstante, hay autores que han observado en quesos de oveja elaborados con coagulante vegetal, un mayor valor calórico, debido a que las

concentraciones de grasa y de proteína detectadas en dichos quesos eran mayores (Sanjuán, 1992; Freitas y Malcata, 1996).

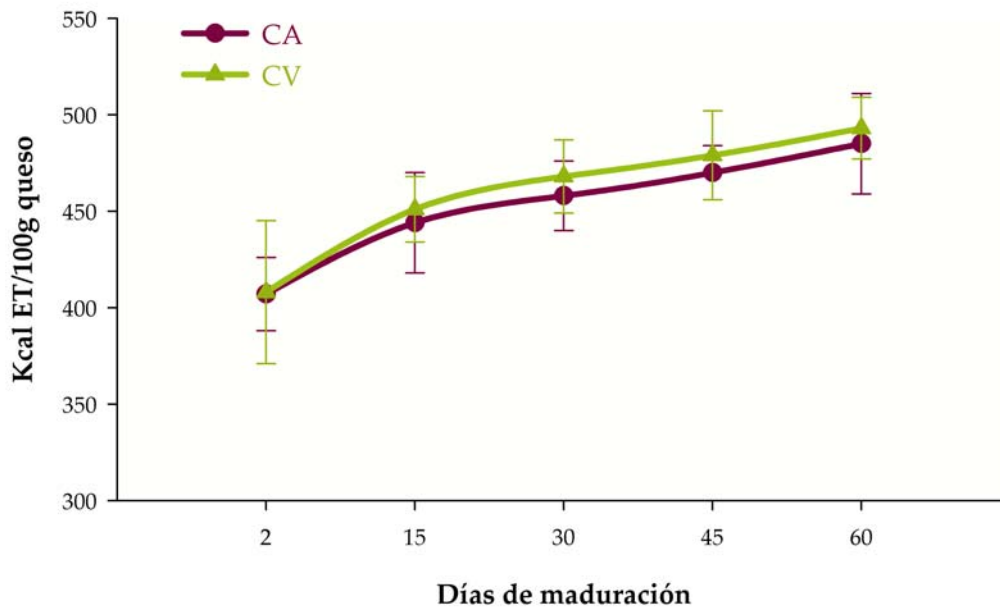


Figura 31. Evolución del contenido calórico (en kilocalorías ET/100g queso) a lo largo de la maduración de los quesos elaborados con CA y con CV

4.1.2. Proteolisis

4.1.2.1. *Proteolisis primaria, cambios en la fracción insoluble a pH 4,6, PAGE de caseínas*

Según Fox (1989), la proteolisis primaria puede definirse como los cambios en las caseínas y péptidos que pueden detectarse por métodos electroforéticos. La electroforesis en medio alcalino urea-PAGE es una técnica ampliamente empleada para el estudio de la proteolisis primaria durante la maduración del queso (Fox, 1989; Creamer, 1991).

A pesar de que en el gel sólo van a poder ser visualizados los péptidos de mayor tamaño, es una buena técnica para seguir la hidrólisis de las caseínas desde estadios tempranos de maduración, así como para la comparación del patrón de dicha hidrólisis en diferentes quesos (Creamer, 1975; Marcos *et al.*, 1979b).

Las bandas electroforéticas se han medido mediante densidad óptica tratándose, por tanto, de una técnica semicuantitativa, por lo que es difícil la interpretación de los resultados, aunque se controlen parámetros como las condiciones de separación, la aplicación de la muestra o las técnicas de teñido y cuantificación (McSweeney *et al.*, 1993).

En la **Tabla 21**, se muestra la evolución de las caseínas y de sus productos de degradación, expresadas como porcentaje de densidad óptica total, durante la maduración del queso de Murcia al Vino (medias y desviaciones estándar). Por otra parte, en la **Figura 32**, se representa el electroforegrama en Urea-PAGE de las fracciones insolubles a pH 4,6 de las muestras de queso elaboradas con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal (CV) a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

Tabla 21. Cambios en las fracciones caseínicas (valores medios y desviaciones standard), expresadas como % de densidad óptica total de muestras de queso de Murcia al Vino obtenidos con CA y CV a lo largo de la maduración

Tipo de coagulante	Días de maduración				
	2	15	30	45	60
CV					
γ_2 -CN	0,77±0,18 ^a	0,74±0,14 ^a	1,95±0,45 ^b	1,38±0,01 ^{ab}	0,85±0,01 ^a
γ_1 -CN	2,39±0,29 ^b	0,75±0,05 ^a	1,50±0,23 ^{ab}	0,71±0,08 ^a	0,99±0,01 ^a
γ_3 -CN	0,85±0,24 ^a	0,43±0,30 ^a	0,31±0,04 ^a	0,24±0,15 ^a	0,17±0,17 ^a
β -CN	29,1±0,58 ^b	28,4±1,34 ^{ab}	28,59±4,67 ^b	27,87±4,96 ^a	26,79±2,38 ^a
β -CN(f ₁₋₁₉₂)	7,21±3,72 ^a	8,74 ±0,99 ^a	8,66±0,83 ^a	8,74±2,04 ^a	9,41±2,20 ^a
α -CN	33,57±2,63 ^d	28,42±4,15 ^c	20,72±4,23 ^b	16,85±5,75 ^{ab}	13,61±3,60 ^a
pre- α -CN	16,79±4,98 ^{bc}	26,38±5,62 ^{cd}	28,45±7,58 ^{dc}	40,33±13,26 ^f	39,63±0,63 ^f
CA					
γ_2 -CN	2,25±0,01 ^{bc}	2,15±0,01 ^{bc}	2,46±0,20 ^{bc}	3,01±0,60 ^{cd}	3,31±0,18 ^d
γ_1 -CN	4,08±1,21 ^c	4,36±0,87 ^c	4,54±0,84 ^c	5,21±1,63 ^{cd}	6,31±1,28 ^d
γ_3 -CN	1,03±0,33 ^a	1,47±0,39 ^{ab}	1,89±0,46 ^{ab}	1,72±0,43 ^b	2,16±0,90 ^b
β -CN	37,48±3,57 ^d	36,34±0,32 ^{cd}	36,49±3,85 ^{cd}	33,38±5,66 ^{bc}	33,82±3,92 ^{bc}
β -CN(f ₁₋₁₉₂)	7,02±1,50 ^a	7,94±0,74 ^a	8,10±1,68 ^a	8,66±2,57 ^a	8,47±2,21 ^a
α -CN	36,52±1,96 ^d	28,77±2,24 ^c	25,98±1,19 ^{bc}	27,81±4,04 ^c	21,83±2,72 ^b
pre- α -CN	6,97±0,40 ^a	14,15±4,17 ^{ab}	19,04±3,02 ^{bc}	15,02±2,09 ^{ab}	14,89±3,71 ^{ab}

^{a-e} Resultados del test de Fisher (LSD). Medias del mismo parámetro sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

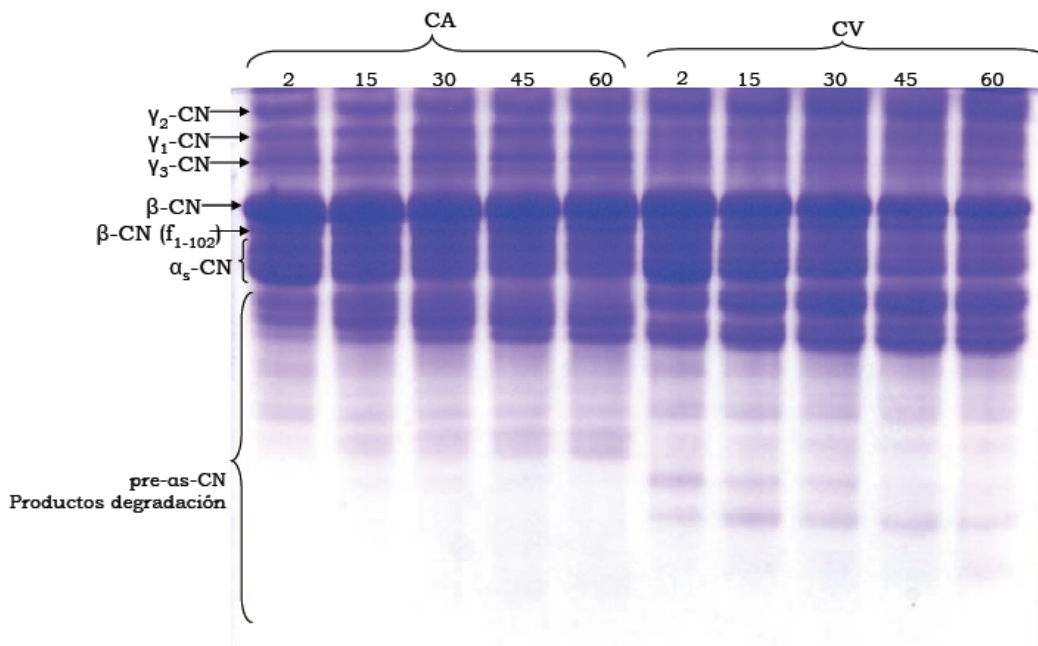


Figura 32. Urea-PAGE de las fracciones insolubles de extractos de quesos de Murcia al Vino obtenidos con CV y CA a lo largo de la maduración

4.1.2.1.a) Gamma-caseínas (γ -CN)

Las γ -CN, son las primeras bandas que aparecen en el electroforegrama (**Figura 32**), como consecuencia de su menor movilidad electroforética. Se han identificado las fracciones γ_2 -CN, γ_1 -CN y la γ_3 -CN, siguiendo las indicaciones de Trujillo *et al.* (1995).

El tiempo de maduración afectó de forma significativa ($p < 0,05$) a todas las γ -CNs (γ_1 -CN, γ_2 -CN y γ_3 -CN). Así, se puede observar que en quesos elaborados con CA, la γ_1 -CN experimentó un aumento continuo durante la maduración, que se hace más evidente a partir del día 30, aunque como se observan en los resultados de la comparación múltiple de medias (**Tabla 21**), sólo fue significativo ($p < 0,05$) a partir del día 45 de la misma. Las γ_2 -CN permanecieron estables hasta los 30 días de maduración para luego ir aumentando hasta los 60 días, donde los valores detectados fueron significativamente más elevados ($p < 0,05$). Por último, podemos observar como las γ_3 -CN aumentan también durante toda la

maduración, obteniéndose al final de la misma valores significativamente ($p < 0,05$) más elevados que al principio.

En la **Figura 33**, se representa la evolución que experimentan el total de las γ -caseínas (γ -CN) de los quesos de Murcia al Vino elaborados CA y con CV durante su maduración. Como se observa las γ -CN totales también aumentan de manera significativa ($p < 0,05$) a lo largo de la maduración, siendo muy claras las diferencias observadas entre quesos elaborados con distinto coagulante.

Las γ -CN son subproductos resultantes de de la hidrólisis de las β -CN, por la acción de la plasmina (Grappin *et al.*, 1985; Fox *et al.*, 1993a; Trujillo *et al.*, 1997b). Por tanto, la evolución ascendente que experimentan las γ -CN va acompañada de la degradación progresiva de las β -caseínas (β -CN) presentes en el queso a lo largo de la maduración. De hecho, algunos autores afirman que la γ_1 -caseína se correspondería con la fracción β -CN (f_{29-209}), la γ_2 -caseína con la β -CN ($f_{106-209}$) y la γ_3 -caseína con la β -CN ($f_{108-209}$) (Sousa *et al.*, 2001).

Los resultados en los quesos elaborados con CA son similares a los encontrados en la bibliografía para otros quesos, como en el queso Teleme (Mallatou *et al.*, 2004), en quesos elaborados con leche de cabra (Trujillo *et al.*, 2002), en el queso Kuflu (Hayaloglu *et al.*, 2008) o queso de cabra elaborado con dos coagulantes (Pino *et al.*, 2009) entre otros.

El tipo de coagulante utilizado afectó de manera significativa ($p < 0,001$) a la cantidad total de γ -CN de los quesos, detectándose unos valores más elevados en los elaborados con CA frente a los elaborados con CV (**Figura 31**). Además, los valores para los quesos CV disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) durante la maduración.

Los quesos elaborados con CA presentaron valores significativamente más elevados ($p < 0,01$) en cada una de las γ -caseínas detectadas (γ_1 -CN, γ_2 -CN y γ_3 -CN). Al comparar la tendencia en las evoluciones de las distintas fracciones de γ -CN analizadas (**Figuras 34, 35 y 36**) se comprueba que frente a la evolución ascendente que sufren las tres fracciones en los quesos elaborados con CA, en los elaborados con CV la evolución observada es muy irregular.

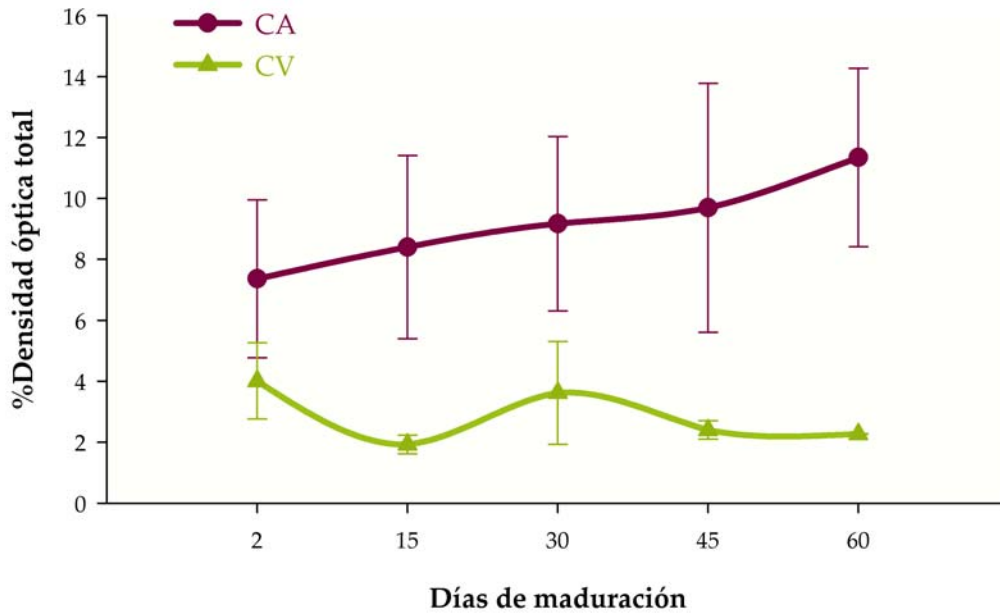


Figura 33. Evolución de las γ -caseínas (γ -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

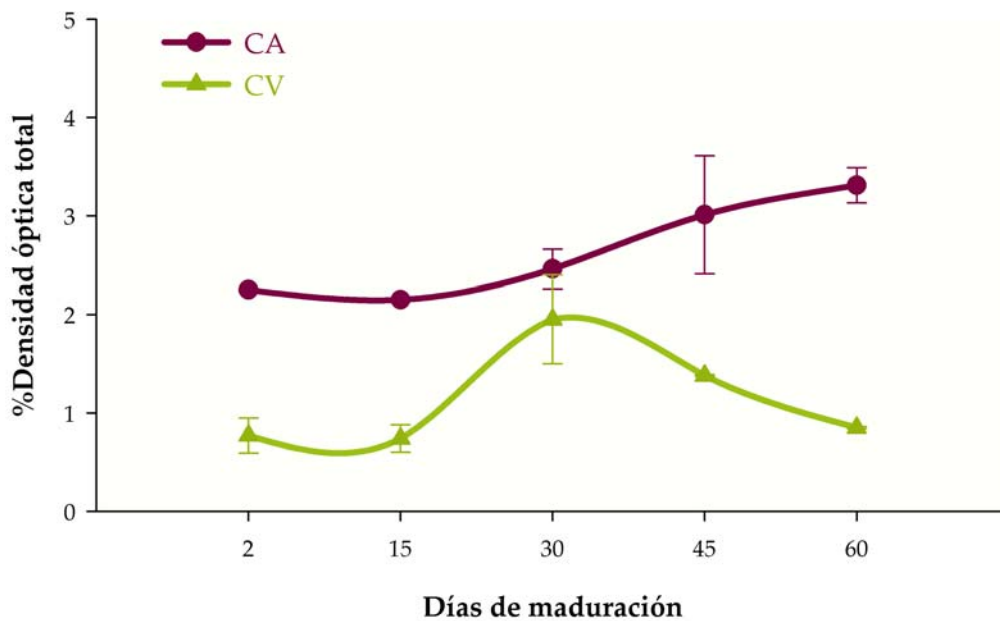


Figura 34. Evolución de las γ_2 -caseínas (γ_2 -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

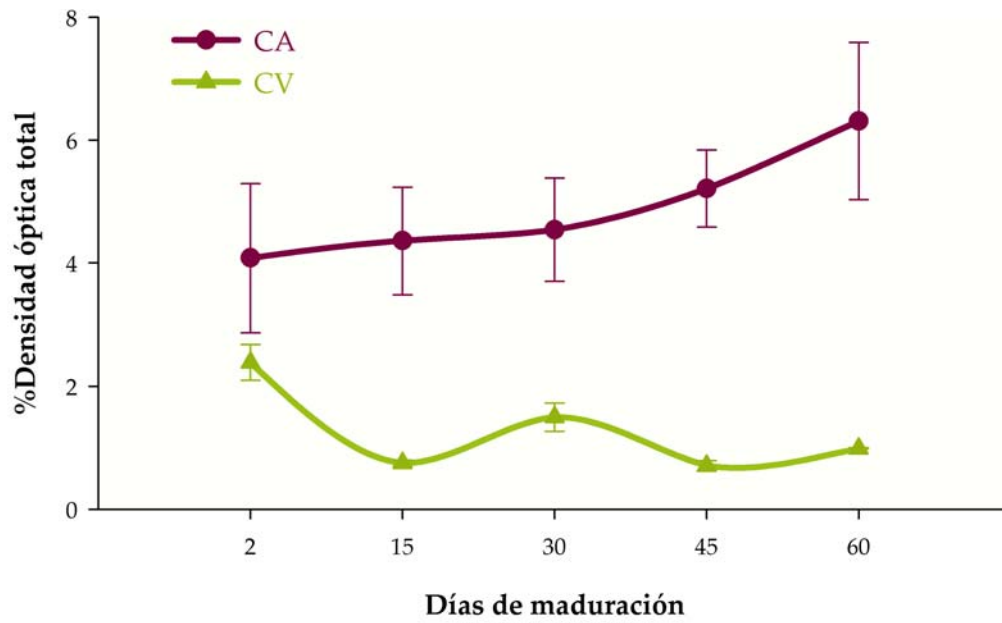


Figura 35. Evolución de las γ_1 -caseínas (γ_1 -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

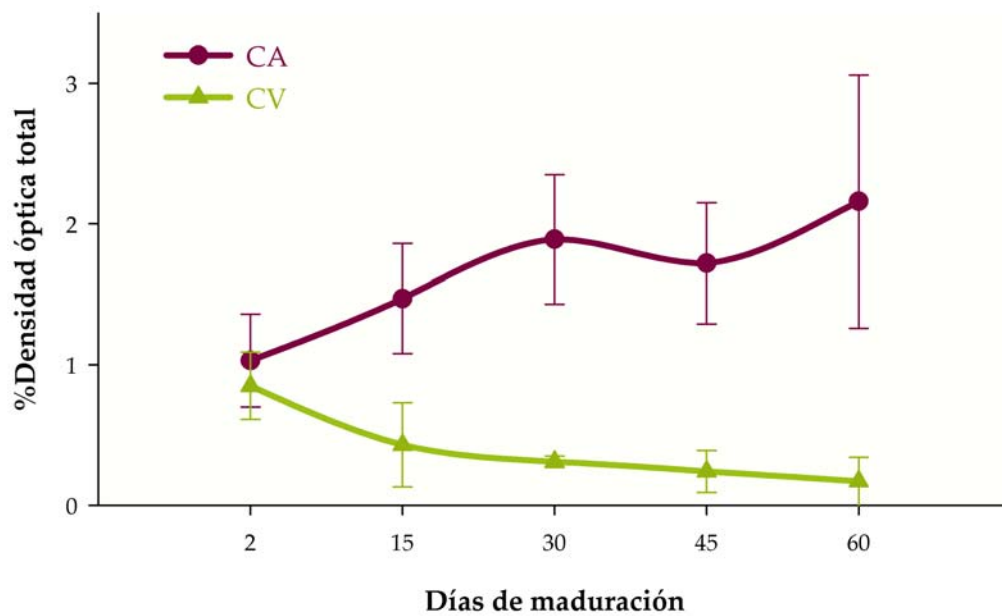


Figura 36. Evolución de las γ_3 -caseínas (γ_3 -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

Puesto que la materia prima y el proceso de fabricación utilizado para obtener las dos partidas de quesos fueron los mismos, el menor contenido de γ -CN en los quesos elaborados con CV, con respecto a los elaborados con CA, pudiera deberse a que las cinarasas tuvieran mayor capacidad de hidrolizar estas fracciones que la quimosina.

Resultados similares fueron encontrados por Pino (2007) en un estudio realizado en queso de los Pedroches. En éste se detectaron valores superiores de las γ -CN en los lotes de quesos elaborados con CA frente a los elaborados con CV, aunque se justificaron estos valores superiores por la diferente actividad que presentaba la plasmina en los quesos elaborados con diferentes coagulantes. Este autor sostiene que la menor actividad de la plasmina observada en los quesos elaborados con CV se debe, a que las cinarasas presentes en el coagulante vegetal inhiben su acción o impiden la activación del plasminógeno.

4.1.2.1.b) Beta-caseínas (β -CN)

Las β -CN presentan una movilidad ligeramente mayor que las γ -CN, y generalmente se van a resolver en el electroforegrama (**Figura 32**) como dos bandas, identificadas como β -CN y β -I-CN o β -CN (f_{1-192}).

En la **Tabla 21** y en la **Figura 37** se muestran los valores para las β -CN de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CA y CV a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

Tal y como se puede comprobar, el tiempo de maduración afectó significativamente ($p < 0,01$) al contenido de las β -CN del queso de Murcia al Vino. En los quesos elaborados con CA estas fracciones disminuyeron a lo largo de todo el periodo de maduración (con un porcentaje de descenso del 9,77%), habiéndose observado valores de 37,48% y de 33,82% de densidad óptica a los 2 y 60 días de la maduración, respectivamente. No obstante, en el análisis múltiple de medias (**Tabla 21**), se observa que hasta los 45 días de maduración no se establecieron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los quesos frescos con 2 días de maduración.

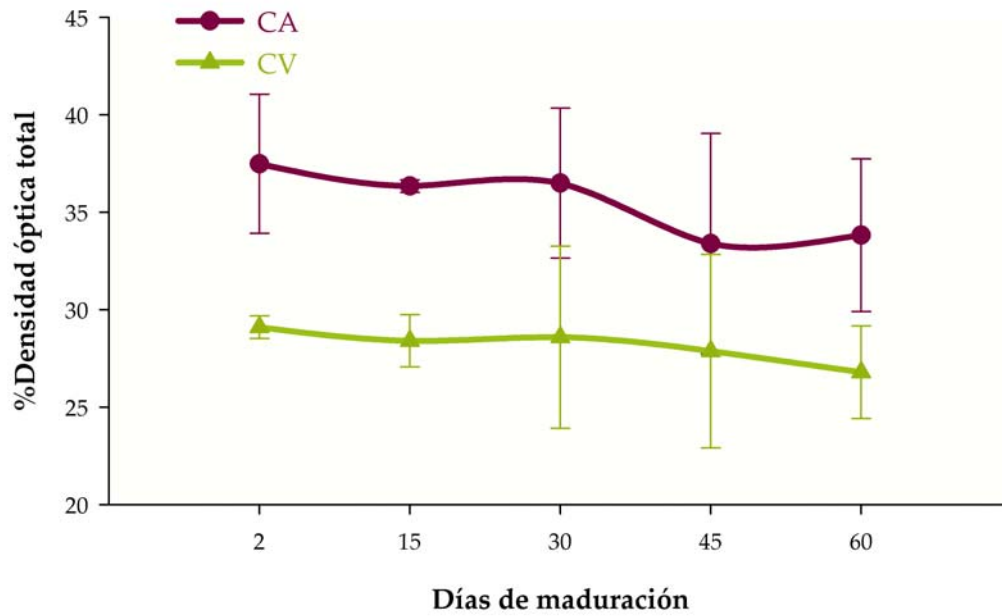


Figura 37. Evolución de las β -caseínas (β -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

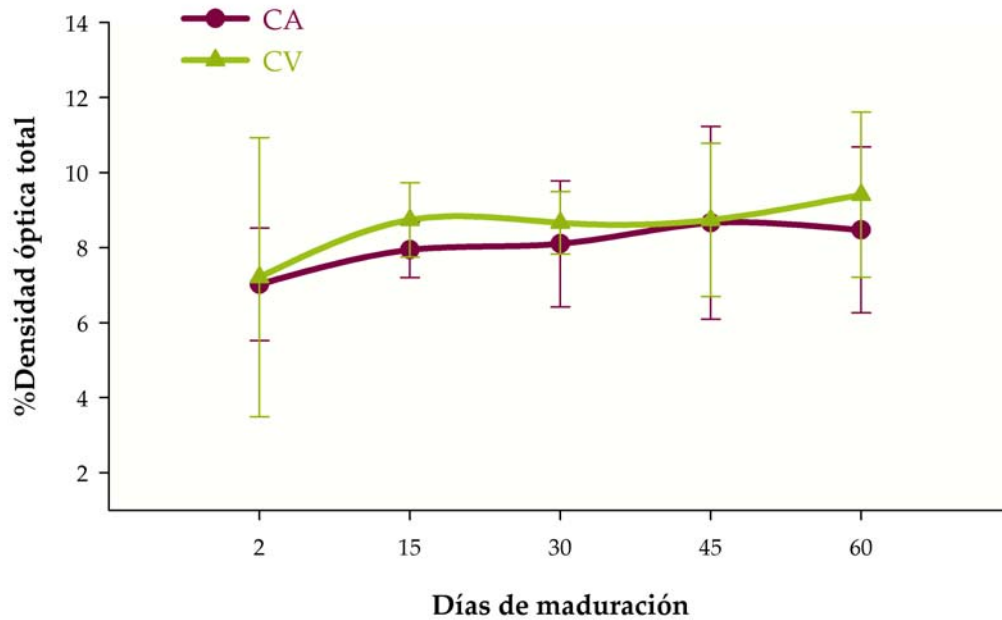


Figura 38. Evolución de las β -CN (f1-192) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

Por otra parte, en líneas generales, la β -CN (f_{1-192}) se mantuvo estable durante la maduración, no estableciéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguna de las muestras de queso analizadas (**Figura 38**).

Esta evolución detectada en el queso de cabra de Murcia al Vino, también se ha encontrado en otras variedades de queso de cabra, como en el queso elaborado con leche de cabra Murciano-Granadina (Trujillo *et al.*, 2002), en queso Kefalograviera (Katsiari *et al.*, 2001), en queso Prato artesano (Gorostiza *et al.*, 2004) o en quesos de cabra elaborado con dos coagulantes (Pino *et al.*, 2009).

La evolución descendente que experimentan las β -CN se corresponde con la hidrólisis que sufren como consecuencia de la acción de la plasmina, como se ha comentado anteriormente, así como, de una pequeña acción residual que ejerce el cuajo sobre estas β -CN, que es mucho menos intensa que la ejercida sobre las α -CN (Trujillo *et al.*, 2002; Mallatou *et al.*, 2004; Gorostiza *et al.*, 2004).

La degradación que sufren estas fracciones no es muy intensa (alrededor del 9% de degradación), quedando gran parte de ella sin hidrolizar en los quesos con 60 días de maduración. Este hecho ya ha sido observado por diversos autores (Creamer, 1975; Martín-Hernández *et al.*, 1992a; Carretero *et al.*, 1994) que apuntan que la β -CN es bastante resistente a la proteólisis en la mayoría de las variedades de quesos en las que se utiliza CA, permaneciendo hasta aproximadamente el 50% de ella sin hidrolizar al final de la maduración.

En relación a la influencia del tipo de coagulante sobre las β -CN, se detectaron valores significativamente superiores ($p < 0,05$) para estas fracciones en los quesos elaborados con CA frente a los elaborados con CV, con valores de % de densidad óptica a los 60 días de maduración del 33,82% y 26,79%, respectivamente. Este hecho se debe a que la degradación que sufren las β -CN es mayor en los quesos elaborados con CV, probablemente debido a que las cinarasas presentan una mayor actividad proteolítica sobre las β -CN que la quimosina.

Coincidiendo con nuestros resultados, Pino *et al.* (2009) encontraron en quesos de cabra valores superiores en los elaborados con CA frente a los elaborados con CV, con porcentajes de 44,0% y de 38,1%, respectivamente. En quesos de oveja elaborados con CV y CA, se han observado resultados muy similares. Así, Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) también encontraron

porcentajes superiores en los quesos elaborados con CA con respecto a los elaborados con CV (presentando valores de β -CN a los 60 días de maduración de 43,3% y 37,4%, respectivamente) mientras que Sousa y Malcata (1997a) encontraron valores de degradación de la β -CN del 43% a los 68 días de maduración en queso de oveja elaborado con coagulante vegetal y CA.

4.1.2.1.c) Alfa-caseínas (α -CN)

En la **Tabla 21** y en la **Figura 39** se exponen los valores de densidad óptica detectados para las fracciones de α -CN de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CA y CV a lo largo de su maduración.

El tiempo de maduración afectó de forma altamente significativa ($p < 0,001$) a los valores de α -CN. De esta manera, se observa un descenso desde los primeros días de maduración, obteniéndose a los 2 y 60 días valores de 36,52% y 21,83% y de 33,57% y 13,61% de densidad óptica en los quesos elaborados con CA y CV, respectivamente.

La hidrólisis inicial de las α -CN se debe fundamentalmente a la actividad proteolítica del cuajo y de la plasmina presente en la cuajada como enzimas residuales (Póveda *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003; Sousa y McSweeney, 2001). Esta degradación da como resultado la α_{s1} -CN-I, que se incluye en el grupo de los productos de degradación.

La hidrólisis detectada en las α -CN en el queso de Murcia al Vino elaborado con CA ha sido más rápida y más intensa que la de las β -CN (**Figura 40**), detectándose un ratio α -CN/ β -CN descendente durante toda la maduración, con valores de 0,88 y 0,48, a los 2 y 60 días, respectivamente.

A pesar de que el coagulante residual de la cuajada produce fundamentalmente la degradación de las α -CN, también actúa de manera menos específica sobre la β -CN (Fox *et al.*, 1993a), produciendo una hidrólisis más extensa en las α -CN durante la maduración. Este hecho concuerda con los resultados encontrados en la bibliografía para otros quesos de cabra (Trujillo *et al.*, 2002; Marcos *et al.*, 1979b), en queso Armada (Fresno *et al.*, 1997), en queso Teleme (Mallatou *et al.*, 2004), en el queso de Los Pedroches (Pino *et al.*, 2009), o en otros tipos de quesos como el Feta (Michaelidou, 1997), el Kekalograviera (Katsiari *et al.*, 2001), el queso Kuflu (Hayaloglu *et al.*, 2008), o el queso São Jorge

(Kongo *et al.*, 2009) entre otros, en donde las α -CN se degradaron más rápidamente que las β -CN, debido a la mayor especificidad de las enzimas proteolíticas hacia ellas.

Fernández-Salguero y Sanjuán (1999), Núñez *et al.* (1991) y O'Mahony *et al.* (2003), obtuvieron en quesos de cabra y oveja unos patrones de electroforesis parecidos a los nuestros, donde también se apreciaba una mayor susceptibilidad de las α -CN a la proteólisis, frente a las β -CN. Este hecho es lógico ya que la estructura primaria de β -CN, α_{s1} -CN y α_{s2} -CN ovinas y caprinas son muy similares.

Phelan *et al.* (1973), justificaron la mayor resistencia a la hidrólisis enzimática de las β -CN a la estructura que presentan las mismas, que las hace menos accesibles a las enzimas. Además, otros autores apuntan que el contenido en NaCl y la grasa afectan también a la degradación de las β -CN, haciéndolas más resistentes frente al ataque enzimático. En este sentido, Sousa y Malcata (1997a) encontraron una relación indirecta entre la concentración de NaCl y la α -CN caprina. Este hecho también fue observado por Noomen (1978), en queso tipo Meshanger, y por Delacroix- Buchet y Trossat (1991) en queso tipo Gruyère.

El tipo de coagulante utilizado afectó de forma significativa ($p < 0,001$) a los valores de α -CN de los quesos. Así, se puede comprobar que desde los primeros días de la maduración se detectaron niveles de α -CN más bajos en los quesos elaborados con CV, con respecto a los elaborados con CA, alcanzando valores de 13,61% y 21,83% de densidad óptica a los 60 días de maduración, respectivamente. No obstante, estas diferencias no resultaron ser significativas ($p < 0,05$) hasta los 45 días de maduración (**Tabla 21**).

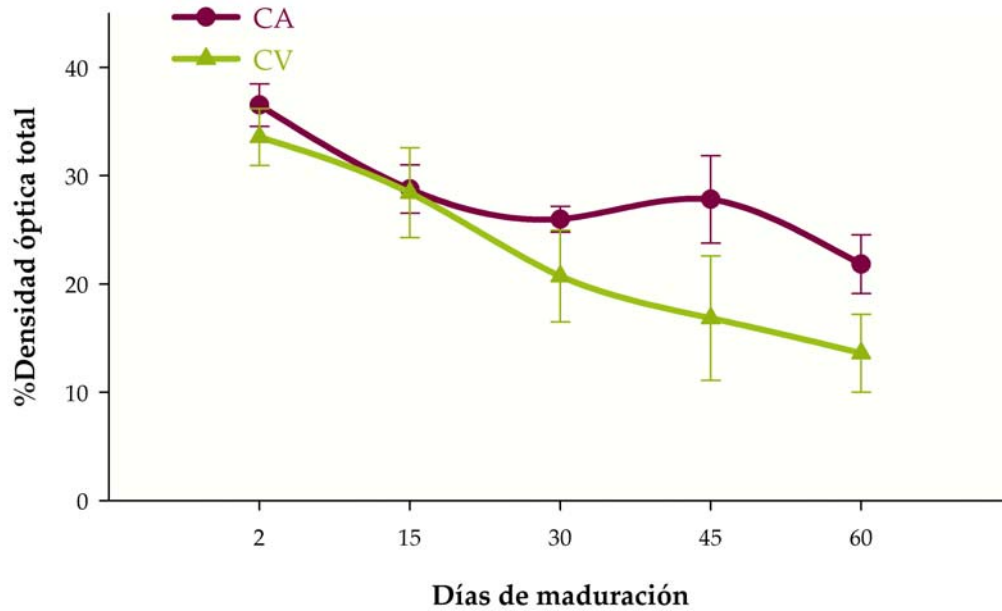


Figura 39. Evolución de las α -caseínas (α -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

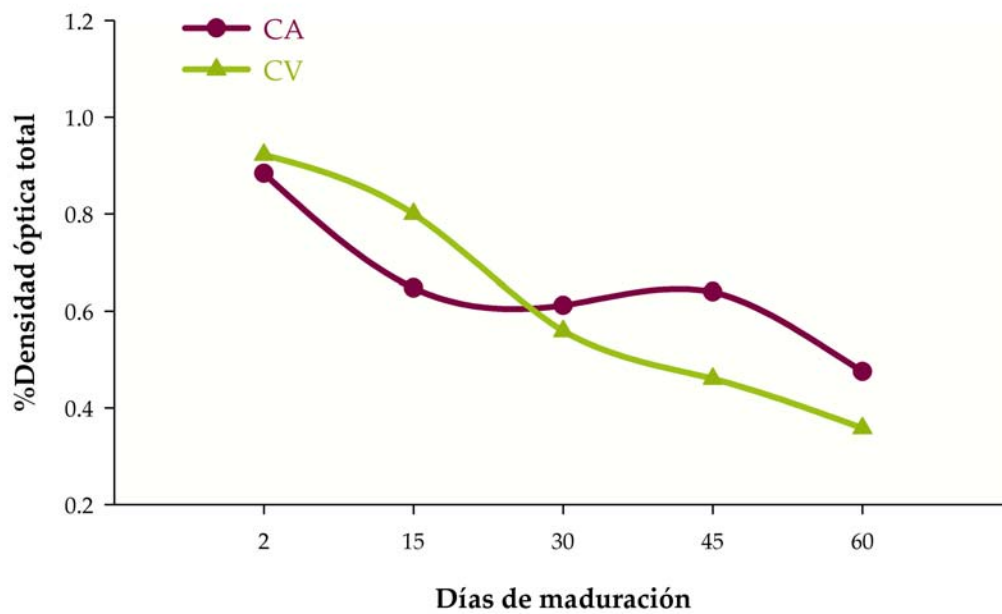


Figura 40. Evolución del ratio α -CN / β -CN del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

Al igual que ocurre con los quesos elaborados con cuajo, la evolución que siguen las α -CN de los quesos elaborados con CV es significativamente descendente ($p < 0,05$) a medida que transcurre la maduración, y la degradación que sufren fue más intensa que en los quesos elaborados con CA (con porcentajes de degradación del 59,5% y 40,2%, respectivamente). Esta mayor degradación de las α -CN en relación a las β -CN en los quesos elaborados con CV, determina que el ratio α -CN/ β -CN en estos quesos (**Figura 40**) experimente un descenso más acusado que el detectado para los quesos elaborados con CA (con valores de 0,92 frente a 0,88 y de 0,36 frente a 0,48 a los 2 y 60 días de maduración, respectivamente).

Este descenso más pronunciado de los valores de α -CN en quesos elaborados con CV respecto a los elaborados con CA, se debe a que las cinasas presentes en el CV tienen mayor actividad proteolítica sobre las α -CN que la quimosina del CA (Sousa y Malcata, 1997a). Resultados similares se han encontrado en la bibliografía para otras variedades de queso, como el queso de los Pedroches. En esta variedad de queso, Pino (2007) detectó valores de 52,8% y 41,8% para quesos elaborados con leche de cabra con CV y CA, respectivamente a los 60 días de maduración. Por su parte, Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) y Sousa y Malcata (1997a), detectaron en quesos de oveja una mayor susceptibilidad de las α -CN respecto a las β -CN, frente a la acción proteolítica de las cinasas. De hecho, estos últimos observaron desde los primeros días de la maduración, la aparición de dos bandas con mayor movilidad electroforética en la región de las α -CN en los quesos elaborados con CV no detectándolas en los elaborados con CA.

4.1.2.1.d) Pre-alfa-caseínas (pre- α s-CN)

En el electroforegrama (**Figura 32**) se observan unas bandas con mayor movilidad relativa que las α -CN denominadas pre- α -CN (pre- α -CN) (Franco *et al.*, 2001; Pino, 2007). Las pre- α -CN se corresponden con los productos resultantes de la proteólisis de las α -CN, como consecuencia fundamentalmente de la acción del cuajo (McSweeney *et al.*, 1993; Hayaloglu *et al.*, 2008). Esta hidrólisis da como resultado la aparición de diferentes bandas electroforéticas de distinto tiempo de migración en el gel, pertenecientes a una misma proteína. Este hecho es posible dada la heterogeneidad que presentan las α -CN caprinas y los grandes tiempos

de migración de éstas, debidos a los diferentes niveles de fosforilación que presentan.

Los valores medios de pre- α -CN y su evolución a lo largo de todo el periodo de maduración se muestran en la **Tabla 21** y en la **Figura 41**.

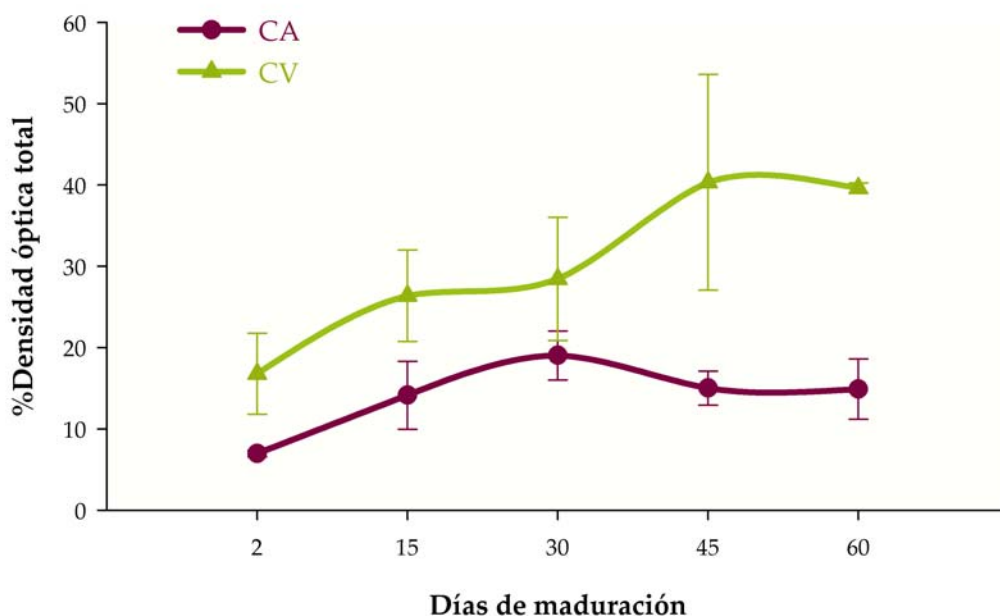


Figura 41. Evolución de las pre- α -caseínas (pre- α -CN) del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de la maduración

El tiempo de maduración afectó significativamente ($p < 0,001$) a los valores de pre- α -CN. Así, se observa un incremento de éstas a medida que avanza la maduración de los quesos, aunque tan sólo en algunos casos se establecen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la comparación múltiple de medias (**Tabla 21**). Este fenómeno también ha sido observado en otros quesos de cabra como en el queso Ahumado de Aliva (Franco *et al.*, 2001); en quesos tipo Garrotxa (Saldo *et al.*, 2002); en el Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003); en el queso Monterey Jack (Park, 2001; Van Hekken *et al.*, 2004); el queso de Los Pedroches (Pino, 2007) o en el queso São Jorge (Kongo *et al.*, 2009).

La evolución que siguieron las pre- α -CN de los quesos fue inversa a la experimentada por la fracción α -CN de los mismos, observándose un aumento pronunciado durante los primeros 15 días de maduración en ambos tipos de queso. A partir de ese día, se detectó un aumento continuo en los quesos elaborados con CV, manteniéndose valores más o menos constantes en los elaborados con CA.

El tipo de coagulante utilizado en la elaboración del queso de Murcia al Vino afectó de manera altamente significativa ($p < 0,001$) a los valores pre- α -CN, que fueron, desde los primeros días de la maduración, superiores en los quesos elaborados con CV. De esta manera se han observado a los 2 y 60 días unos valores de 16,79% y 39,63% y de 6,97% y 14,89% en quesos elaborados con CA y CV, respectivamente. Estos resultados se pueden corroborar al observar en los quesos elaborados con CV un mayor número de bandas en las regiones de las pre- α -CN, frente a las detectadas en los lotes elaborados con CA (**Figura 32**).

Como se ha comentado anteriormente, estos resultados se deben a que las α -CN de los quesos elaborados con CV sufren una proteólisis más intensa que las de los quesos elaborados con CA, indicando una mayor actividad de las cinasas del cardo sobre la fracción α -CN desde los primeras fases de la elaboración del queso. Sousa y Malcata (1998a) observaron que en la α -CN caprina en solución, debido a la acción de las proteinasas de *C. cardunculus* sobre su enlace más sensible, el Phe₂₃-Phe₂₄, se producía un grupo de bandas de mayor movilidad electroforética (pre- α -CN). Estas bandas fueron apreciadas en queso de cabra y oveja elaborado con proteinasas de *C. cardunculus* a partir de los 7 días de maduración, pero en cambio no se apreciaron hasta los 28 días de maduración en quesos de oveja elaborados con coagulante animal (Sousa y Malcata, 1997a). Posiblemente, estas bandas de la región de las pre- α -CN engloben fracciones como la α_{s1} -I-CN (incluido f₂₄₋₁₉₉), y péptidos del tipo α -CN (f_{24*}), tal y como estos mismos autores identificaron en queso elaborado con proteinasas de *C. cardunculus*.

4.1.2.1.e) Análisis multivariante

Análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados obtenidos del análisis de componentes principales (ACP) de las fracciones caseínicas, se muestran en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Análisis de componentes principales de datos a lo largo de la maduración del porcentaje de las fracciones de caseínas de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con CV

	Componente principal	
	1	2
γ -caseínas	-0,54	0,8
β -caseínas	0,63	0,71
α -caseínas	-0,96	-0,08
Pre- α -caseínas	0,99	-0,09

Se han extraído dos componentes principales (CP) que explican un 94% del total de la varianza (**Tabla 22**). El CP1, explica el 64,8% del total de la varianza y se correlaciona positivamente con la β -CN y la pre- α -CN, y negativamente con la γ -CN y la α -CN. Pre- α -CN y α -CN son las variables que presentan una correlación más alta con el CP1. El segundo componente, explica el 29,2% del total de la varianza, y se correlacionó positivamente con la γ -CN y la β -CN y de forma negativa con la α -CN y la pre- α -CN. γ -CN y β -CN son las fracciones que presentan una correlación más alta con el CP2.

En la **Figura 42** se representan los quesos en el plano definido por los dos componentes principales extraídos. Se observa como el CP1 agrupa a los quesos en función del tiempo de maduración, apareciendo los quesos con 2 días en el hemisferio izquierdo del gráfico y los de 60 días en el derecho positivo. Por tanto, podemos afirmar que el CP1 se corresponde con el tiempo de maduración. El CP2 agrupa a los quesos elaborados con CV en la parte inferior del gráfico, mientras que los elaborados con CA quedan en la superior. Por tanto, podríamos afirmar que el CP2 se corresponde con el tipo de coagulante.

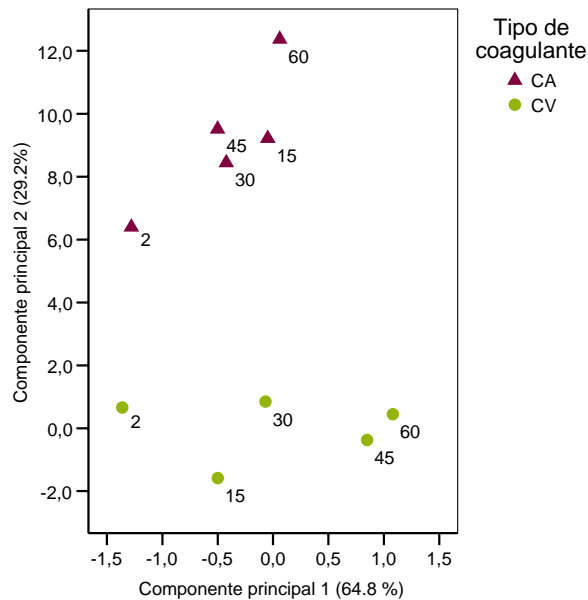


Figura 42. Representación en el plano definido por los 2 componentes principales, extraídos con los valores de las fracciones caseínicas de los quesos elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

4.1.2.2. Proteólisis secundaria. Cambios en los componentes del nitrógeno

En el estudio de la proteólisis secundaria las fracciones nitrogenadas sirven de base para establecer los índices de maduración, reflejando el alcance de dichos procesos de proteólisis. Estos procesos implican una degradación limitada de la paracaseína por la acción del coagulante (y/o plasmina) sobre los polipéptidos, los cuales son a su vez degradados por acción del sistema proteínasa/peptidasa de bacterias estarter y/o bacterias propias de la leche, en péptidos y aminoácidos (Fernández-Salguero, 1975; Kleter, 1977; Visser 1977a y 1977b; Wilkinson *et al.*, 1992).

En la **Tabla 23** se muestran las medias y las desviaciones estándar de las fracciones nitrogenadas a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración en quesos de Murcia al Vino, obtenidos tras coagular la leche con CA y CV. Los datos se expresan como porcentaje de cada una de las fracciones con respecto al nitrógeno

total. También se incluyen los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas que se han realizado mediante el test LSD.

Tabla 23. Cambios en las fracciones nitrogenadas de las muestras de quesos al vino de Murcia elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración, expresados como g/100 g de NT

Tipo Coagulante	Días de maduración				
	2	15	30	45	60
CV					
NS ^b	18,7±5,84 ^{cd}	26,55±4,04 ^d	29,21±3,27 ^e	32,52±8,14 ^{ef}	34,79±3,83 ^f
NNP ^b	4,66±1,16 ^b	6,93±1,48 ^c	7,96±1,14 ^{cd}	11,43±1,13 ^f	11,16±1,09 ^f
NAA ^b	0,20±0,02 ^{ab}	0,39±0,13 ^c	0,58±0,20 ^{de}	0,63±0,09 ^e	0,88±0,18 ^f
N-NH ₃ ^b	0,29±0,05 ^a	0,44±0,12 ^{ab}	0,59±0,21 ^{bc}	0,66±0,26 ^c	0,59±0,16 ^{bc}
CA					
NS ^b	10,55±1,07 ^a	11,83±1,19 ^{ab}	16,46±2,88 ^{bc}	17,63±2,73 ^c	19,04±2,56 ^d
NNP ^b	3,53±0,79 ^a	5,06±0,76 ^b	7,51±0,30 ^{cd}	8,45±1,71 ^{de}	9,61±1,83 ^e
NAA ^b	0,14±0,03 ^a	0,31±0,13 ^{bc}	0,44±0,18 ^{cd}	0,44±0,11 ^{cd}	0,66±0,23 ^e
N-NH ₃ ^b	0,31±0,10 ^a	0,41±0,11 ^{ab}	0,47±0,08 ^b	0,51±0,08 ^{bc}	0,55±0,06 ^{bc}

Resultados del test de Fisher (LSD); medias del mismo parámetro sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

^b NS: nitrógeno soluble en agua a pH 4,6; NNP: nitrógeno no proteico; NAA: nitrógeno aminoácido; N-NH₃: nitrógeno amoniacal

4.1.2.2.a) Nitrógeno soluble en agua a pH 4,6 (NS)

En quesos, tradicionalmente se considera la proporción de (NS) como “índice de maduración”, ya que esta fracción aumenta a medida que actúan las enzimas coagulantes y proteasas de la leche, presentes al principio de la maduración, sobre las caseínas.

En la **Figura 43** se representa la evolución de los valores de NS (expresados como g/100gNT) durante todo el periodo de maduración, de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CA y CV.

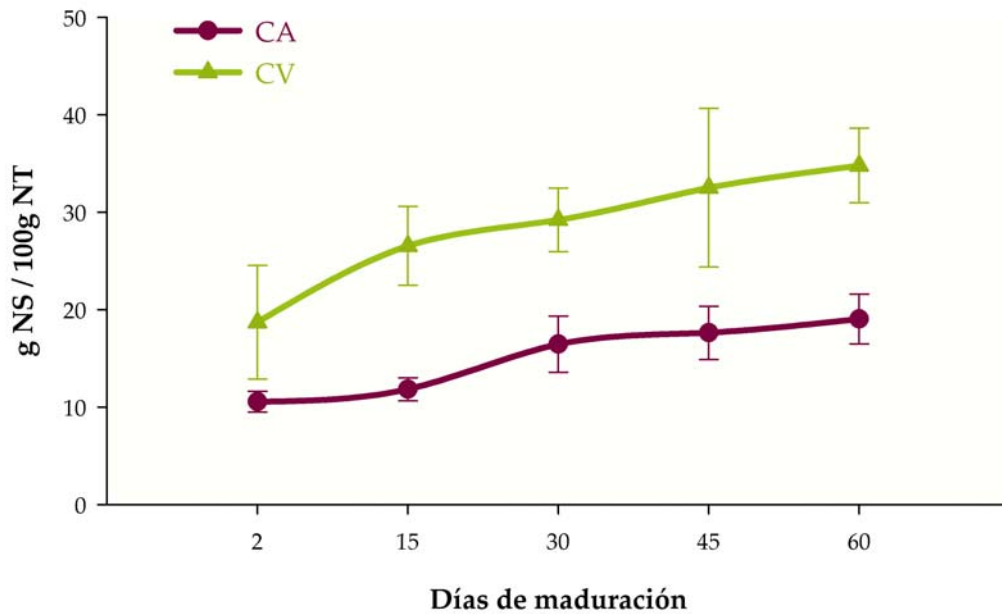


Figura 43. Evolución del NS de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

El tiempo de maduración afectó de forma altamente significativa ($p < 0,001$) al porcentaje de NS de los quesos, observándose un incremento significativo ($p < 0,05$), desde el día 30 de la maduración. De esta manera, en los quesos elaborados con CA se observaron valores de 10,55 y de 19,04 g/100gNT a los 2 y 60 días de maduración, respectivamente.

El NS, se correlaciona de manera negativa ($p < 0,05$) con las α y las β -CN de los quesos a lo largo de la maduración. Este hecho es bien conocido y demuestra que la mayoría de los componentes del NS van a ser los productos resultantes de la hidrólisis de las caseínas y van a englobar a proteínas séricas, péptidos de peso molecular mediano y aminoácidos (Christensen *et al.*, 1999; Schlessler *et al.*, 1992).

Esta tendencia ascendente del NS durante la maduración también ha sido observada en otros quesos de cabra (Trujillo *et al.*, 2002; Alichanidis *et al.*, 1981; Vefopoulou *et al.*, 1989; Mallatou *et al.*, 2004 o Michaelidou *et al.*, 1998), aunque los valores detectados no siempre coincidieron con los nuestros. Así, los valores

observados en los quesos elaborados con CA a los 60 días fueron superiores a los detectados por Ballesteros *et al.* (2006) en quesos Manchegos elaborados con leche pasteurizada de cabra, por Freitas y Malcata (1996) en queso Picante, por Franco *et al.* (2003) en el queso Babia-Laciana, o por Fresno *et al.* (1997), Carballo *et al.* (1994), Mallatou *et al.* (2004) o Fernández-Salguero y Gómez (1997) en quesos Armada, Valdeteja, Teleme o en quesos de Cádiz, Málaga y Sierra Morena, respectivamente. No obstante fueron inferiores a los encontrados por Guizani y Zaher (2006) en queso Majorero; por Trujillo *et al.* (2002) en quesos elaborados con leche de cabra, o por Pino (2007) en el queso de Los Pedroches elaborado con CA. Esta disparidad de valores encontrados puede ser atribuida a diversos factores como la concentración de NaCl en los quesos (Fox *et al.*, 2000), a la diferencia de pH que presenten a la presencia de valores mayores de humedad en los quesos o a diferencias en el cultivo iniciador utilizado (Fox *et al.*, 1990).

Mas *et al.* (2002) en queso Ibores elaborado con leche de cabra, O'Sullivan *et al.* (2005) en quesos tipo Camembert elaborados con leche de cabra, y Cabezas *et al.* (2007) en quesos de cabra elaborados con tecnología del Manchego, observaron valores muy similares a los nuestros.

El tipo de coagulante empleado modificó de forma significativa ($p < 0,001$) el contenido de NS de los quesos. Este porcentaje aumentó considerablemente durante la maduración de los mismos y fue mayor en los quesos elaborados con CV en comparación con los elaborados con CA. Así, se detectaron valores a los 60 días de 19,04 y de 34,79g NS/100g NT, en quesos elaborados con CA y CV, respectivamente.

Las mayores cantidades de NS de los quesos elaborados con CV, se detectan desde los primeros estadios de la maduración; y se deben a la mayor acción proteolítica que presentan las cinarasas del CV sobre las caseínas, con respecto a la renina o quimosina del CA.

Existen autores que encontraron el mismo resultado en sus estudios realizados en variedades de queso elaboradas con dos tipos de coagulante (CA y CV). Así, Pino (2007) en quesos de leche de cabra, observó diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de NS entre los quesos elaborados con los dos tipos de coagulantes, siendo significativamente mayores aquellos encontrados en las piezas elaboradas con CV. En otras variedades de quesos de

leche de oveja elaborados con extractos de *C. cardunculus*, también se observó que las cinarasas presentes en el coagulante vegetal presentaban una mayor actividad proteolítica que la quimosina del cuajo animal (Fernández-Salguero *et al.*, 2002; Tejada y Fernández-Salguero, 2003; Vioque *et al.*, 2000; Núñez *et al.*, 1991; Sanjuán, 1992; Cordeiro *et al.*, 1992; Ortiz de Apocada *et al.*, 1994; Macedo *et al.*, 1996; Sousa y Malcata, 1998a; Sanjuán y Fernández-Salguero, 1994; O'Mahony *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2003; Prados *et al.*, 2007; Galán, 2008).

Además del tipo de coagulante empleado y la cantidad empleada en la fabricación de los quesos (que está directamente relacionado con el coagulante residual), existen otros factores que pueden influir sobre el porcentaje de NS de los mismos. Estos son: la temperatura y humedad relativa durante la maduración, la adición de cultivos iniciadores, la pasterización de la leche, la concentración de sal y el valor de pH del queso. En el presente trabajo, como las condiciones de elaboración de todas las partidas de quesos fueron idénticas, el porcentaje de NS de los mismos sólo pudo ser afectado por el tipo de enzimas coagulantes empleadas.

Varios autores afirman que el mayor porcentaje de NS detectado en los quesos elaborados con CV, con respecto a los de CA, supone un mayor grado de maduración para el mismo tiempo considerado, de forma que se consigue acelerar la maduración del queso, (Fernández-Salguero y Sanjuán, 1999; Fernández-Salguero *et al.*, 2004). En relación a esto, Galán (2008) utilizó para elaborar quesos un CA, un CV y una mezcla de ambos al 50%, detectando que para los dos tipos de quesos elaborados con CV (al 100% o al 50%) los valores de NS fueron superiores a los que presentaban los elaborados con CA. Estos resultados los atribuyó a la fuerte actividad proteolítica de las cinarasas vegetales.

4.1.2.2.b) Nitrógeno no proteico (NNP)

La fracción del Nitrógeno no proteico (NNP) de los quesos está compuesta principalmente por pequeños péptidos (de entre 2 y 20 residuos), aminoácidos libres, aminas y amoniaco, y es considerado como un índice de "profundidad de maduración". Esta fracción nitrogenada evalúa principalmente la acción de las peptidasas bacterianas, al ser estas enzimas las principales responsables de la

formación de pequeños péptidos y aminoácidos libres (Fox, 1989; Lane *et al.*, 1997).

En la **Figura 44** se representa la evolución que experimenta el NNP durante la maduración. Tal y como se puede observar (**Tabla 23**) el contenido de NNP en los quesos se modificó de manera altamente significativa ($p < 0,001$) a lo largo de la maduración, experimentando un gran incremento desde los primeros días.

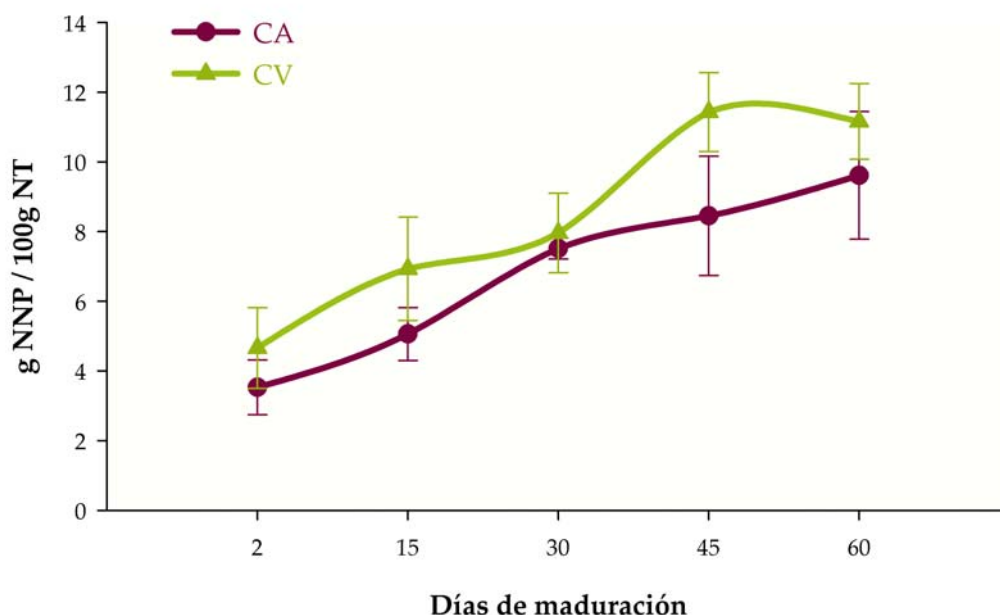


Figura 44. Evolución del NNP (medias y desviaciones estándar) de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

El importante aumento de los porcentajes en los primeros 15 días de maduración, probablemente coincide con la acción que presentan las bacterias ácido-lácticas, que es máxima en este periodo de tiempo (Macedo *et al.*, 1995; Guizani *et al.*, 2005). Estas bacterias se corresponden, en nuestro caso, fundamentalmente con los cultivos iniciadores que se añadieron a la leche durante la elaboración de los quesos. El coagulante va a ser capaz de hidrolizar las caseínas produciendo polipéptidos solubles a pH 4,6, pero posee limitada

capacidad para degradar a estos últimos (Desmazeaud *et al.*, 1977). Por esta razón, van a ser las bacterias integrantes del cultivo iniciador (*L. lactis* subs. *lactis* y *cremoris* y *S. salivarius* subs. *thermophilus*) las que actúan sobre estos polipéptidos rindiendo péptidos pequeños y aminoácidos libres, que son solubles en TCA 12%, y por tanto, se cuantifican como NNP/NT. Autores como Furtado *et al.* (1988) también utilizaron este índice para evaluar la acción de las bacterias ácido-lácticas en la formación de los componentes de bajo peso molecular en queso.

La evolución ascendente del NNP durante la maduración también se ha observado en otras variedades de queso de cabra como el Teleme, (Mallatou *et al.*, 2004); Tulum, (Hayaloglu *et al.*, 2007) o Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003) entre otros.

Los valores observados en el queso de Murcia al Vino a los 60 días de maduración (9,61g NNP/100g NT), fueron similares a los encontrados por González-Crespo y Mas (1993), en quesos de cabra con 60 días, ensayados con distintos tipos de cultivos iniciadores. No obstante, estos valores son superiores a los encontrados por Mallatou *et al.* (2004) en el queso Teleme (que presentó 6,86g NNP/100g NT), por Franco *et al.* (2003) en el Babia-Laciana (con 8,6g NNP/100g NT), por Olarte *et al.* (2000) en queso Cameros (con 4,99g NNP/100g NT), o por Freitas y Malcata (1996) en el queso Picante (con 7,97g NNP/100g NT). Y se muestran inferiores a los observados por Pino *et al.* (2009), en queso de cabra de Los Pedroches elaborados con CA (con 15,29g NNP/100gNT), Fernández-Salguero y Gómez (1997) en quesos de Alhama de Granada y Aracena (con valores de NNP de 13,4% y 18,3%, respectivamente), o en quesos Majorero donde Fontecha *et al.* (1990), Marcos *et al.* (1985) y Mas *et al.* (2002) detectaron valores de 20,40%, 11,4% y 10,21%, respectivamente.

El tipo de coagulante influyó de manera significativa ($p < 0,001$) sobre los valores de NNP de los quesos, observándose valores más elevados en los quesos elaborados con CV desde los primeros días de maduración. De esta manera, en la comparación múltiple de medias (**Tabla 23**) se establecen desde los 2 días de maduración, valores significativamente más elevados ($p < 0,05$) en los quesos elaborados con CV que en los elaborados con CA, presentando valores de 4,66 y 3,53 g NNP/100g NT, respectivamente.

Los estudios realizados en otras variedades de queso para determinar el efecto del coagulante vegetal sobre los contenidos en NNP arrojan resultados contradictorios. Así, Fernández-Salguero y Sanjuán (1999), no detectaron diferencias significativas entre el NNP de quesos de Los Pedroches (sin cultivo iniciador) elaborados con ambos tipos de coagulantes. De hecho, a pesar de que detectaron al principio de la maduración mayores contenidos de NNP en los quesos elaborados con CV, concluían que la producción de componentes nitrogenados de bajo peso molecular era independiente del tipo de coagulante usado y que dependía solamente de la actividad de las enzimas microbianas que tiene el queso. Por el contrario, existen autores como Pino *et al.* (2009) en quesos de cabra elaborados con dos tipos de coagulantes, Núñez *et al.* (1991) en queso de La Serena, Freitas y Malcata (1996) en queso Picante, o Tejada (2001) y Galán (2008) en el queso de Los Pedroches, que, al igual que nosotros, sí encontraron diferencias significativas en el contenido de NNP de quesos elaborados con ambos coagulantes. Todos ellos atribuyen este resultado a que en los quesos elaborados con CV hay una mayor rotura de las caseínas y de sus primeros productos de degradación. Por lo tanto, contienen más sustrato disponible para producir mayor cantidad de nitrógeno de bajo peso molecular.

Además, debido a la mayor concentración de proteasas microbianas, se observa que las diferencias detectadas entre los contenidos de NNP de lotes elaborados CV y CA se acentúan más en los quesos que se elaboraron con cultivo iniciador, (como en los de nuestro estudio). De hecho, Carmona *et al.* (1999) en queso de Los Pedroches y Sousa y Malcata (1996b) en queso Serra, obtuvieron en lotes de quesos elaborados con cultivo iniciador unos contenidos de NNP muy superiores a los detectados en los lotes elaborados sin cultivo. Lógicamente, en los quesos elaborados con CV la mayor concentración de sustrato, junto a este incremento de proteasas, favorece notablemente la producción de pequeños y medianos péptidos provocando, por tanto, un mayor aumento del NNP.

4.1.2.2.c) Nitrógeno aminoacídico (NAA)

El NAA va a englobar el nitrógeno de los aminoácidos liberados como consecuencia de la hidrólisis de péptidos mediante diversas peptidasas microbianas.

En la **Figura 45** se representa la evolución del contenido en NAA del queso de Murcia al Vino elaborado con CA y CV a lo largo de su maduración. En la **Tabla 23** se muestran los valores medios y desviaciones estándar expresadas en porcentajes sobre el NT, así como también, los resultados de la comparación múltiple de medias.

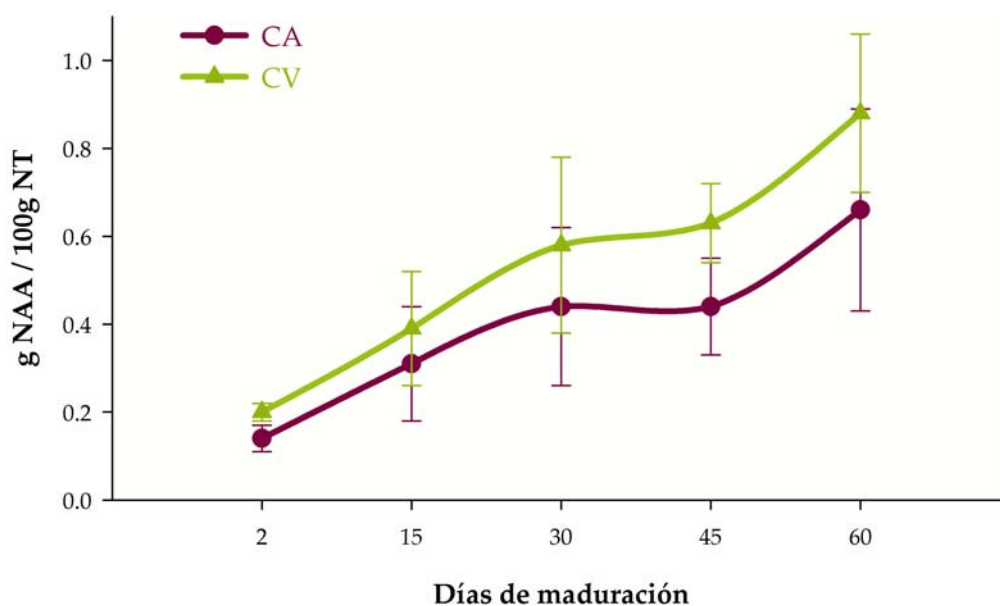


Figura 45. Evolución del NAA (medias y desviaciones estándar) de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

Los valores para el NAA se vieron afectados de manera significativa ($p < 0,01$) por el tiempo de maduración de los quesos, incrementándose hasta alcanzar al final de la misma unos niveles de $0,66\text{g NAA}/100\text{gNT}$. Los resultados de la comparación múltiple de medias nos indican que este aumento es significativo ($p < 0,05$) en los primeros 15 días de maduración; se mantiene luego constante desde los 30 a los 45 días, para volver a experimentar otro aumento también significativo ($p < 0,05$) hasta el final de ella.

Este aumento, que se correspondería con la hidrólisis de péptidos pequeños procedentes de la acción de enzimas bacterianas liberadas en la lisis celular,

también fue observado en quesos de cabra como el Babia Laciana o el de Los Pedroches (Franco *et al.*, 2003 y Pino, 2007, respectivamente).

Se han realizado diferentes estudios en otras variedades de queso para observar como afectaban diversos factores en el contenido en NAA. Así, Sousa y Malcata (1996b) en queso Serra, y Vioque (2002) en quesos de oveja, compararon los valores de NAA en quesos elaborados con o sin cultivo iniciador, obteniendo mayores contenidos en aquellos a los que se inoculó starter. Por otra parte, en queso Emmental, Baer *et al.* (1997) comprobaron que a medida que se incrementa la cantidad de cuajo (aumentando por tanto su proteolisis) aumenta la producción de aminoácidos por la acción de *Lactobacillus*, no ocurriendo lo mismo cuando se incrementaron los niveles de plasmina.

El tipo de coagulante influyó significativamente ($p < 0,01$) en los contenidos de NAA de los quesos, observándose en los quesos elaborados con CV valores ligeramente superiores a los elaborados con CA, aunque las diferencias significativas ($p < 0,05$) no aparecieron hasta los 30 de la maduración (Tabla 23). A los 60 días se observan en quesos elaborados con CV valores de 0,88 g NAA/100g NT, frente a los 0,66 g NAA/100gNT que presentaron los quesos elaborados con CA. No obstante, el incremento que sufrieron durante todo el periodo de estudio fue muy similar para ambos tipos de queso (con valores de 77,3% y 78,8% para quesos elaborados con CV y CA, respectivamente).

En otras variedades de queso también se ha observado mayor contenido de NAA en los quesos elaborados con CV. Es el caso del queso de Los Pedroches elaborado con leche de cabra (Pino, 2007), o de diversos quesos de oveja, como en queso de La Serena (Núñez *et al.*, 1991), en queso Picante (Freitas y Malcata, 1996) o en queso de oveja (Galán, 2008). En todos ellos se encontraron valores de NAA superiores en los lotes elaborados con CV, respecto a los elaborados con CA. Por su parte, Tejada (2001) y Tejada y Fernández-Salguero (2003), atribuyeron este mayor porcentaje de NAA en quesos elaborados con CV, a una mayor actividad caseinolítica de las ciprocinas. Estas ciprocinas liberarían mayor cantidad de péptidos en estos quesos, y estimularía la acción de las enzimas (endo y exopeptidasas) de origen microbiano que los transformarían en aminoácidos libres.

Además, se ha comprobado que, cuando se adicionan ciproquinas encapsuladas al queso Manchego elaborado con cuajo, con el propósito de acelerar su maduración, los contenidos de NAA se incrementaron más rápidamente, siendo superiores a los detectados en quesos control hasta los 30 días de maduración (Picón *et al.*, 1996 y 1997).

Por el contrario, otros autores no encontraron diferencias significativas en el porcentaje de NAA en quesos de oveja elaborados con diferente coagulante (Núñez *et al.*, 1991; Vioque, 2002; Sanjuán *et al.*, 2002; Prados *et al.*, 2007).

4.1.2.2.d) Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

El N-NH₃ es un indicador de la actividad desaminasa desarrollada en el queso por las enzimas bacterianas, fundamentalmente sobre los aminoácidos libres a lo largo de la maduración. Por tanto, la adición de cultivos iniciadores favorecerá una mayor actividad desaminasa y, por tanto, unos niveles mayores de N-NH₃.

En la **Tabla 23** y en la **Figura 46** se muestran los valores (medias y desviaciones estándar) de N-NH₃ en muestras de queso de Murcia al Vino elaborado con CV y CA a lo largo de la maduración.

Se han establecido diferencias significativas ($p < 0,001$) en los valores de N-NH₃ de los quesos con distinto tiempo de maduración. Así, tal y como se observa en la **Figura 44**, se produce una evolución ascendente y continua del N-NH₃ durante la maduración, presentando los quesos elaborados con CA valores de 0,31 a 0,55g de N-NH₃/100g NT, a los 2 y 60 días, respectivamente. Este incremento también ha sido observado en queso de cabra elaborado con CA (Pino, 2007). Por otro lado, Franco *et al.* (2003), en queso Babia-Laciana elaborado sin adición de cultivos iniciadores, apreciaron valores de N-NH₃ que pasaban de 0,6% a los 3 días de la maduración, hasta el 0,9% a los 60 días de la misma. Fresno *et al.* (1997) en el queso Armada (elaborado con leche de cabra sin pasteurizar, coagulando con cuajo animal y sin fermentos añadidos), detectaron valores desde 0,04 hasta 1,4 g N-NH₃/100g NT en queso sin madurar y con 120 días de maduración, respectivamente.

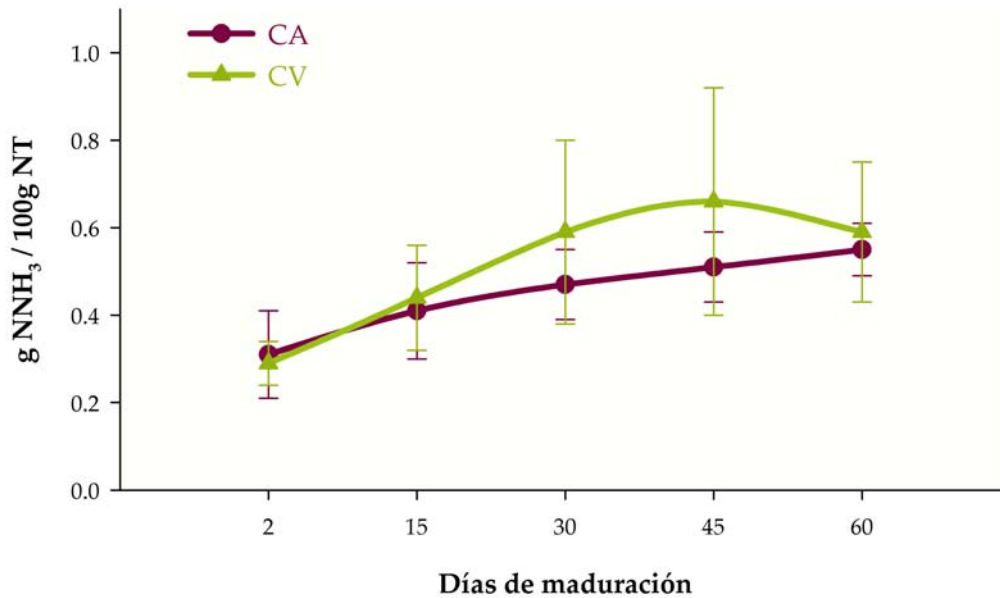


Figura 46. Evolución del N-NH₃ (medias y desviaciones estándar) de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

Los valores de N-NH₃ del queso de Murcia al Vino han sido inferiores a los encontrados en otras variedades de queso de cabra como el queso Valdeteja (Fresno *et al.*, 1988), queso Majorero y queso Ibores (Marcos *et al.*, 1985) y queso Babia-Laciana (Franco *et al.*, 2003).

El tipo de coagulante no modificó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de N-NH₃ de los quesos observándose, al final del periodo de estudio, valores de 0,59 y 0,55g N-NH₃/100g NT en quesos elaborados con CV y CA, respectivamente. La ausencia de diferencias en el contenido en N-NH₃ entre quesos elaborados con diferente coagulante corrobora que el contenido en esta fracción nitrogenada va a depender más del contenido en enzimas bacterianas que presente el queso, que del tipo de coagulante empleado en su elaboración. En este sentido, Carmona *et al.* (1999) detectaron en partidas de queso de Los Pedroches elaboradas sin cultivo iniciador, contenidos de amoníaco significativamente más bajos ($p < 0,001$) que en las partidas elaboradas con cultivo. Este hecho nos sugiere que con la adición de

cultivos iniciadores se aumentan las enzimas bacterianas capaces de degradar aminoácidos, rindiendo mayores cantidades de amoníaco.

Otros autores tampoco han detectado ninguna diferencia significativa entre los valores de N-NH₃ de quesos elaborados con coagulante vegetal y cuajo (Pino, 2007; Prados *et al.*, 2007 y Galán, 2008). No obstante, Fernández-Salguero y Sanjuán (1999) y Tejada (2001) observaron mayores contenidos de N-NH₃ en lotes de queso de Los Pedroches elaborados con coagulante vegetal fresco que en los elaborados con cuajo.

4.1.2.2.e) Fracciones nitrogenadas calculadas

En la **Tabla 24** y las **Figuras 47, 48, 49 y 50**, se muestran los valores de las fracciones nitrogenadas calculadas a lo largo de la maduración de los quesos, elaborados con CA y CV, expresadas como g/100g de NT. También se incluyen los resultados de la comparación múltiple de medias realizadas mediante el test LSD.

Tabla 24. Evolución de las fracciones nitrogenadas calculadas de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA lo largo de la maduración, expresados como g/100 g de NT

	2	15	30	45	60
CV					
Nproteínas	95,34±1,16 ^{ef}	93,07±1,48 ^d	92,04±1,14 ^{cd}	88,57±1,13 ^a	88,84±1,09 ^a
Ncaseínas	81,30±5,84 ^d	73,45±4,04 ^c	70,79±3,27 ^{bc}	67,48±8,14 ^{ab}	65,21±3,83 ^a
Npolipeptidos	14,04±4,77 ^c	19,61±3,48 ^d	21,24±4,21 ^e	21,08±7,02 ^{de}	23,63±3,65 ^f
Npeptidos	4,16±1,21 ^b	6,14±1,42 ^c	6,80±1,08 ^{cd}	10,15±1,18 ^g	9,69±0,87 ^{fg}
CA					
Nproteínas	96,47±0,79 ^f	94,94±0,76 ^e	92,49±0,30 ^{cd}	91,55±1,71 ^{bc}	90,39±1,83 ^b
Ncaseínas	89,45±1,07 ^f	88,17±1,19 ^{ef}	83,54±2,88 ^{de}	82,37±2,73 ^d	80,97±3,58 ^d
Npolipeptidos	7,02±1,61 ^a	6,77±1,83 ^a	8,95±3,00 ^b	9,18±2,86 ^b	9,42±2,64 ^b
Npeptidos	3,08±0,69 ^a	4,31±0,73 ^b	6,60±0,39 ^{cd}	7,50±1,58 ^{de}	8,40±1,62 ^{ef}

Resultados del test de Fisher (LSD); medias del mismo parámetro sin superíndices comunes (a-e) son estadísticamente diferentes (p<0,05).

Tal y como se puede observar en la **Tabla 24**, el tiempo de maduración afectó significativamente a las fracciones nitrogenadas calculadas. Así, a medida que aumenta el tiempo de maduración, tanto el Nitrógeno de las proteínas (NP)

como el Nitrógeno de las caseínas (NC) disminuyen significativamente ($p < 0,01$) hasta alcanzar a los 60 días, en los quesos elaborados con CA, valores de 90,39 y 80,97%, respectivamente. Todo lo contrario ocurre con los valores de Nitrógeno de los polipéptidos (Npp) y el Nitrógeno de los péptidos (Np), que presentan un aumento significativo ($p < 0,01$) hasta alcanzar a los 60 días, en los quesos elaborados con CA, valores de 9,42 y 8,40%, respectivamente.

Estos resultados se deben al equilibrio dinámico que van sufriendo las fracciones del nitrógeno (que van desplazándose desde las paracaseínas hasta los polipéptidos) a lo largo de todo el periodo de maduración de los quesos. Se observa, por tanto, una relación entre las diferentes fracciones nitrogenadas calculadas con las determinadas anteriormente. De esta manera, el NP va a ir descendiendo, mientras que el Npp y el Np, van aumentando. Así, se establece una correlación negativa ($p < 0,001$) entre el NC y NS, puesto que a medida que se van degradando las caseínas se incrementa el contenido de polipéptidos y péptidos y, por tanto, el NS.

Esta evolución de las fracciones nitrogenadas calculadas (descendente para el NP y el NC, y ascendente para Npp y Np) también ha sido observada por otros autores como Pino (2007), en quesos elaborados con leche de cabra, o Fernández-Salguero (1978), Tejada (2001), Prados *et al.* (2007) y Galán (2008), en quesos de oveja.

Con respecto a la influencia del tipo de coagulante sobre estas fracciones, se observan diferencias significativas para todas ellas. En los quesos elaborados con CV se observan valores significativamente menores de NP y NC que en los elaborados con CA. En el análisis múltiple de medias, se detectan diferencias significativas en el NC desde los 2 días de maduración, observándose valores de 81,30% y 89,45% en quesos elaborados con CV y CA, respectivamente. Estos resultados se deben, como se ha visto anteriormente, a la mayor actividad proteolítica y caseinolítica que presentan las ciprocinas con respecto a la quimosina.

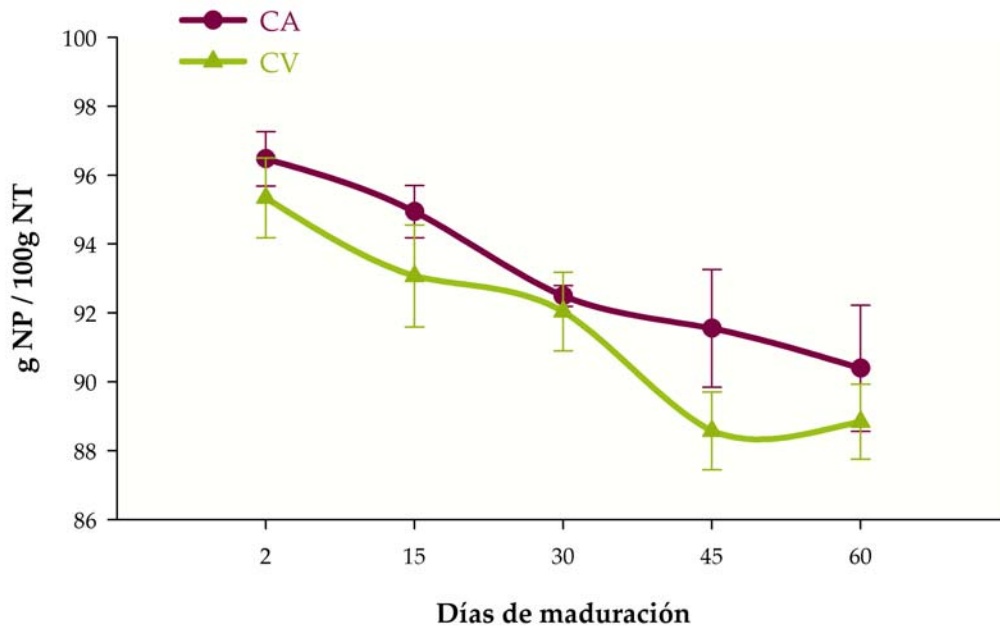


Figura 47. Evolución del Nitrógeno de las Proteínas (NP) expresado en porcentaje de NT de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

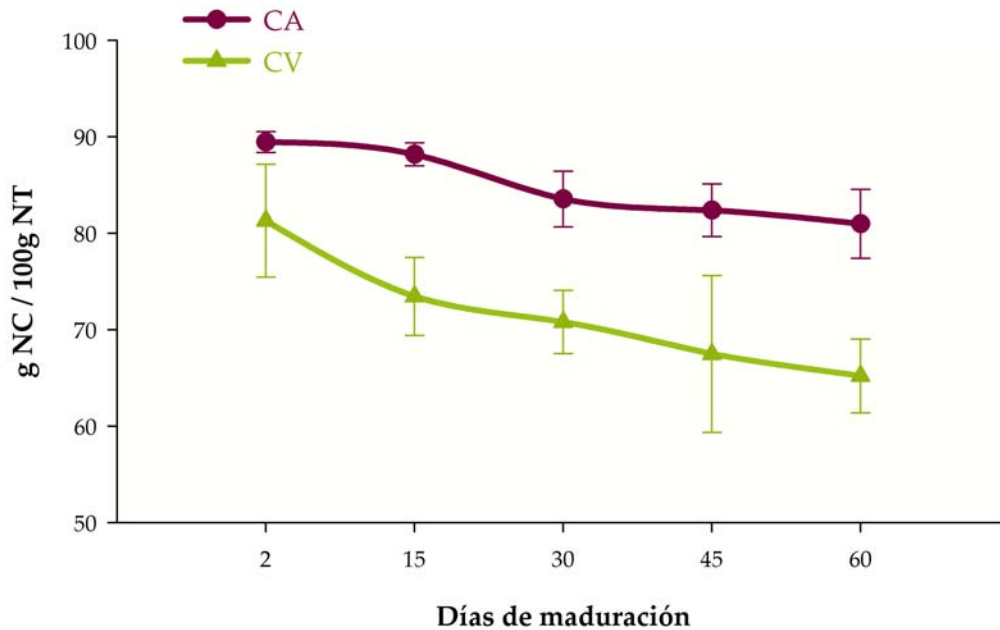


Figura 48. Evolución del Nitrógeno de las Caseínas (NC) expresado en porcentaje de NT de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

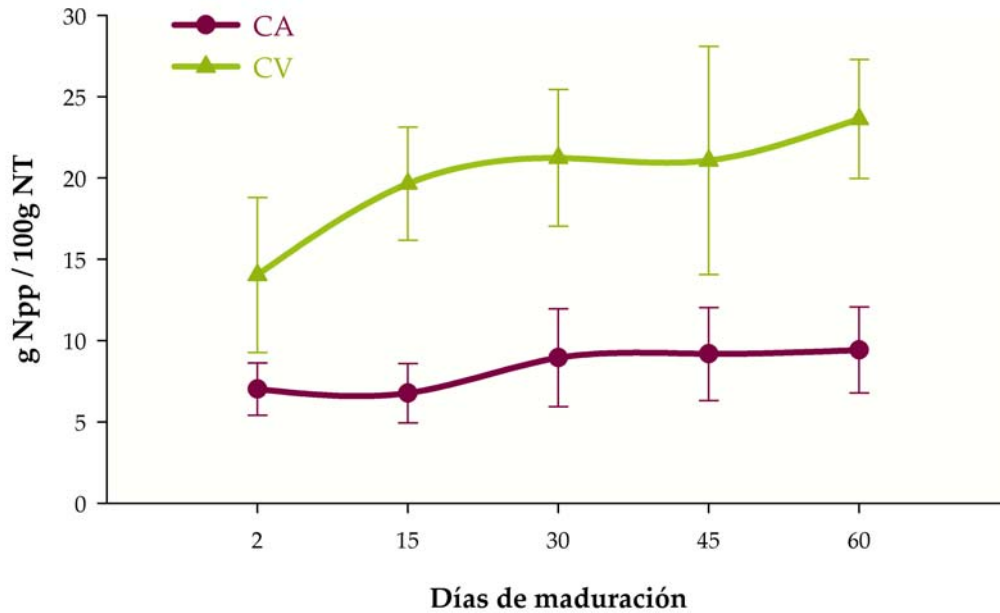


Figura 49. Evolución del Nitrógeno de los Polipéptidos (Npp) expresado en porcentaje de NT de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

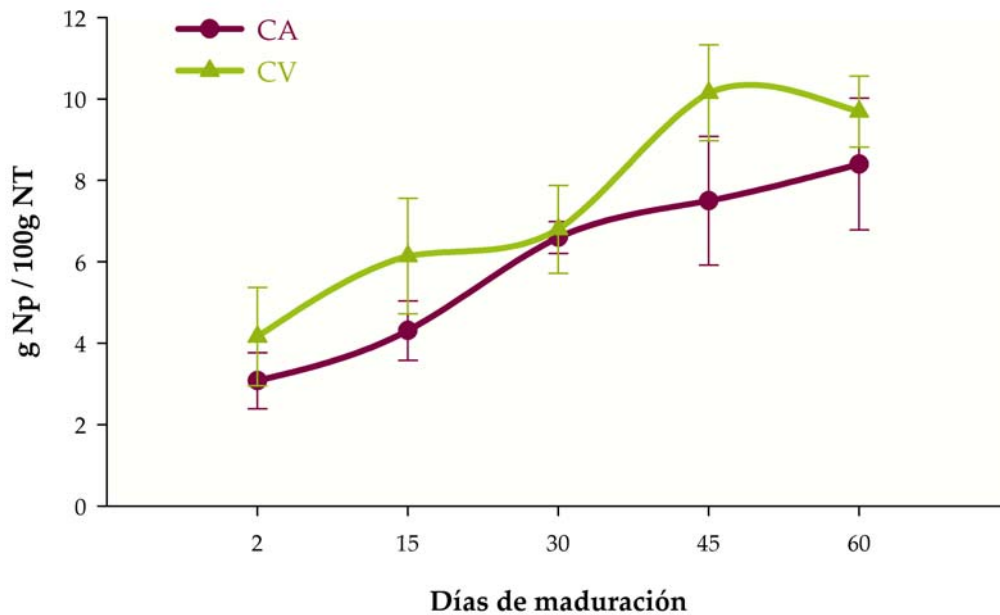


Figura 50. Evolución del Nitrógeno de los péptidos (Np) expresado en porcentaje de NT de las muestras de quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

Los valores de Npp y de Np, fueron significativamente mayores ($p < 0,001$) en los quesos elaborados con CV, desde los primeros días de la maduración. De esta manera, a los 2 días, se observaron para el Npp valores significativamente superiores ($p < 0,05$) en quesos elaborados con CV, alcanzando a los 60 días un porcentaje del 23,63% frente al 9,42% que presentaron los quesos elaborados con CA. Este aumento del Npp se correlaciona negativamente ($p < 0,001$) con el descenso que experimenta el NC. Con respecto al Np, los valores encontrados en los quesos elaborados con CV fueron superiores durante todo el periodo de maduración, aunque a partir de los 30 días no presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Este mayor contenido en péptidos en los quesos elaborados con CV podría corresponderse, como se ha dicho anteriormente, con la mayor actividad de las peptidasas bacterianas en estos quesos como consecuencia de la gran liberación de péptidos de mediano y gran tamaño provocada por las cinarasas.

Autores como Pino (2007), Tejada (2001), Prados (2005), o Galán (2008), observaron también en otras variedades de queso de cabra y oveja elaborados con dos tipos de coagulantes, valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) de NP y NC, y significativamente superiores ($p < 0,05$) de Npp y Np en los quesos elaborados con CV frente a los elaborados con CA.

4.1.2.2.f) Análisis multivariante

Análisis discriminante

- Aplicación con relación al tiempo de maduración

Se ha utilizado el AD para determinar que variables determinadas analíticamente (NS, NNP, N-NH₃ y NAA) tienen mayor capacidad diferenciadora en los distintos periodos de maduración.

Los valores de Lambda de Wilks y de valor F se representan en la **Tabla 25**, y muestran, que las fracciones nitrogenadas que han contribuido en mayor medida a diferenciar los distintos periodos de maduración fueron el NNP y el NAA. Estas variables presentaron valores de Lambda de Wilks y de valor F de 0,49 y 0,65 y de 13,74 y 6,85, respectivamente.

Tabla 25. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	NS	NNP	N-NH ₃	NAA
Lambda de Wilks	0,78	0,49	0,86	0,65
Valor F	3,62	13,74	2,20	6,85

En la **Tabla 26** se muestran las distancias que se establecen entre los diferentes días de maduración, en función de los componentes nitrogenados analizados, observando que las menores distancias se encuentran entre los quesos elaborados entre 15 y 30 días, ya que presentan una distancia de los cuadrados de Mahalanobis de 2,0. Si comparamos con las distancias encontradas en otros quesos vemos que, Tejada (2001), Pino (2007) y Galán (2008) determinaron las menores distancias para los quesos elaborados entre los 2 y 15 días.

Tabla 26. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis

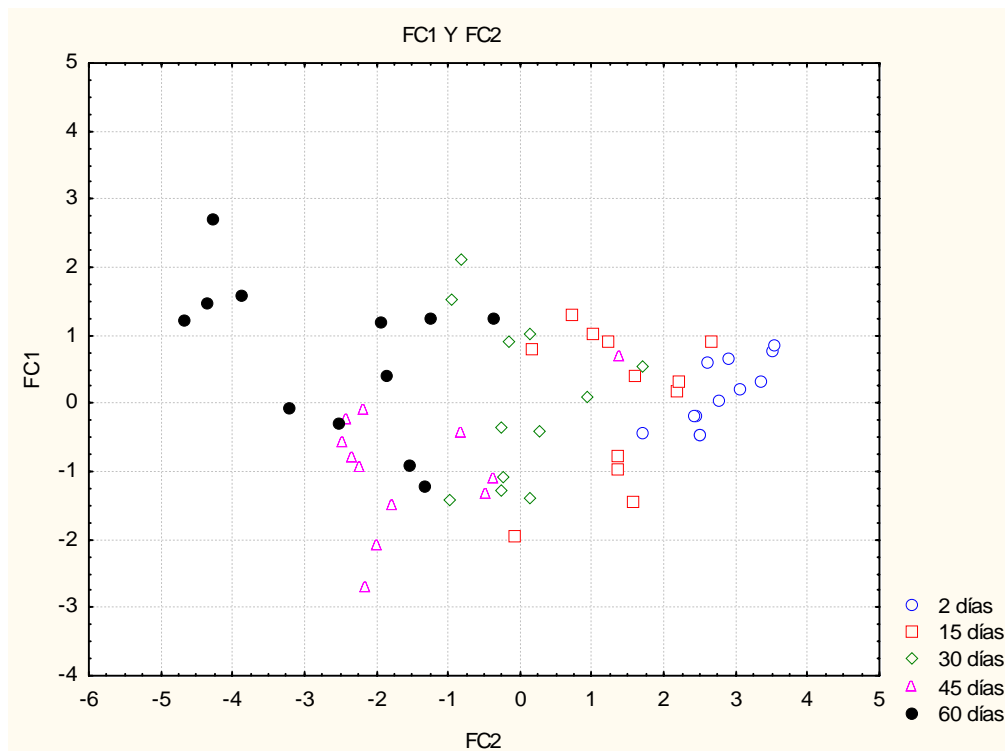
	2	15	30	45	60
2	0,0	2,3	8,4	19,3	29,2
15	2,3	0,0	2,0	9,0	16,0
30	8,4	2,0	0,0	3,3	7,3
45	19,3	9,0	3,3	0,0	3,9
60	29,2	16,0	7,3	3,9	0,0

A partir de las variables establecidas se obtienen las funciones de clasificación, y con ellas la matriz de clasificación (**Tabla 27**), en la que van a aparecer correctamente clasificados el 72% de los quesos. El grupo que se clasificó de manera correcta en mayor medida fue el de los quesos con dos días de maduración, con un porcentaje de acierto del 92%, ya que de los 12 quesos pertenecientes a este grupo, once se clasificaron correctamente y sólo uno se clasificó en el grupo de los 15 días de maduración. Los quesos con 15 y 30 días de maduración presentaron porcentajes del 58% (estando correctamente clasificados 7 de los 12 quesos del grupo), mientras que aquellos con 45 y 60 días se clasificaron de manera correcta en un 75% del total (9 quesos de cada 12).

Tabla 27. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	2	15	30	45	60
2	92	11	1	0	0	0
15	58	3	7	1	1	0
30	58	0	2	7	2	1
45	75	0	1	0	9	2
60	75	0	0	1	2	9
Total correcto	72	14	11	9	14	12

Mediante las dos primeras funciones canónicas se representan en el diagrama de dispersión (**Figura 51**) los quesos con 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

**Figura 51.** Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2

Si aplicáramos el AD de forma separada a los quesos elaborados con diferente coagulante obtendríamos resultados diferentes. Así, tras observar la **Tabla 28**, se puede ver que en quesos elaborados con CV, las fracciones nitrogenadas con mayor capacidad discriminante fueron el NNP y el NAA, con valores de Lambda de Wilks y valor F de 0,43 y 0,47 y de 8,18 y 7,13, respectivamente.

Tabla 28. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	NS	NNP	N-NH ₃	NAA
Lambda de Wilks	0,76	0,43	0,71	0,47
Valor F	1,93	8,18	2,55	7,13

Sin embargo, en la **Tabla 29**, vemos que los valores de Lambda de Wilks y de valor F que se calcularon para quesos elaborados con CA, determinaron que las variables con mayor capacidad discriminante fueron NS y NAA, con valores de 0,53 y de 4,94 y 4,86, respectivamente.

Tabla 29. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	NS	NNP	N-NH ₃	NAA
Lambda de Wilks	0,53	0,81	2,01	0,53
Valor F	4,94	1,31	2,01	4,86

Al hacer la matriz de clasificación de los quesos tras haber aplicado el AD de manera separada, se observó que para los quesos elaborados con CV se obtendría el 81% de los quesos correctamente clasificados, porcentajes más altos que si se aplica de manera conjunta. Por lo que se podría concluir que los quesos elaborados con CV discriminan mejor a la proteólisis que los elaborados con CA.

- Aplicación con relación al tipo de coagulante

Si observamos la **Tabla 30**, vemos que es el NS la fracción nitrogenada que presenta una mayor capacidad discriminante de los quesos elaborados con los diferentes coagulantes.

Tabla 30. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tipo de coagulante

	NS	NNP	N-NH ₃	NAA
Lambda de Wilks	0,33	0,82	0,94	0,95
Valor F	110,15	12,27	3,70	2,82

Con las funciones de clasificación que se han obtenido se elabora la matriz de clasificación (**Tabla 31**) en la que aparecen correctamente clasificados el 93% del total de los quesos. De los 30 quesos elaborados con CA, 29 se clasificaron correctamente, mientras que uno lo hizo dentro del grupo de los elaborados con CV, representando un porcentaje del 97%. Por otra parte, el 90% de los quesos elaborados con CV se clasificaron de manera correcta, confundándose 3 quesos de 30, con los elaborados con CA.

Tabla 31. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	CA	CV
CA	97	29	1
CV	90	3	27
Total correcto	93	32	28

Análisis de componentes principales

En la **Tabla 32** se muestran los resultados obtenidos del análisis de componentes principales (ACP) de las fracciones nitrogenadas.

Tabla 32. Análisis de componentes principales de datos de las fracciones nitrogenadas de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y CV a lo largo de la maduración

	Componente principal	
	1	2
NS	0,9	-0,43
NNP	0,96	0,23
NAA	0,95	0,19
N-NH ₃	0,9	0,29
NP	-0,96	-0,23
NC	-0,9	0,43
Npp	0,76	-0,64
Np	0,96	0,22

Se puede observar que el CP1 (que explica el 84,54% del total de la varianza) se correlacionó de manera negativa con el NP y NC, mientras que lo hizo de manera positiva con el NS, NNP, NAA, N-NH₃, Npp y NP. NNP, NP y Np fueron las variables que presentaron una correlación más alta con el CP1. El CP2 (justificado por el 12,17% del total de la varianza) se correlacionó de forma positiva con el NNP, NAA, N-NH₃, NC y NP, y de forma negativa con el NS, NP y Npp. Siendo el Npp, NC y NS las fracciones que presentan una correlación más alta con este CP2.

En la **Figura 52** se representan los quesos en un plano definido por los dos componentes principales extraídos. Se observa como el CP1, agrupa a los quesos en función del tiempo de maduración, apareciendo los quesos con 2 días en el hemisferio izquierdo del gráfico y los de 60 días en el derecho. Por tanto, podemos afirmar que el CP1 se corresponde con el tiempo de maduración. El CP2 nos agrupa a los quesos elaborados con CV en la parte inferior del gráfico, mientras que los elaborados con CA quedan en la superior. Por tanto, podríamos afirmar que el CP2 se corresponde con el tipo de coagulante.

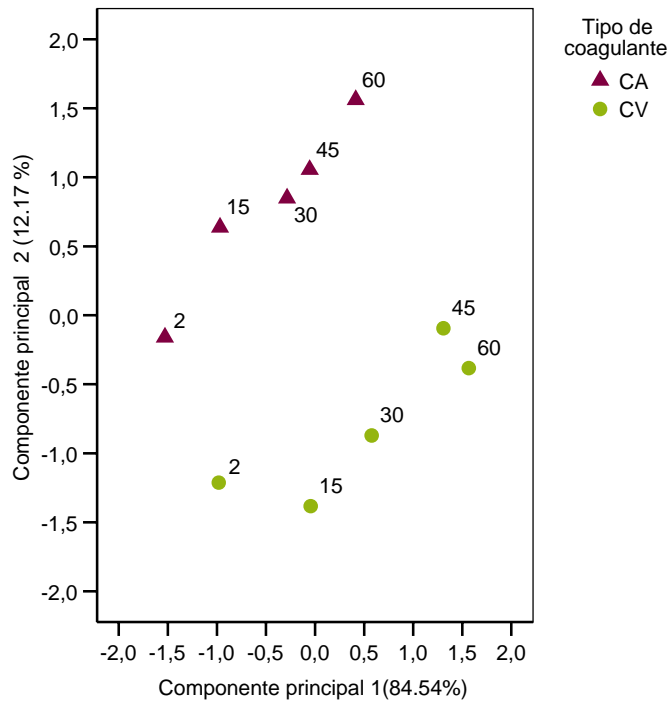


Figura 52. Representación en el plano definido por los 2 componentes principales extraídos con los valores de las fracciones nitrogenadas de los quesos elaborados con CV y CA, a lo largo de la maduración

4.1.2.3. Cambios en los péptidos hidrófobos e hidrófilos

Son varios los autores que han utilizado la relación entre los péptidos hidrófobos (HO) e hidrófilos (HI) para estudiar la proteólisis de los quesos, ya que cada tipo de queso presenta un perfil peptídico típico. (Lau *et al.*, 1991; Uceda *et al.*, 1994a; González de Llano *et al.*, 1995; Parra *et al.*, 1996; Mohedano *et al.*, 1998; Gaya *et al.*, 1999 y 2003; Mallatou *et al.*, 2004).

En las **Figuras 53** y **54** se muestran los cromatogramas RP-HPLC de la fracción de NS de los quesos elaborados con CA y CV a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

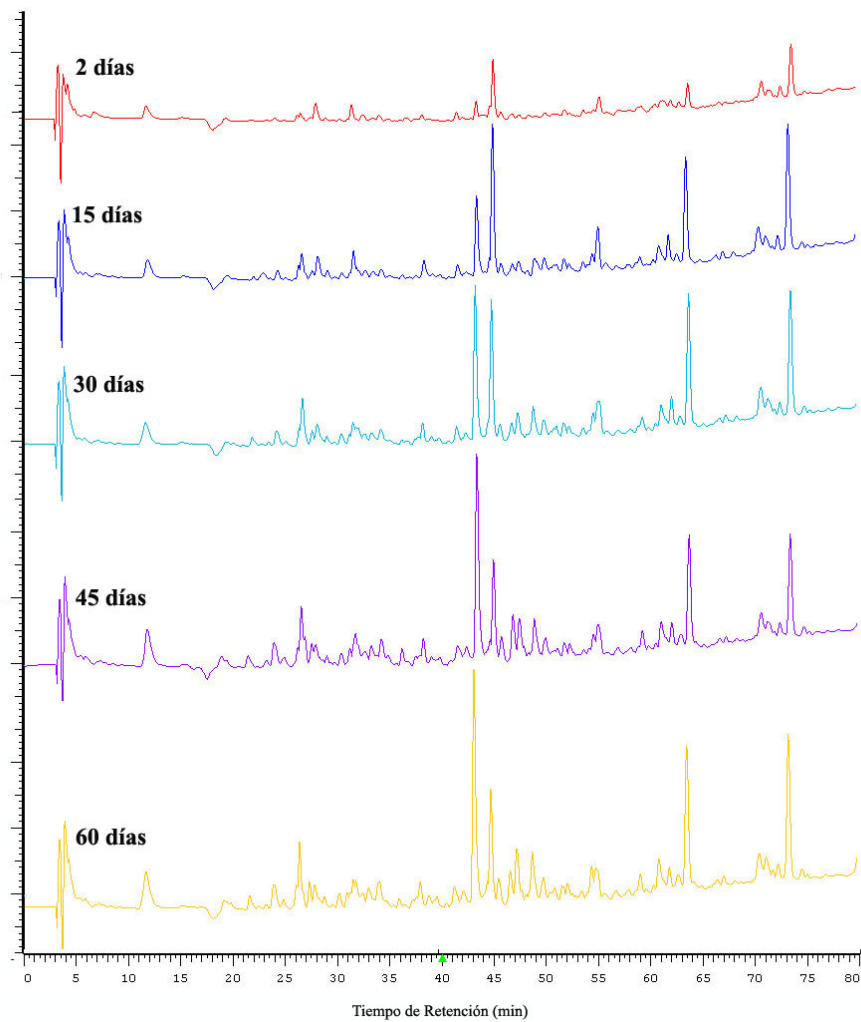


Figura 53. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción NS de las muestras de quesos elaborados con CA a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. Detección a 214 nm

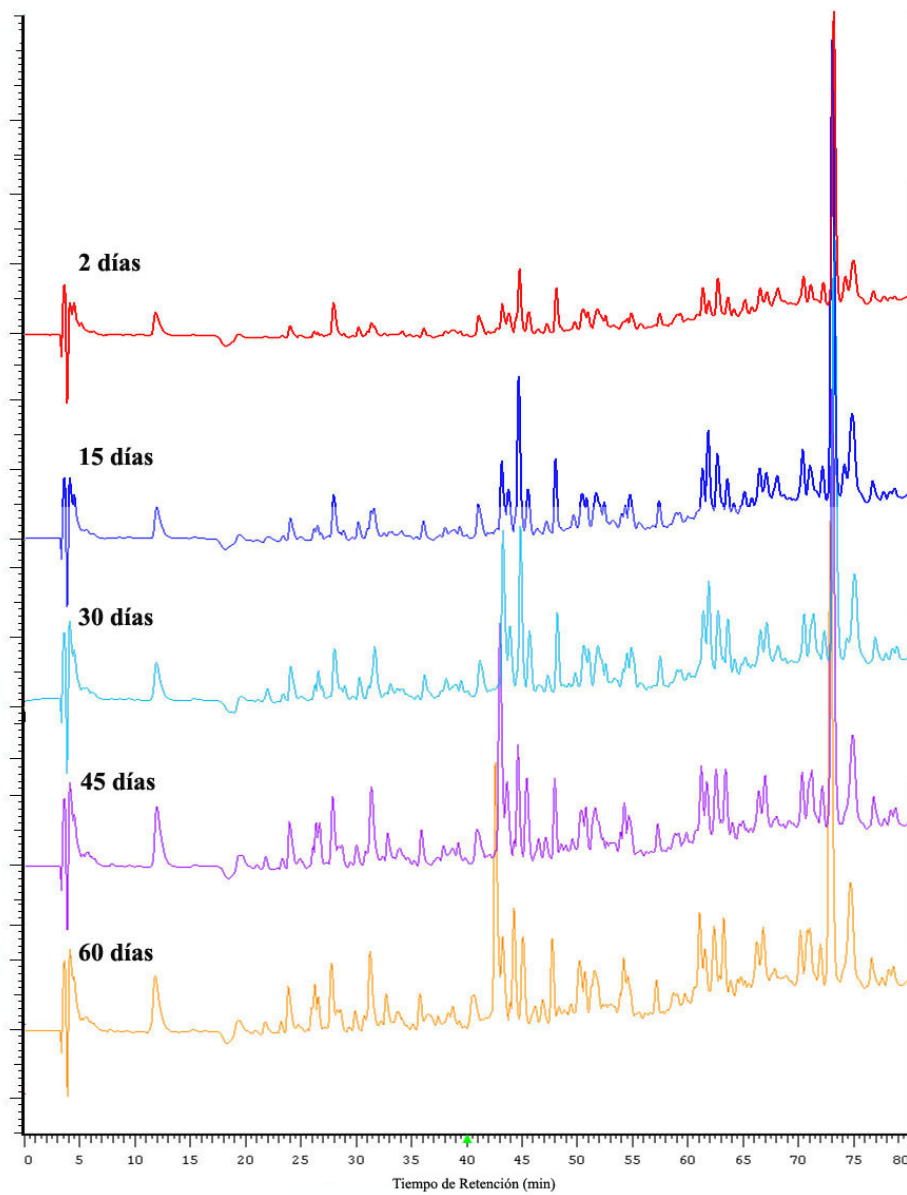


Figura 54. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción NS de las muestras de quesos elaborados con CV a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. Detección a 214 nm

La **Tabla 33** muestra las medias y desviaciones estándar de los péptidos totales hidrófobos (HO) e hidrófilos (HI) y el índice HO/HI, expresados como unidades de área cromatográfica por gramo de ST (uac/g ST), a los 2, 15, 30, 45 y

60 días de maduración de los quesos elaborados con CA y CV. En las **Figuras 55 y 56** se representan gráficamente estos valores.

Tabla 33. Cambios en los péptidos hidrófobos (HO) e hidrófilos (HI) en fracciones de NS de queso de Murcia al Vino, elaborados con CV y CA. (Resultados expresados como uac/g ST) a lo largo de la maduración

Coagulante	Días de maduración				
	2	15	30	45	60
CV					
HO	193,8±57,1 ^b	301,0±28,4 ^c	356,0±72,8 ^{cd}	408,5±97,1 ^d	417,7±79,1 ^d
HI	24,4±4,8 ^a	45,7±1,93 ^b	53,0±12,7 ^{bc}	62,6±21,7 ^c	80,14±19,3 ^d
HO/HI	7,9±4,2 ^b	6,6±0,6 ^{ab}	6,7±3,1 ^{ab}	6,5±5,3 ^b	5,2±1,9 ^{ab}
TOTAL	218,2	346,7	408,9	471,1	497,9
% HO	88,1	86,8	86,7	86,0	83,6
% HI	11,9	13,2	13,3	14,0	16,4
CA					
HO	69,7±3,6 ^a	136,6±6,1 ^{ab}	154,7±17,8 ^{ab}	171,1±35,2 ^b	192,5±44,5 ^b
HI	27,2±11,4 ^a	35,1±12,3 ^{ab}	44,8±18,4 ^b	59,0±14,8 ^c	64,9±14,1 ^c
HO/HI	2,6±1,0 ^a	4,0±1,3 ^{ab}	3,5±2,5 ^{ab}	2,9±1,6 ^a	3,0±1,2 ^a
TOTAL	97	171,7	199,4	230,1	257,4
% HO	72,6	79,9	77,6	73,9	74,2
% HI	27,4	20,1	22,4	26,1	25,8

Resultados del test de Fisher (LSD); medias del mismo parámetro sin superíndices comunes (a-d) son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

Tal y como se puede comprobar (**Tabla 33 y Figura 55 y 56**) el tiempo de maduración afectó de manera altamente significativa ($p < 0,001$) al contenido en HI y HO de los quesos, observándose un incremento en su concentración, (principalmente en los picos eluidos entre los 40 y 75 minutos) a lo largo de todo este periodo.

El incremento de los péptidos HI e HO es progresivo durante toda la maduración aunque es más acusado en los péptidos HO, que experimentan su principal aumento en los primeros 30 días de maduración (con un aumento de aproximadamente el 55% de la cantidad total de ellos, frente al 47% que experimentan los péptidos HI en ese mismo periodo). Por otra parte, se observa

que el periodo de maduración no afectó de manera significativa ($p>0,05$) a los valores del ratio HO/HI (**Figura 57**). Esta relación siguió, en los quesos elaborados con CA, una evolución irregular, aumentando entre los 2 y los 15 días de maduración, para disminuir luego, aunque no de manera significativa ($p>0,05$), hasta el final de la misma.

Los niveles superiores encontrados para los péptidos HO con respecto a los HI (que alcanzaron a los 60 días en quesos elaborados con CA, valores de 192,5 y de 64,9 uac /g ST, respectivamente) también fueron observados en otras variedades de queso de cabra (Sousa *et al.*, 2002; Trujillo *et al.*, 2002). Mientras que por el contrario, Pino (2007), en queso de cabra y Galán (2008), en queso de oveja, detectaron valores superiores para los péptidos HI a los 60 días de maduración.

El contenido en péptidos HI en otras variedades de queso (Trujillo *et al.*, 2002; Katsiari *et al.*, 2001; Mallatou *et al.*, 2004; Garde *et al.*, 2004; Galán, 2008; Pino *et al.*, 2009) aumentó al igual que en nuestro caso, durante los 60 días de maduración; aunque para todos ellos, comience a descender a partir de los 90-120 días.

En relación a los péptidos HO, sólo Trujillo *et al.* (2002), Pino *et al.* (2009) y Galán (2008) observaron un incremento en su concentración durante los primeros 60 días de maduración. Mientras que para Mallatou *et al.* (2004); Katsiari *et al.* (2001) o Garde *et al.* (2002), este contenido en péptidos HO descendieron durante los primeros 25-30 días de la maduración; atribuyéndolo a su propia degradación (Picón *et al.*, 1994; Michaelidou *et al.*, 1998).

El índice HO/HI, muestra una evolución irregular a lo largo de toda la maduración, aunque no se establecieron diferencias significativas ($p>0,05$) al final de la misma. Otros autores por el contrario, observaron un descenso en los valores para este ratio (Katsiari *et al.*, 2001; Trujillo *et al.*, 2002; Saldo *et al.*, 2002; Mallatou *et al.*, 2004; Garde *et al.*, 2002; Hayaloglu *et al.*, 2005, Pino *et al.*, 2009 o Galán, 2008).

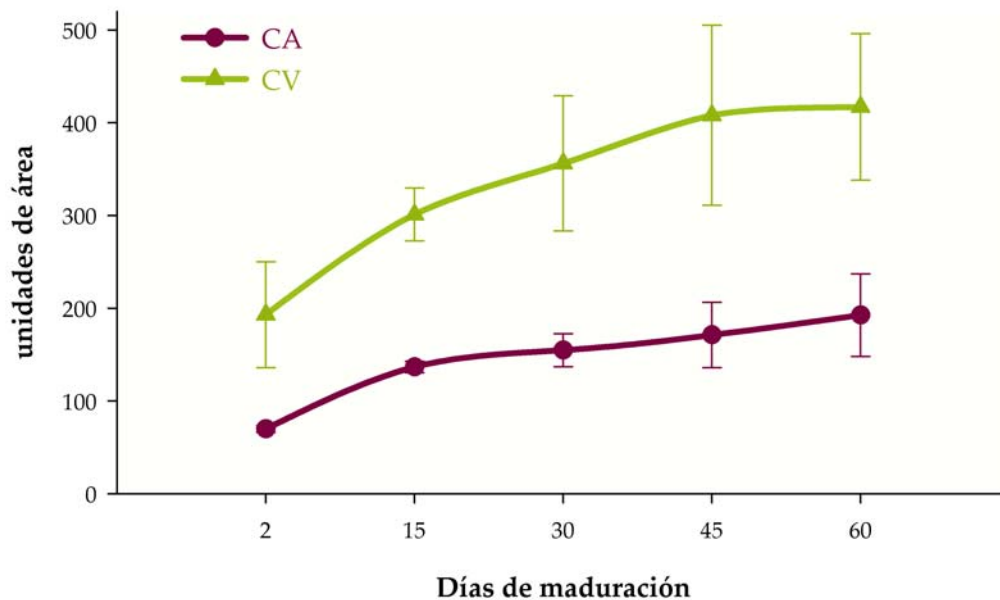


Figura 55. Evolución de los péptidos HO de muestras de queso de Murcia al Vino elaboradas con CA y CV a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. (Datos expresados como uac/gST)

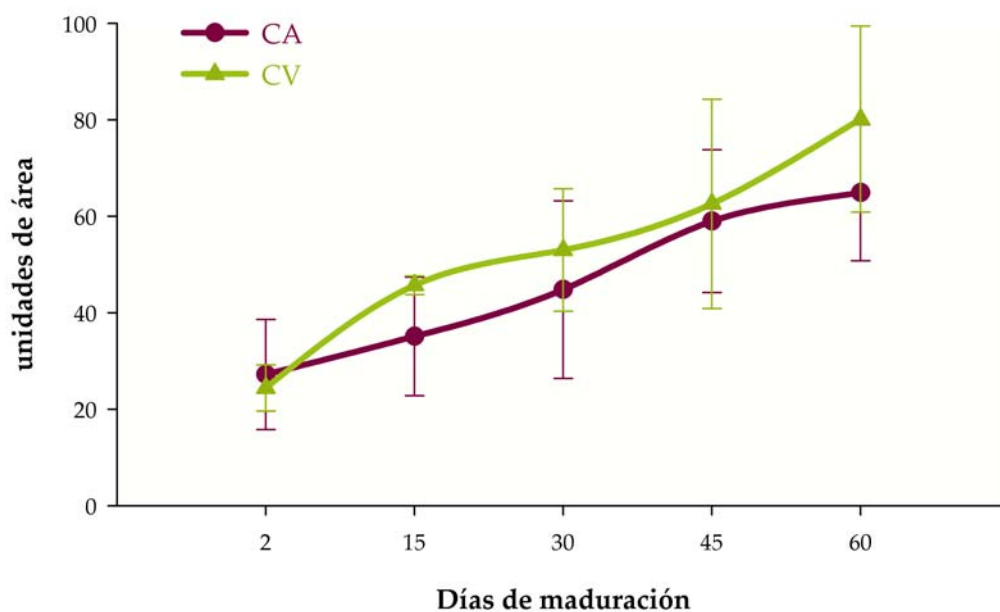


Figura 56. Evolución de los péptidos HI de muestras de queso de Murcia al Vino elaboradas con CA y CV a los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. (Datos expresados como uac/gST)

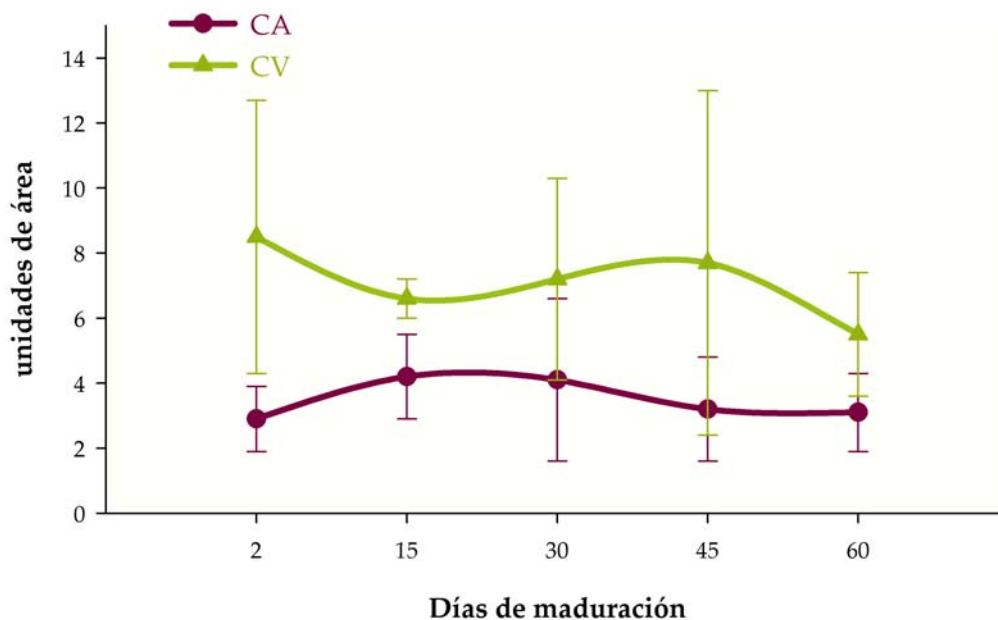


Figura 57. Evolución de la relación HO/HI de queso de Murcia al Vino elaboradas con CA y CV en los 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración

Tal y como se comprueba en la **Tabla 33** y en las **Figuras 55, 56 y 57**, el tipo de coagulante utilizado afectó significativamente al contenido de péptidos totales, de péptidos HO ($p < 0,001$), péptidos HI ($p < 0,05$), y al ratio HO/HI ($p < 0,05$). Así, a lo largo de la maduración, los quesos elaborados con CV presentan valores mayores de péptidos totales, péptidos HO, de HI y de la relación HO/HI, que los elaborados con CA. Esta diferencia es más evidente en el caso de los péptidos HO, que presentan valores significativamente mayores ($p < 0,05$) en los quesos elaborados con CV; observándose al final de la maduración valores de 417,7 y de 192,5 uac/g ST en quesos elaborados con CV y CA, respectivamente.

El porcentaje de los péptidos HO, disminuye ligeramente en el caso de los quesos elaborados con CV (con valores del 88% y 83% a los 2 y 60 días, respectivamente). Estos porcentajes son superiores a los encontrados en los quesos elaborados con CA, que presentan una evolución irregular pasando del 72% a los 2 días, al 74% a los 60.

La relación HO/HI, en los quesos elaborados con CV, muestra un descenso a lo largo de la maduración aunque no llega a ser significativo ($p > 0,05$). Este ratio es

superior al calculado para los quesos elaborados con CA durante todos los días de la maduración, sin duda debido a su gran contenido en péptidos HO. Estos datos concuerdan con los encontrados por Pino (2007) y por Galán (2008), en quesos de cabra y oveja, respectivamente.

El hecho de que los quesos elaborados con CV presenten valores muy superiores en péptidos HO a los que se observan en los elaborados con CA, coincide con lo encontrado por Pino *et al.* (2009) o por Galán (2008). De hecho, se puede observar que los cromatogramas obtenidos para los quesos elaborados con CV y CA (**Figuras 53 y 54**) son totalmente distintos desde los dos días de maduración, lo que demuestra que desde que se elabora el queso, las cinasas del CV manifiestan mayor preferencia que la quimosina, para hidrolizar enlaces entre ciertas regiones hidrofóbicas de α y β -CN (Macedo *et al.*, 1996).

También podemos comprobar, que entre los minutos 40 y 80 de los cromatogramas, la altura de los picos en quesos elaborados con CV son mucho mayores que los elaborados con CA; existiendo incluso, algunos picos, (principalmente los eluidos entre los 40 y 50 minutos, y entre 60 y 80 minutos), que no aparecen en el cromatograma de quesos elaborados con CA.

La existencia de estos picos, unido al hecho de que la cantidad total de péptidos en los quesos elaborados con CV sea casi el doble al de los elaborados con CA (497,9 frente a 257,4 uac/ST), sugiere que *C. cardunculus* va a ser capaz de romper un mayor número de enlaces en las caseínas, así como, enlaces distintos a los que rompe la quimosina; produciendo, por tanto, una mayor cantidad de péptidos, e incluso péptidos diferentes a los quesos elaborados con CA.

En este sentido, Macedo *et al.* (1996), y más tarde Gaya *et al.* (1999), en estudios en queso Manchego elaborado con diferentes coagulantes, observaron que, proteinasas de *C. cardunculus* rompían enlaces en ciertas regiones HO de las α_{s1} -CN bovinas (Ala₁₆₃-Trp-Tyr-Tyr-Tyr-Val₁₆₇) y de las β -CN (Ala₁₈₉-Phe-Leu-Leu-Tyr₁₉₃), mientras que la quimosina rompía sólo Trp₁₆₄-Trp₁₆₅, en la región de la α_{s1} -CN, y Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ y Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ en la región de β -CN.

4.1.2.3.a) Análisis multivariante

Análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados obtenidos del análisis de componentes principales (ACP) de los péptidos HI e HO en la fracción soluble en agua de los quesos aparecen en la **Tabla 34**.

Se han extraído dos CP. El CP1 explica el 63,8% del total de la varianza y se correlaciona positivamente con péptidos HO, HI y la relación HO/HI. Son los péptidos HO la variable que presenta una correlación más alta con este CP1. El CP2 explica el 35,1% del total de la varianza; se correlacionó positivamente con la relación HO/HI y negativamente con los péptidos HI, siendo la relación HO/HI la variable que presentó la correlación mas alta con el CP2.

Tabla 34. Análisis de componentes principales de péptidos HO e HI de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con CV a lo largo de la maduración

	Componente principal	
	1	2
HO	0,99	0
HI	0,7	-0,7
HO/HI	0,66	0,75

En la **Figura 58** se representan los quesos en un plano definido por los dos CP extraídos. Se observa que el CP1 agrupa los quesos en función del tipo de coagulante, ya que aparecen los quesos elaborados con CA en el hemisferio derecho, mientras que los elaborados con CV lo hacen en el izquierdo. Por otra parte, el CP2 se corresponde con el tiempo de maduración.

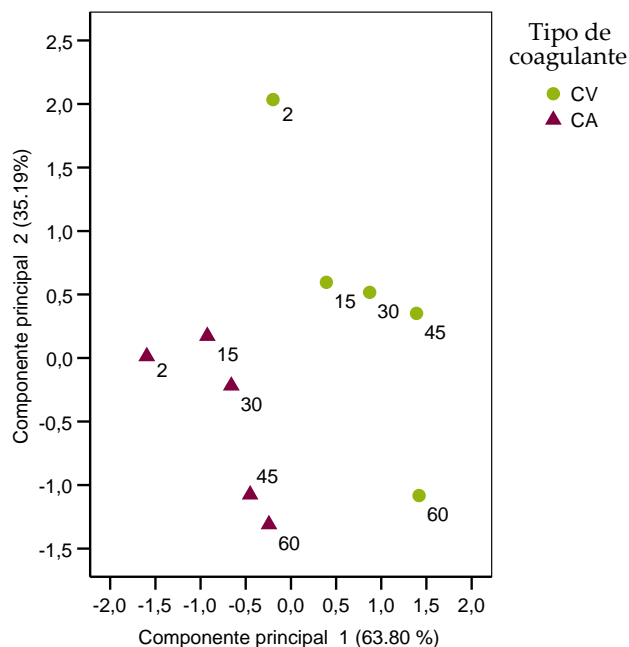


Figura 58. Representación en el plano definido por los 2 componentes principales extraídos con los valores de los péptidos HO e HI de los quesos elaborados con CV y CA a lo largo de la maduración

4.1.2.4. Cambios en los aminoácidos libres

El análisis de aminoácidos libres se realizó mediante RP-HPLC y detección fluorimétrica, que mejora la sensibilidad de detección respecto de la detección UV.

En la **Figura 59.a)** y **59.b)** se muestran los cromatogramas típicos de una muestra de queso elaborado con CA y CV, respectivamente. Los aminoácidos fueron identificados de acuerdo a sus tiempos de retención por comparación con cromatogramas de una solución estándar.

En la **Figura 60** y **Tabla 35** se muestra la evolución de los aminoácidos libres totales (AAT) (expresada en mg AAT/100g de ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal (CV).

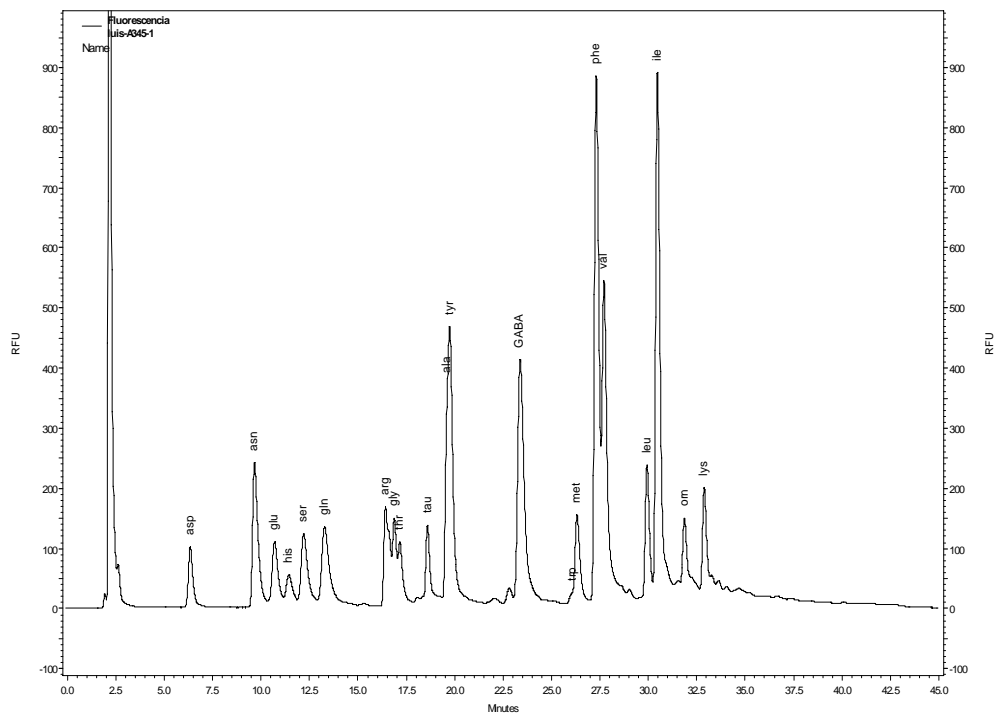


Figura 59.a). Cromatograma RP-HPLC de los aminoácidos CA

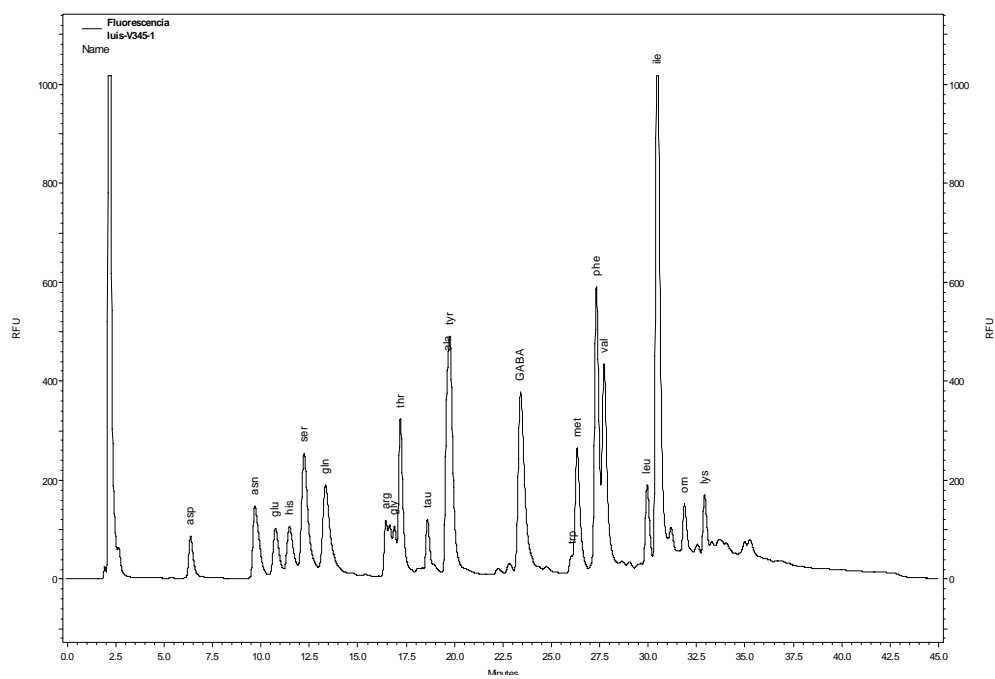


Figura 59.b). Cromatograma RP-HPLC de los aminoácidos CV

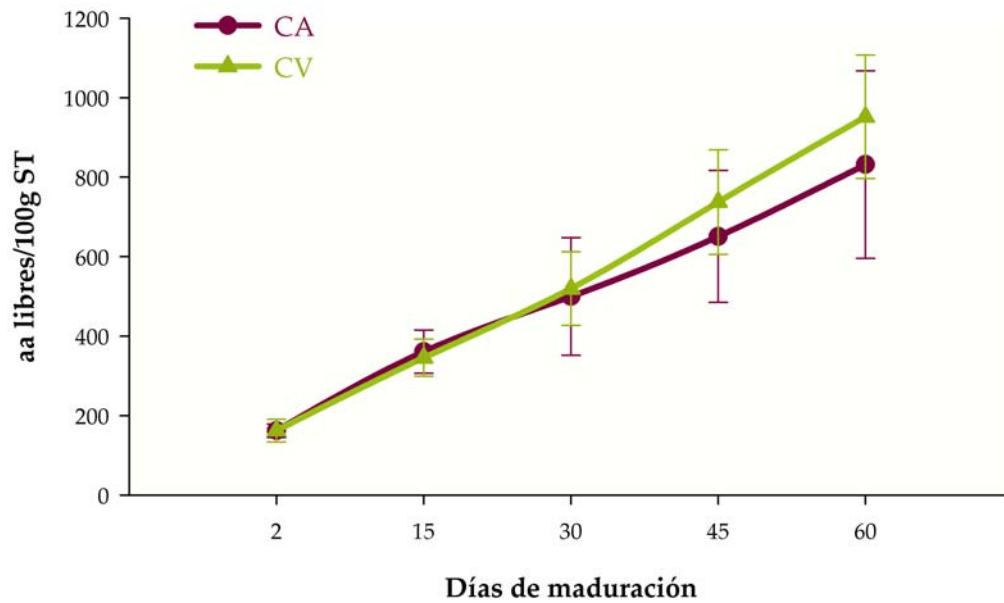


Figura 60. Evolución de los aminoácidos libres totales (mg AAT/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CV y CA

Tal y como se puede observar, las concentraciones de AAT aumentan significativamente ($p < 0,01$) a lo largo de la maduración en todas las muestras de queso analizados, alcanzando en los quesos elaborados con CA valores de 831,59 mg de AAT/100gES a los 60 días. Este incremento se corresponde con la progresiva liberación de los aminoácidos por los agentes proteolíticos a través de procesos bioquímicos sufridos durante la maduración del queso. La misma evolución ha sido observada también en otras variedades de quesos como el Teleme (Mallatou *et al.*, 2004; Pappa y Sotirakoglou, 2008), el Manchego (Marcos y Mora, 1982; Póveda *et al.*, 2004), el Tulum (Hayaloglu *et al.*, 2007), el Kefalograviera (Katsiari *et al.*, 2001) o el queso de Los Pedroches (Pino, 2007) entre otros.

Tabla 35. Evolución en el contenido de aminoácidos libres (medias y desviaciones estándar) en quesos de Murcia al Vino elaborados con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal (CV) a lo largo de la maduración.

Tipo de coagulante	Días de maduración											
	2		15		30		45		60		CA	CV
ASP	3,38±0,08 ^a	3,84±0,54 ^a	6,19±0,44 ^{ab}	5,84±1,42 ^{ab}	7,97±2,13 ^{bc}	7,49±2,37 ^b	10,16±5,53 ^{bc}	10,47±4,23 ^c	13,10±3,50 ^c	12,46±5,81 ^c	CA	CV
ASN	4,86±2,16 ^a	3,49±1,05 ^a	14,27±2,18 ^{ab}	13,92±4,86 ^{ab}	17,99±6,94 ^b	17,87±0,94 ^b	24,35±8,23 ^{bc}	23,96±2,74 ^{bc}	32,08±7,30 ^c	31,43±5,50 ^c	CA	CV
GLU	7,76±2,20 ^a	8,42±2,93 ^a	13,37±2,80 ^a	8,30±1,69 ^a	11,99±4,20 ^a	15,01±2,10 ^a	13,19±3,20 ^a	13,95±3,10 ^a	13,93±3,13 ^a	16,76±3,90 ^a	CA	CV
HIS	7,75±1,17 ^a	8,16±0,99 ^a	15,83±5,64 ^{ab}	15,88±2,27 ^{ab}	12,47±2,62 ^{ab}	19,07±8,98 ^{bc}	15,41±3,52 ^{ab}	22,15±6,30 ^c	18,52±5,54 ^{bc}	28,52±8,30 ^d	CA	CV
SER	4,29±0,35 ^a	4,19±0,28 ^a	11,82±2,65 ^{ab}	11,08±4,04 ^{ab}	11,65±4,37 ^{ab}	17,72±3,50 ^b	16,39±4,72 ^b	25,53±5,60 ^c	21,33±8,20 ^{bc}	35,29±6,50 ^d	CA	CV
GLN	4,05±0,88 ^a	3,88±0,87 ^a	10,40±3,60 ^{ab}	10,17±3,66 ^{ab}	12,36±2,90 ^{ab}	15,82±4,30 ^b	16,31±5,20 ^b	23,41±6,30 ^c	20,85±8,60 ^{bc}	31,58±9,20 ^d	CA	CV
ARG	5,36±1,16 ^a	5,67±0,98 ^a	18,07±1,95 ^b	14,42±2,48 ^{ab}	26,69±5,00 ^c	24,10±5,98 ^{bc}	36,60±6,20 ^d	40,53±1,03 ^d	49,13±6,90 ^{de}	54,77±14,53 ^e	CA	CV
GLY	3,83±1,80 ^a	3,20±1,57 ^a	7,17±2,30 ^a	6,08±2,45 ^a	11,91±5,30 ^{ab}	10,09±2,30 ^{ab}	17,46±5,60 ^b	16,07±3,84 ^b	22,73±5,60 ^c	20,35±8,60 ^c	CA	CV
THR	2,80±0,34 ^a	2,83±0,62 ^a	6,94±1,30 ^a	7,95±3,01 ^{ab}	8,79±2,19 ^{ab}	14,15±5,30 ^b	11,12±0,78 ^{ab}	18,90±8,30 ^{bc}	14,33±4,21 ^b	26,14±8,30 ^c	CA	CV
TAU	9,12±2,56 ^{ab}	6,95±1,20 ^a	9,59±0,71 ^{ab}	8,59±1,50 ^a	11,81±2,81 ^b	11,90±2,26 ^b	13,24±3,04 ^b	11,02±3,14 ^{ab}	13,69±1,92 ^b	14,32±3,56 ^b	CA	CV
ALA	18,13±5,92 ^a	18,18±6,54 ^a	27,21±5,90 ^{ab}	38,55±14,30 ^b	40,32±12,30 ^b	49,33±15,20 ^c	49,90±13,50 ^c	65,47±18,20 ^d	73,18±12,33 ^{de}	87,04±15,20 ^f	CA	CV
TYR	11,63±1,83 ^a	10,45±1,42 ^a	19,63±5,87 ^{ab}	19,05±2,22 ^{ab}	23,59±8,60 ^b	26,08±7,13 ^b	29,41±6,30 ^{bc}	32,68±5,80 ^c	35,06±9,30 ^c	40,44±9,60 ^d	CA	CV
GABA	9,62±1,65 ^a	7,02±3,10 ^a	17,34±5,42 ^{ab}	18,12±5,00 ^{ab}	25,12±5,80 ^{ab}	28,21±2,36 ^b	40,89±13,18 ^c	38,91±8,60 ^{bc}	52,95±12,60 ^d	56,06±15,20 ^d	CA	CV
TRP	4,20±0,87 ^a	5,23±1,13 ^a	6,46±2,50 ^a	7,02±2,13 ^a	7,66±1,98 ^a	10,16±3,65 ^a	8,53±2,90 ^a	11,35±2,36 ^a	11,41±2,33 ^a	14,56±3,58 ^a	CA	CV
MET	4,07±0,88 ^a	5,83±0,55 ^a	10,04±2,80 ^a	12,24±1,58 ^a	12,87±3,60 ^a	17,95±5,60 ^b	15,73±3,50 ^{ab}	23,22±5,90 ^b	20,58±7,36 ^b	29,78±7,90 ^c	CA	CV
PHE	5,87±0,64 ^a	5,92±1,71 ^a	21,39±4,22 ^b	17,79±2,39 ^b	31,14±13,90 ^{bc}	26,33±6,30 ^b	42,62±16,69 ^c	44,74±10,86 ^c	54,79±18,18 ^d	54,19±8,09 ^d	CA	CV
VAL	12,49±0,72 ^a	11,48±1,99 ^a	32,62±11,63 ^b	30,56±7,85 ^b	54,61±17,01 ^c	47,01±13,96 ^c	65,97±19,58 ^d	72,16±23,30 ^d	81,82±25,11 ^e	81,04±15,32 ^e	CA	CV
LEU	5,02±1,50 ^a	4,73±1,26 ^a	10,39±2,98 ^{ab}	9,22±2,64 ^{ab}	16,16±4,95 ^b	16,24±4,60 ^b	20,97±8,49 ^{bc}	22,80±4,83 ^{bc}	27,57±9,40 ^c	30,94±10,65 ^c	CA	CV
ILE	11,90±1,85 ^a	14,07±3,42 ^a	37,80±11,42 ^b	42,05±16,03 ^b	56,96±11,12 ^{bc}	63,25±20,67 ^c	71,05±20,98 ^d	88,52±23,13 ^e	87,58±28,03 ^e	102,20±28,12 ^f	CA	CV
ORN	7,52±3,22 ^a	10,48±6,78 ^a	12,25±6,25 ^a	21,59±3,78 ^{ab}	13,47±6,90 ^a	26,73±6,92 ^{bc}	23,18±5,21 ^{ab}	33,14±11,91 ^{bc}	37,05±8,24 ^c	42,59±20,10 ^c	CA	CV
LYS	10,55±5,17 ^a	9,23±6,07 ^a	16,17±8,30 ^a	15,24±3,31 ^a	23,55±5,57 ^{ab}	14,18±0,83 ^a	31,36±15,34 ^b	33,55±10,08 ^b	32,93±12,25 ^b	43,41±9,25 ^b	CA	CV
TOTAL	162,12±17,1	162,34±28,50	360,73±54,40	345,69±46,50	499,78±148,00	519,71±92,70	650,78±166,00	737,60±131,70	831,59±235,90	951,93±155,20	CA	CV

Resultado del tests de Fisher's (LSD); medias del mismo parametro en la misma linea sin superindices comunes (a-e) son estadísticamente diferentes (p<0,05).

CA: quesos elaborados con cuajo animal; CV: quesos elaborados con coagulante vegetal

Tabla 35. Evolución de los aminoácidos libres totales del queso de Murcia al Vino elaborado con coagulante animal y vegetal a lo largo de la maduración

Las concentraciones de AAT detectadas en este trabajo durante la maduración han sido muy similares a las observadas en otras variedades de queso de cabra (Pino, 2007; Oliszewski *et al.*, 2008) y a las observadas por Póveda *et al.* (2004) en queso Manchego, aunque superiores a las encontradas en otros quesos de cabra (Saldo *et al.*, 2002) o en el queso Teleme (Pappa y Sotirakoglou, 2008). En el queso Picón Bejes-Tresviso la concentración de aminoácidos totales fue mucho mayor que la del queso de Murcia al Vino, debido a la intensa actividad de las proteasas del *Penicillium roqueforti* que tiene lugar en este queso azul.

En la **Tabla 35** y en las **Figuras 61.a)** y **61.b)** se muestran las concentraciones de aminoácidos libres individuales (AAL) para el queso elaborado con CA y CV, respectivamente, durante el periodo de maduración. Por otra parte, en la **Tabla 36** se muestran los índices de correlación de Pearson y la significación estadística que se ha obtenido entre los AAL y el tiempo de maduración y tipo de coagulante, respectivamente.

Todos los AAL se incrementaron durante la maduración de forma significativa (**Tabla 35**). De hecho, se ha observado una alta correlación positiva (**Tabla 36**) entre el tiempo de maduración y todos los AAL, tanto en los quesos elaborados con CA, como en los elaborados con CV, coincidiendo con lo observado en otras variedades de queso (Oliszewski *et al.*, 2008; Poveda *et al.*, 2004; García-Palmer *et al.*, 1997; Bütikofer y Fuch, 1997; Barcina *et al.*, 1995). En líneas generales los AAL en los quesos elaborados con CV presentan correlaciones más altas con respecto a la maduración que los de los quesos elaborados con CA.

En todos los casos las correlaciones establecidas fueron significativas (**Tabla 36**), excepto en Glu e His de quesos elaborados con CA. La correlación más elevada entre AAL y días de maduración se observó en Gly y Leu y Thr y Met en quesos elaborados con CA y CV, respectivamente.

Se ha observado en las dos variedades del queso de Murcia al Vino (CV y CA) que los aminoácidos libres con valores más elevados fueron Ile, Val, Ala, Phe, y Gaba, a lo largo de todo el periodo de la maduración, suponiendo a los 60 días un 37% del total de AAT. Estos AAL son liberados durante la proteólisis que tiene lugar en el queso durante su maduración, fundamentalmente por la acción de enzimas proteolíticas de origen microbiano (Park, 2001). En el queso de Murcia al

Vino principalmente proceden de con *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* procedentes del cultivo iniciador utilizado. Las enzimas intracelulares liberadas tras la lisis de las bacterias del cultivo iniciador también contribuyen de forma importante al incremento de la concentración de AAL a partir de los 15 días de maduración (Oliszewski *et al.*, 2008).

Existe una gran variación en la concentración de AAL en las distintas variedades de queso al estar influenciado por numerosos factores como la materia prima, la tecnología de elaboración (tipo de cuajo, adición de cultivo iniciador y condiciones de maduración) la duración de la maduración o el tipo de proteolisis (Christensen *et al.*, 1995). A pesar de esta variabilidad, muchos de estos aminoácidos también han sido los mayoritarios en otras variedades de quesos, aunque con diferente concentración. Así, en el queso Cheddar, predominan Glu, Leu, Val, Ile, Lys y Phe (Puchades *et al.*, 1989; Wilkinson, 1993), en el queso Manchego, Glu, Val, Leu, Phe y Lys (Póveda *et al.*, 2004), en queso Teleme Lys, Leu, Val y Glu (Mallatou *et al.*, 2004, Pappa y Sotirakoglou, 2008), en queso Tulum, Leu, Ala, Val, Phe, Lys y Glu (Hayaloglu *et al.*, 2007) y en queso Idiazábal, Glu, Leu, Val, Phe y Lys (García-Palmer *et al.*, 1997).

Como ya se ha comentado, los microorganismos presentes en el queso son los que ejercen una mayor influencia en la concentración de AAL. Es este sentido, Oliszewski, *et al.* (2008) observaron en un queso de cabra con 60 días de maduración una concentración de AAL totales mucho más elevadas cuando se utilizaba *Lactobacillus rhamnosus* que cuando se utilizaba *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus casei*. De igual forma, el tipo de cultivo iniciador utilizado influyó en los AAL mayoritarios. Se ha demostrado en varios estudios (Pappa y Sotirakoglou, 2008; Oumer *et al.*, 2001; Garde *et al.*, 2002) que los quesos elaborados con un cultivo termófilo tienen un contenido en AAL mayor que los quesos elaborados con cultivos mesófilos. Esto puede deberse a que las bacterias termófilas se rompen antes liberando sus enzimas intracelulares en la matriz del queso e incrementando, por tanto, la actividad aminopeptidasa (Chapot-Chartier, 1996). Los quesos, como el queso de Murcia al Vino, elaborados con una mezcla de cultivos termófilos-mesofilos, presentan valores intermedios.

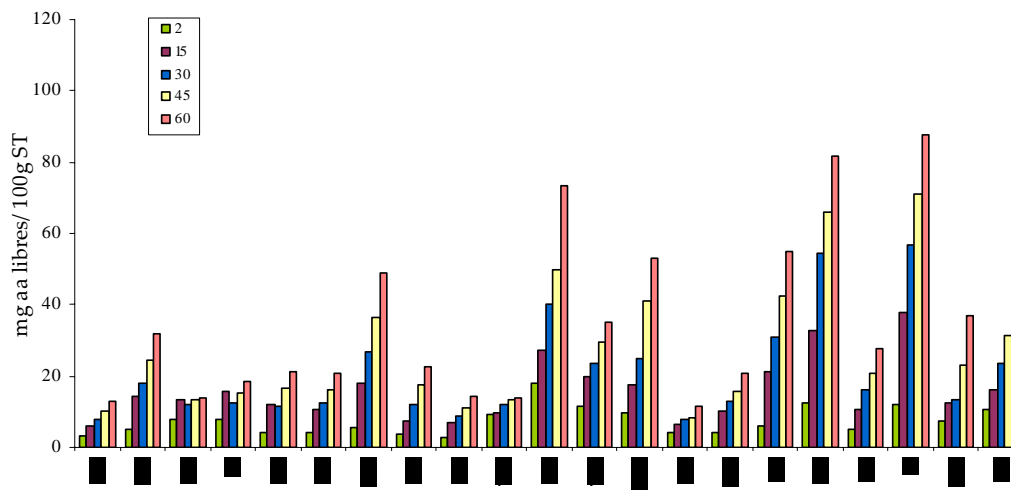


Figura 61.a). Evolución de los aminoácidos libres individuales (mg AAL/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CA

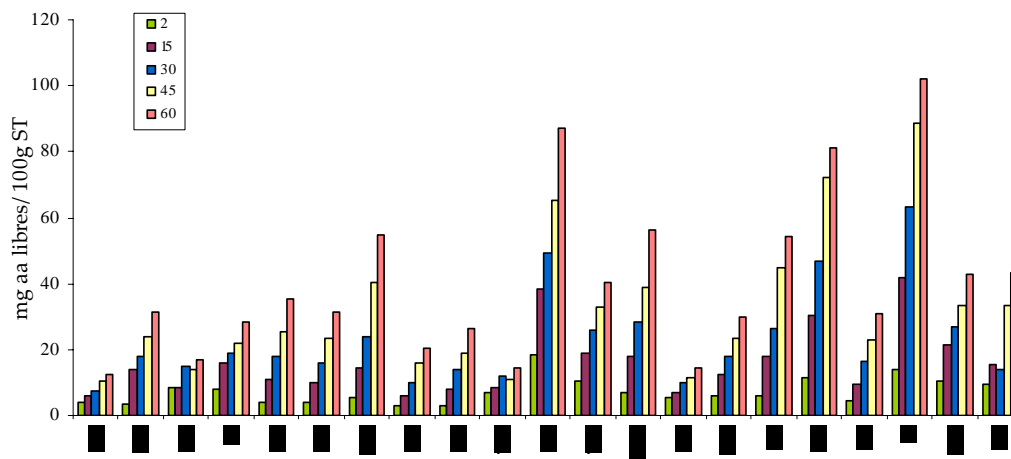


Figura 61.b). Evolución de los aminoácidos libres individuales (mg TFAA/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino elaborados con CV

Tabla 36. Niveles de significación ANOVA y coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de aminoácidos libres, tiempo de maduración y tipo de coagulante

aminoácidos	ANOVA		Correlación de Pearson	
	Tiempo maduración	Tipo coagulante	CA	CV
Asp	**	ns	0,996**	0,997**
Asn	***	ns	0,990**	0,987**
Glu	*	ns	0,753	0,907*
His	***	*	0,804	0,981**
Ser	***	*	0,962**	0,998**
Gln	***	*	0,986**	0,998**
Arg	***	ns	0,997**	0,994**
Gly	**	ns	0,998**	0,996**
Thr	***	*	0,989**	0,998**
Tau	***	ns	0,976**	0,943**
Ala	**	*	0,985**	0,994**
Tyr	**	ns	0,993**	0,998**
Gaba	***	ns	0,992**	0,995**
Trp	*	ns	0,980**	0,993**
Met	*	*	0,987**	0,999**
Phe	**	ns	0,995**	0,994**
Val	**	ns	0,991**	0,992**
Leu	***	ns	0,999**	0,992**
Ile	**	*	0,989**	0,992**
Orn	**	ns	0,948**	0,990**
Lys	***	ns	0,984**	0,942**
TOTAL	**	ns	0,997**	0,999**

ANOVA: ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, ns: no significación

Coefficiente de Pearson: ** correlación significativa 0,01 (unilateral), * correlación significativa 0,05 (unilateral).

Además, se ha demostrado que el *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus* poseen una mayor actividad proteolítica que *Lactococcus lactis*, debido a que tienen mayor número de peptidasas (Sasaki *et al.*, 1995; Rul y Monnet, 1997)

De la misma manera, Lemieux *et al.* (1989) observaron que cuando *Lactococcus* y *Lactobacillus* constituyen la flora dominante en el queso, los aminoácidos más abundantes fueron Leu, Val, Pro y Glu, hecho verificado por Franco *et al.* (2003) en queso de cabra Babia-Laciana.

Durante los primeros días de maduración se observa, al igual que otras variedades de queso (Poveda *et al.*, 2004; Pappa y Sotirakoglou, 2008) un incremento significativo ($p < 0,05$) de Leu, Phe y Val, debido a la degradación de la α_{s1} -CN, que contiene una gran cantidad de estos aminoácidos (Frau *et al.*, 1997). También se observa un importante incremento de la Arg durante la maduración, coincidiendo con otras variedades de queso (Marcos y Mora, 1982; Katsiari *et al.*, 2001) siendo a los 60 días uno de los AAL más abundantes del queso de Murcia al Vino. Polo *et al.* (1985) afirman que este aminoácido no debería incrementarse durante la maduración del queso para evitar la aparición de sabores amargos desagradables.

Por último, cabe destacar que la cantidad de Glu en el queso de Murcia al Vino es inferior a la detectada en otros quesos como Manchego (Poveda *et al.*, 2004), Teleme (Pappa y Sotirakoglou, 2008), Tulum (Hayaloglu *et al.*, 2007), debido, probablemente, a una menor liberación a partir de la proteólisis de las caseínas o una menor formación a partir de Gln, Val, Leu e Ile (Poveda *et al.*, 2003). Sin embargo, el GABA, procedente de la descarboxilación del Glu (Resmini *et al.*, 1969; Ismail y Hansen, 1972), presenta concentraciones más elevadas que en otros quesos, pudiendo ser otra de las razones que expliquen las bajas cantidades de Glu detectadas en el queso de Murcia al Vino.

La concentración de Glu en el queso parece estar muy influenciada por el tipo de microorganismos predominante en el mismo. Así, se ha observado que en quesos de cabra elaborados con un cultivo iniciador compuesto por *Lactobacillus casei* la concentración de Glu es mucho más baja que en los quesos elaborados con *Lactobacillus rhamnosus* o *Lactobacillus plantarum*. En otros quesos de cabra se ha observado que este AAL disminuye al final de la maduración (Pappa y Sotirakoglou, 2008). El ácido glutámico en su forma libre produce un sabor específico peculiar y muy agradable que se conoce con el nombre de "umami". Aunque no se establezca una relación directa entre el aroma y la concentración de todos los AAL, se ha relacionado a algunos AAL (como Glu, Met y Leu) con el desarrollo del aroma (Puchades *et al.*, 1989). Por tanto, las bajas concentraciones detectadas para este AAL en el queso de Murcia al Vino no son interesantes desde un punto de vista organoléptico, por lo que quizás sería necesario realizar alguna modificación en el cultivo iniciador.

El tipo de coagulante afectó de forma significativa ($p < 0,05$) al contenido de AAT del queso de Murcia al vino. Hasta el día 30 de maduración, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los quesos elaborados con coagulantes diferentes (**Figura 60**). No obstante, a partir de los 45 días de maduración, los valores de los AAT observados para los quesos elaborados con CV fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los elaborados con CA, alcanzando al final de la maduración valores de 952mg y 832mg AAT/100g de ES, respectivamente. Pino (2007) obtuvo resultados similares a los 60 días, en el queso de los Pedroches elaborado con leche de cabra, observando valores de 835 y 667 mg AAT/100g ES de queso elaborado con coagulante vegetal y animal, respectivamente. Este hecho puede estar provocado, como se ha dicho anteriormente, por la mayor actividad proteolítica que presentan las cinasas del *C. cardunculus* sobre las caseínas, en comparación con la actividad producida por las enzimas del cuajo animal, lo que proporcionaría un mayor sustrato disponible para las proteasas bacterianas.

De forma individual, la concentración de la mayoría de los AAL ha sido también superior en los quesos elaborados con CV, aunque en líneas generales no se establecieron diferencias significativas (**Tabla 59**). De esta forma, la concentración de His, Ser, Gln, Thr, Ala, Met, Ile aumentó más rápidamente en los quesos elaborados con CV, mostrando al final de la maduración valores significativamente ($p < 0,05$) superiores a los detectados para los elaborados con CA. No obstante, los quesos elaborados con CV presentaron valores muy similares e incluso algo inferiores en Asn, Gly, Phe y Val. Pino *et al.* (2009) obtuvieron unos valores similares a los nuestros, observando diferentes concentraciones de AAL entre quesos elaborados con CA y CV. Puesto que el cultivo iniciador utilizado es el mismo y el tipo de coagulante no afectó al desarrollo bacteriano (tal y como se comprueba en el apartado 4.1.3. de este trabajo), estas diferencias en las concentraciones de AAL pueden estar provocadas por la distinta especificidad de las enzimas de los coagulantes por las caseínas y los péptidos, de forma que las cinasas y la quimosina las hidrolizan en enlaces distintos (Sousa *et al.*, 2001). De esta manera, Macedo *et al.* (1996) observaron que las proteinasas de *C. cardunculus* son capaces de romper nueve enlaces de la α_{s1} -CN: Phe₂₃-Phe₂₄, Tyr₁₅₃-Tyr₁₅₄, Trp₁₆₄-Tyr₁₆₅, Tyr₁₆₅-Tyr₁₆₆, Tyr₁₆₆-Val₁₆₇, Phe₁₄₅-Tyr₁₄₆, Leu₁₄₉-Phe₁₅₀, Leu₁₅₆-Asp₁₅₇ y Ala₁₆₃-Trp₁₆₄ mientras que la quimosina tan sólo

puede romper el enlace Phe₂₃-Phe₂₄. De la misma manera, se ha observado que las cinasas rompen seis enlaces en la β -CN bovina Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃, Leu₁₉₁-Leu₁₉₂, Leu₁₆₅-Ser₁₆₆, Phe₁₉₀-Leu₁₉₁, Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ y Leu₁₂₇- Thr₁₂₈ (Macedo *et al.*, 1996), mientras que en las mismas condiciones experimentales se observó que la quimosina solo puede hidrolizar los enlaces Ala₁₈₉-Phe₁₉₀ y Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ (Carles y Ribadeau-Dumas, 1984). Este hecho puede provocar que en función del coagulante utilizado para la elaboración del queso los péptidos resultantes de la ruptura de las caseínas sean distintos, y por tanto, la concentración de AAL resultantes de su hidrólisis por enzimas bacterianas también sea diferente.

4.1.2.4.a) Análisis multivariante

Análisis Discriminante (AD)

- Aplicación con relación al factor tiempo de maduración

Con objeto de simplificar las funciones de clasificación se seleccionaron aquellos AAL que presentaron mayor valor F y, por tanto, mayor capacidad de diferenciar los grupos. Para ello se utilizó el método de inclusión por pasos, fijándose como número máximo de pasos 100 y una F de entrada y de salida igual a 1.

De esta forma, cuando se aplicó el AD y el método de inclusión por pasos en función del tiempo de maduración tan sólo fueron seleccionados 12 AAL (**Tabla 37**). Tras aplicar el AD a esos 12 AAL se observó que, los que presentaron mayor capacidad discriminante fueron la Thr y Arg con valores de F y de Lambda de Wilks de 4,37 y 4,07 y de 0,44 y 0,46, respectivamente.

Tabla 37. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	Arg	Lys	Val	Phe	Asn	His	Leu	Ala	Thr	Glu	Gln	Ser
Lambda de Wilks	0,46	0,58	0,57	0,67	0,60	0,74	0,59	0,60	0,44	0,60	0,63	0,75
Valor F	4,07	2,58	2,68	1,70	2,30	1,22	2,47	2,34	4,37	2,34	2,05	1,15

Al observar las distancias establecidas entre los diferentes periodos de maduración, vemos que las menores diferencias se establecieron entre los quesos con 30 y 45 días, mientras que las mayores, tal y como era de esperar lo hicieron entre los 2 y 60 días (**Tabla 38**).

Tabla 38. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis

	2	15	30	45	60
2	0,0	24,4	91,2	146,9	299,4
15	24,4	0,0	49,5	82,7	207,3
30	91,2	49,5	0,0	15,4	76,1
45	146,9	82,7	15,4	0,0	36,7
60	299,4	207,3	76,1	36,7	0,0

A partir de las funciones de clasificación se obtuvo la matriz de clasificación (**Tabla 39**) en la que aparecen todos los quesos correctamente clasificados a excepción de los correspondientes con el día 30 de la maduración que se clasificaron de manera correcta en un 83% de los casos, confundiéndose uno de ellos con el grupo de los 45 días.

Tabla 39. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	2	15	30	45	60
2	100	6	0	0	0	0
15	100	0	6	0	0	0
30	83	0	0	5	1	0
45	100	0	0	0	6	0
60	100	0	0	0	0	6
Total correcto	97	6	6	5	7	6

En la **Figura 62** y mediante las dos primeras funciones canónicas, se representa en un diagrama de dispersión los quesos con 2, 15, 30, 45 y 60 días de maduración.

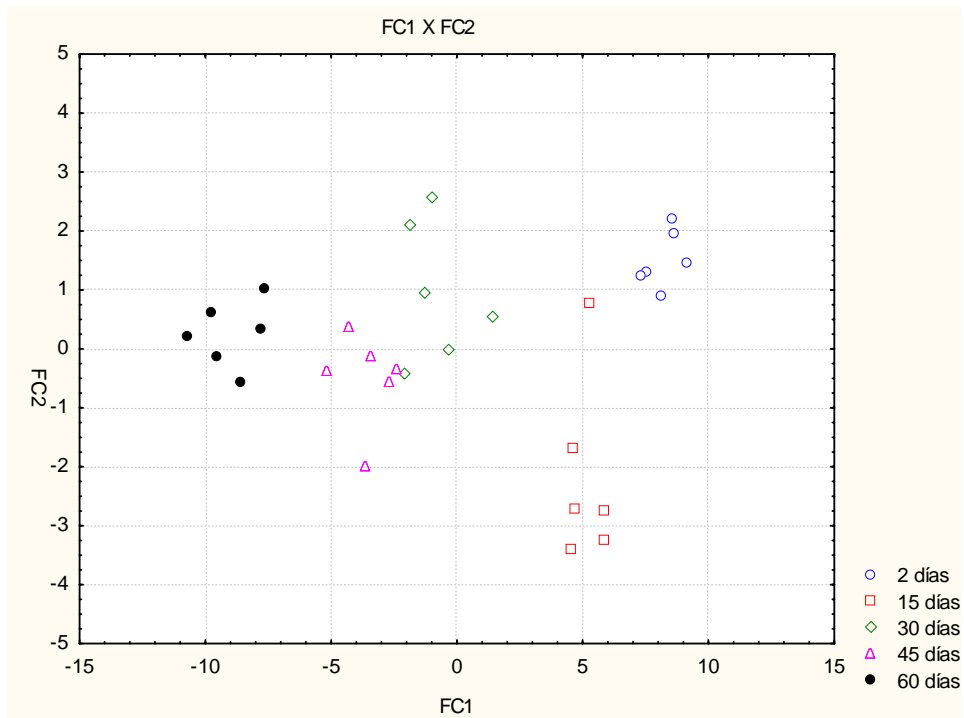


Figura 62. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2

- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante

Observamos en la **Tabla 40** los valores de Lambda de Wilks y valor F de los AAL determinados en relación al tipo de coagulante empleado, y que muestran a la Thr y la Gln como los AAL con mayor capacidad discriminante ya que presentan valores de 0,67 y 0,68 para la Lambda de Wilks y de 9,95 y 9,29 para el valor F, respectivamente. Por el contrario, es la Ile la que menos capacidad de discriminación posee, presentando valores próximos a la unidad (0,93).

Las distancias establecidas entre los quesos elaborados con CV y CA fueron de 7,26. En la **Tabla 41** se muestra la matriz de clasificación obtenida con las funciones de clasificación. En ella se puede observar que el contenido en AAL discriminó mejor a los quesos elaborados con CV, frente a aquellos con CA ya que, el 93% de los quesos elaborados con CV se clasificaron correctamente, mientras que con CA lo hicieron de manera correcta un 87%.

Tabla 40. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	Orn	Lys	Thr	Tau	Gln	Val	Trp	Met	Ile
Lambda de Wilks	0,82	0,80	0,67	0,87	0,68	0,86	0,81	0,86	0,93
Valor F	4,44	4,87	9,95	3,11	9,29	3,21	4,59	3,37	1,41

Tabla 41. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	CV	CA
CV	93	14	1
CA	87	2	13
Total correcto	90	16	14

Análisis de componentes principales

Se ha aplicado el ACP a los datos de AAL para establecer la relación entre las variables y detectar las principales causas de variabilidad. Se han extraído dos componentes principales que explican 96,6% del total de la varianza.

En la **Tabla 42** se muestra la relación de las variables con los 2 componentes extraídos.

El CP1 explica el 92,4% de la varianza total, y presenta una correlación positiva muy elevada con la mayoría de AAL, observándose los valores más elevados para Tyr (0,998), Leu (0,993) y los más bajos para Glu (0,87) y Tau (0,89). El CP2 explica tan sólo el 4,2% de la varianza total, estando poco correlacionado con los AAL. Se correlaciona positivamente con la His, Ser y Gln, que son AAL que presentan mayores concentraciones en quesos elaborados con CV; y negativamente con Asp, Gly y Asn, que son AAL que se modificaron muy poco por el tipo de coagulante e incluso presentaron valores algo mayores en los quesos elaborados con CA.

Tabla 42. Análisis de componentes principales del contenido de los aminoácidos de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y CV a lo largo de la maduración

Aa libres	CP1	CP2
Asp	0,97	-0,20
Asn	0,98	-0,17
Glu	0,87	0,12
His	0,90	0,40
Ser	0,96	0,25
Gln	0,98	0,17
Arg	0,99	-0,12
Gly	0,95	-0,30
Thr	0,95	0,31
Tau	0,89	-0,28
Ala	0,99	0,07
Tyr	1,00	-0,02
Gaba	0,98	-0,15
Trp	0,97	0,21
Met	0,97	0,22
Phe	0,98	-0,20
Val	0,97	-0,19
Leu	0,99	-0,11
Ile	0,99	0,00
Orn	0,94	0,18
Lys	0,94	-0,13

En la **Figura 63** se representa a los quesos en el plano definido por el CP1 y CP2. Se observa que el CP1 separa a los quesos en función de su tiempo de maduración. De esta manera, los quesos con 45 y 60 días de maduración, con mayores contenidos en AAL, se sitúan en el hemisferio positivo y los quesos con menor concentración (2 y 15 días) en el negativo, quedando los quesos con 30 días con valores intermedios en el centro. Por tanto, se puede afirmar que el CP1 está asociado al tiempo de maduración, explicando el 92,4 % de la varianza.

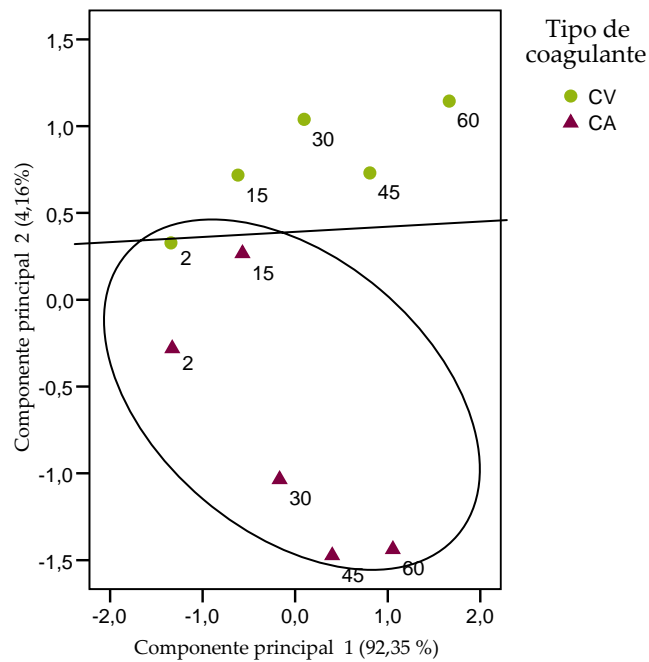


Figura 63. Representación en el plano definido por los 2 componentes principales extraídos con los valores del contenido de los aminoácidos de los quesos elaborados con CV y CA, a lo largo de la maduración

De igual forma, podemos observar que el CP2 nos diferencia claramente a los quesos elaborados con distinto coagulante, representando a la mayoría de los quesos elaborados con el CV en la parte positiva y a los elaborados con CA en la negativa. Por tanto, podemos afirmar que el CP2 está asociado a la variable tipo de coagulante y explica el 4,2% de la varianza.

4.1.3. Microbiología

4.1.3.1. Características microbiológicas de la leche utilizada en la fabricación del queso de Murcia al Vino

En la **Tabla 43**, se muestran los recuentos de microorganismos detectados en cada uno de los medios de cultivo utilizados, en las tres partidas de leche (cruda y pasteurizada) de cabra Murciano-Granadina utilizadas en la elaboración del Queso de Murcia al Vino. Los valores de los recuentos se expresan como log ufc/ml.

Tabla 43. Recuento bacterianos (log ufc/ml) en leche cruda y pasteurizada utilizada en la elaboración de los quesos de Murcia al Vino

	Leche cruda			Leche pasteurizada		
	1	2	3	1	2	3
PCA ¹	4,27	5,80	5,53	ND	2,48	ND
MSE ²	3,08	3,06	3,78	ND	ND	ND
KF ³	3,94	2,99	4,88	ND	ND	ND
RA ⁴	4,16	3,00	4,19	ND	ND	ND
M ₁₇ ⁵	5,06	>4,47	6,58	ND	2,08	ND
Petrifilm <i>Coliformes</i>	ND	>4,47	4,60	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Levaduras</i>	ND	3,36	3,08	ND	ND	ND

¹PCA: agar de recuento en placa, medio utilizado para aislamiento de microorganismos *aeróbios mesófilos totales* (RAMT)

²MSE: medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Leuconostoc*

³KF: KF-Streptokokken-agar, medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Streptococcus*

⁴RA: agar rogosa, medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Lactobacillus*

⁵M₁₇: agar M₁₇, medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Lactococcus*

ND: no detectado crecimiento o no superado el límite inferior de contaje

Se observa que la leche de partida cruda mostró recuentos en agar PCA, de alrededor de 5 log ufc/ml. Este valor se encuentra por debajo de las 15x10⁵ ufc/ml, límite máximo permitido según el Reglamento CE 853/2004 de 29 de Abril (Unión Europea, 2004), para leche destinada a la elaboración de queso, con tratamiento térmico. Por tanto, la leche de cabra utilizada en la elaboración de los quesos presenta una excelente calidad higiénica, gracias a las buenas prácticas de higiene

aplicadas en el manejo del ganado caprino, en el proceso de ordeño, y durante la manipulación posterior de la leche.

Tras la pasteurización, no se detectó la presencia de coliformes ni levaduras y salvo en la segunda partida, no se detectó tampoco la presencia de flora microbiana habitual de la leche.

4.1.3.2. Características microbiológicas del queso de Murcia al Vino durante la maduración

En la **Tabla 44** se muestra la evolución de los recuentos de microorganismos obtenidos en cada uno de los medios de cultivo utilizados a lo largo de la maduración. Se presentan valores medios y las desviaciones estándar (expresados como log ufc/g de queso), de las muestras de queso de Murcia al Vino, elaborados con CA y CV.

Se puede apreciar que, en los medios MSE y Petrifilm para Coliformes y Petrifilm para Levaduras (que son medios presuntivos para aislamiento de *Leuconostoc*, *Coliformes* y *Levaduras*, respectivamente), o bien no se ha detectado crecimiento, o este no ha superado los límites inferiores de contaje.

Por el contrario, sí se han encontrado recuentos en los medios de cultivo PCA, M₁₇, KF y RA, que son los medios presuntivos utilizados para el aislamiento de *aerobios mesófilos totales* (RAMT), *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*, respectivamente. La mayor parte de estos microorganismos se corresponden con los añadidos a la leche pasteurizada como cultivos iniciadores, (*Lactococcus lactis* subs. *lactis*, subs. *cremoris* y *Streptococcus salivarius* subs. *Thermophilus*), mientras que los *Lactobacillus* aparecen, probablemente, por contaminación durante el proceso de elaboración.

A continuación, se analizan con más detalle, los recuentos de los principales grupos microbianos aislados en cada uno de los medios de cultivo utilizados.

Tabla 44. Recuento de bacterias (ufc/g queso), en los distintos medios de cultivo, presentes en el queso de Murcia al vino, elaborado con CA y CV, a lo largo de su maduración

	Días de maduración				
	2	15	30	45	60
CA					
PCA ¹	8,14±0,42 ^a	8,22±0,66 ^a	8,79±0,52 ^a	8,10±0,43 ^a	8,19±0,53 ^a
M ₁₇ ⁵	8,26±0,68 ^a	8,94±0,35 ^a	8,86±0,21 ^a	8,85±0,65 ^a	8,96±0,22 ^a
KF ³	7,26±0,46 ^a	8,04±0,57 ^a	7,53±0,26 ^a	6,64±0,60 ^a	6,96±0,39 ^a
RA ⁴	8,03±0,33 ^{abc}	7,65±0,91 ^{abc}	6,53±1,44 ^a	8,46±0,82 ^{bc}	9,49±0,86 ^c
MSE ²	ND	ND	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Coliformes</i>	ND	ND	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Levaduras</i>	ND	ND	ND	ND	ND
CV					
PCA ¹	8,50±0,10 ^a	8,84±0,81 ^a	8,76±0,64 ^a	8,49±0,93 ^a	7,97±0,67 ^a
M ₁₇ ⁵	8,09±1,40 ^a	8,75±0,52 ^a	8,44±0,16 ^a	8,34±0,27 ^a	8,03±0,13 ^a
KF ³	7,74±0,26 ^a	7,68±0,87 ^a	7,79±0,99 ^a	7,32±0,96 ^a	6,68±0,22 ^a
RA ⁴	8,19±0,37 ^{abc}	7,17±0,19 ^{ab}	7,03±1,44 ^{ab}	8,16±1,19 ^{abc}	8,29±2,04 ^{abc}
MSE ²	ND	ND	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Coliformes</i>	ND	ND	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Levaduras</i>	ND	ND	ND	ND	ND

^{a-c} Resultados del Test de Fisher (LSD). Medias del mismo parámetro en la misma fila sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

¹ PCA: medio utilizado para aislamiento de microorganismos aeróbios mesófilos totales (RAMT)

² MSE: medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Leuconostoc*

³ KF: medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Streptococcus*

⁴ RA: agar rogosa, medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Lactobacillus*

⁵ M₁₇: medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Lactococcus*

ND: no detectado crecimiento o no superado el límite inferior de contaje

4.1.3.2.a) Recuentos en medio de cultivo PCA.

El PCA es el medio de cultivo utilizado para el aislamiento de microorganismos aeróbios mesófilos totales (RAMT).

En la **Figura 64** se muestran los valores medios y desviaciones estándar, expresados como log ufc/g, de RAMT en quesos elaborados con CA y CV a lo largo de la maduración. De igual forma, se muestran los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas realizadas mediante el test LSD.

Los recuentos de RAMT experimentan a lo largo de todo el periodo estudiado una evolución irregular. Se observa un aumento no significativo ($p>0,05$) en el recuento a los 30 días de la maduración, donde alcanzaron los niveles máximos de todo el periodo de estudio; para luego descender, hasta el día 45, y volver a incrementarse hasta el final de la maduración. No obstante, a pesar de esta evolución, el tiempo de maduración no afectó significativamente ($p>0,05$) a los recuentos de RAMT, observando a los 2 y 60 días valores de 8,14 y 8,19 log ufc/g queso, respectivamente.

Se observa una cantidad elevada de recuentos de RAMT en los quesos de 2 días de maduración, lo que se corresponde con la efectiva implantación de la flora láctica con interés tecnológico para la elaboración del queso. Este aumento se debe a la multiplicación bacteriana de los microorganismos del cultivo iniciador y a la retención de los mismos después del drenaje del suero, ya que estos grupos bacterianos aumentan sus recuentos, alcanzando en el queso de 2 días valores de 8,14 log ufc/g.

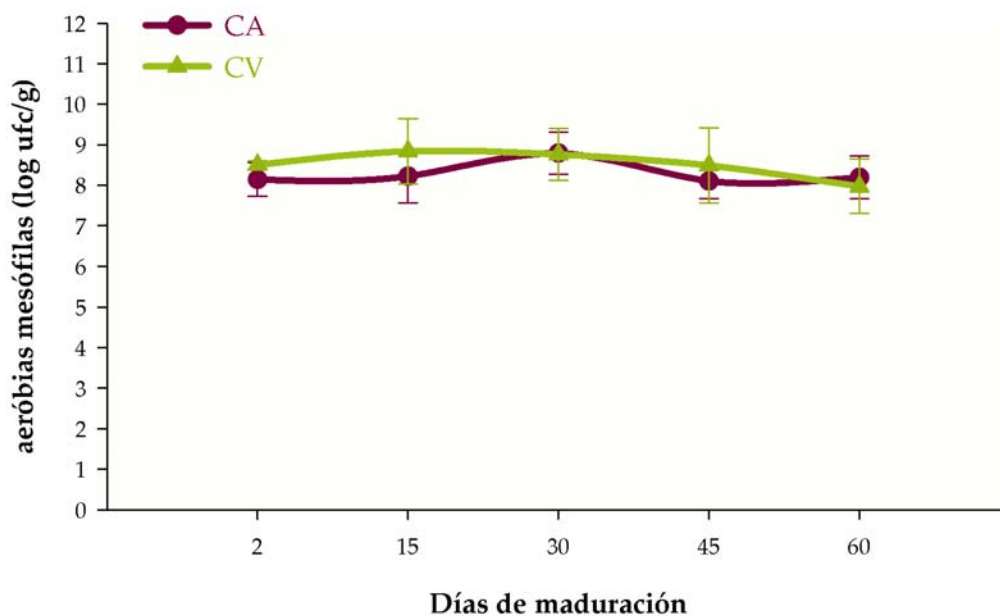


Figura 64. Evolución de los recuentos de RAMT en PCA, a lo largo de la maduración

El aumento de los recuentos hasta el día 30 de la maduración, se corresponde con la máxima proliferación de las RAMT. Esta evolución se acompaña de un brusco descenso del pH debido al ácido láctico que producen las bacterias del cultivo iniciador, que aparecen como la flora dominante, tanto en leche pasteurizada como en quesos de 2 días. De hecho, se establece una correlación negativa ($p > 0,05$) entre el crecimiento de estas RAMT y los valores de pH y una positiva ($p < 0,05$) entre la evolución de las RAMT y los valores de AT. Evoluciones similares se han encontrado en otros quesos de cabra como el queso Gredos (Medina *et al.*, 1992), Cendrat del Montsec (Mor-Mur *et al.*, 1994), Armada (Tornadijo *et al.*, 1995), Tenerife (Zárate *et al.*, 1997), Zamorano (Ferrazza *et al.*, 2004), Majorero (Calvo *et al.*, 2007) o Robiola di Roccaverano (Bonetta *et al.*, 2008), entre otros.

Los recuentos de los 60 días en el queso de Murcia al vino (de 8,19 log ufc/g), son semejantes a los encontrados en la bibliografía para otras variedades de queso como el Majorero (con recuentos de 8,30 log ufc/g, Calvo *et al.*, 2007), en queso Manchego artesano (8,30 log ufc/g, Cabezas *et al.*, 2007), o el Zamorano (con 8,55 log ufc/g a los 2 meses de maduración, Ferrazza *et al.*, 2004).

En cuanto al tipo de coagulante ensayado, este no influyó significativamente ($p > 0,05$) en los recuentos medios de RAMT, al igual que ocurre en otros quesos elaborados con dos tipos de coagulantes. Así, Pino (2007) en queso de Los Pedroches elaborado con leche de cabra, y Tejada (2001); Prados *et al.* (2007), o Galán (2008) en leche de oveja, tampoco encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los recuentos de RAMT de quesos elaborados con cuajo animal y coagulante vegetal liofilizado.

Sin embargo, diversos autores comprobaron que en el caso de utilizar coagulante vegetal fresco, los recuentos para RAMT en estos quesos fueron superiores, por la mayor presencia de bacterias viables en el coagulante vegetal fresco (Sousa y Malcata, 1997a; Tejada, 2001). Este comportamiento no se detecta en quesos elaborados con CV liofilizado.

4.1.3.2.b) Recuentos en medios de cultivo M17.

El M₁₇ es el medio de cultivo presuntivo utilizado para el aislamiento y recuento del género *Lactococcus*.

En la **Tabla 44** y **Figura 65** se presentan los recuentos de *Lactococcus*, expresados como log ufc/g, para quesos elaborados con CA y CV durante la maduración.

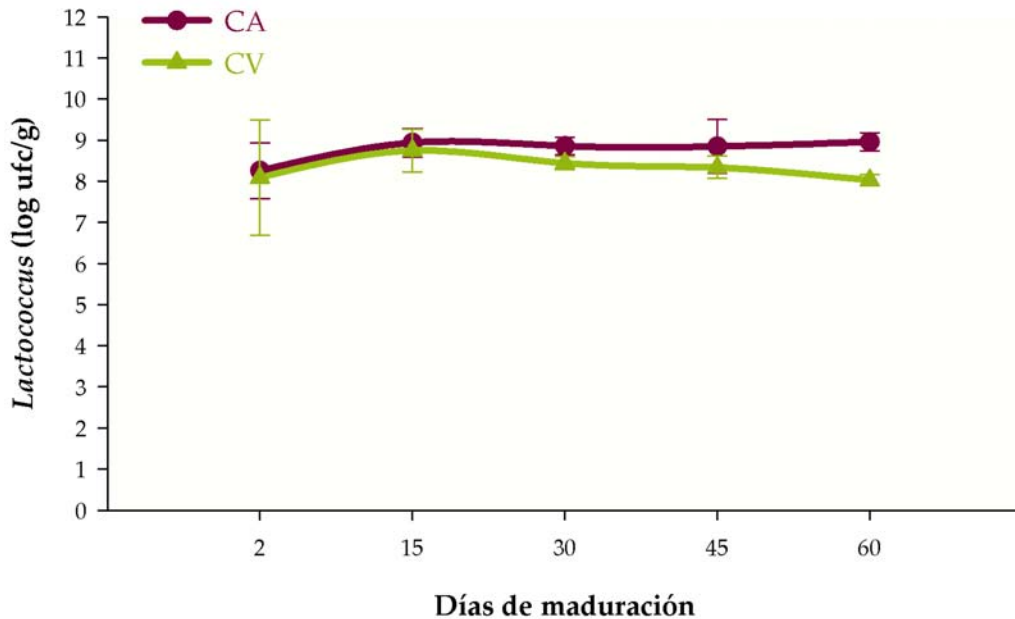


Figura 65. Evolución de los recuentos de *Lactococcus* en *M17*, a lo largo de la maduración

Al igual que ocurría con las RAMT, tras la implantación del cultivo iniciador los recuentos de *Lactococcus* del queso de Murcia al Vino van a experimentar un aumento, no significativo ($p > 0,05$), durante los 15 primeros días de la maduración, manteniéndose mas o menos constantes hasta el final de dicho periodo. Este aumento al principio de la maduración, provoca una gran actividad metabólica, degradando la lactosa e incrementando su número rápidamente (Williams *et al.*, 2000); siendo los responsables de los cambios bioquímicos en los primeros estadios madurativos del queso, así como de la bajada brusca que experimenta el pH hasta el día 30 de la maduración. A pesar de esto, el tiempo de maduración no afectó de manera significativa ($p > 0,05$) a dicho recuento.

Al ser este grupo microbiano el primero en desarrollarse en el queso, van a ser los responsables de los procesos proteolíticos que tienen lugar durante las

primeras fases de la maduración. En este sentido, Ballesteros *et al.* (2006) y García-Ruiz *et al.* (1998) observaron que *Lactococcus* presentaba una alta actividad proteolítica.

Ferrazza *et al.* (2004), detectaron una alta correlación negativa entre los recuentos de *Lactococcus* y la acidez de los quesos. La mayor sensibilidad al ácido que presentan *Lactococcus* hace que, la bajada del pH del queso sea un factor limitante en su crecimiento, haciéndolos menos competitivos frente a otras bacterias lácticas como los *Lactobacillus*. Por esta razón, la población de *Lactococcus* se irá reemplazando gradualmente por la de *Lactobacillus* a medida que transcurre la maduración, constituyendo la flora dominante del queso en las etapas posteriores de la misma.

En los quesos de Murcia al vino, no se evidencia el descenso en los recuentos de *Lactococcus* a lo largo de la maduración dado que los 60 días es todavía una etapa madurativa temprana. El descenso se hace más patente en aquellas variedades de queso que se comercializan con mayores tiempos de maduración como el Zamorano (Ferrazza *et al.*, 2004), el queso Majorero (Calvo *et al.*, 2007), o el queso Serra (Macedo *et al.*, 2004).

En general, existen muchas diferencias en los recuentos de los *Lactococcus* en las distintas variedades de queso debido a las variaciones que existen en su elaboración. Estos recuentos van a depender de factores como: que la leche utilizada en la fabricación de queso sea cruda o pasteurizada, que el queso se elabore con o sin cultivo iniciador o, de la composición de dicho cultivo. Comparando los valores de *Lactococcus*, con otras variedades de quesos, observamos que estos son semejantes a los 8,5 log ufc/g encontrados en queso Zamorano a los 60 días (Ferrazza *et al.*, 2004), los 8,50 ufc/g detectados en el queso Feta (Manolopoulou *et al.*, 2003), los 8,2 ufc/g en queso Majorero (Calvo *et al.*, 2007) o los 8,78 ufc/g encontrados en el queso Serra a los 63 días de maduración (Macedo *et al.*, 2004).

Tal y como se puede comprobar, el tipo de coagulante no afectó significativamente ($p > 0,05$) al recuento de *Lactococcus* del queso de Murcia al Vino. A pesar que los recuentos de los quesos elaborados con CV, tras experimentar el aumento significativo en los 15 primeros días, disminuyan hasta el final de la maduración, no se detectan diferencias significativas ($p > 0,05$), entre

quesos elaborados con los dos tipos de coagulantes. Este hecho coincide con los resultados encontrados por Tejada y Fernández-Salguero (2003) y Prados (2005). Tejada (2001); Prados *et al.* (2007) y Galán (2008) si encuentran diferencias significativas cuando los quesos se elaboran con CV fresco, con respecto a los elaborados con CA.

4.1.3.2.c) Recuentos en medio de cultivo KF.

El KF es el medio utilizado para el aislamiento presuntivo de *Streptococcus*.

En la **Tabla 44** y **Figura 66** se presenta la evolución de los recuentos de *Streptococcus*, expresados como log ufc/g de quesos elaborados con CA y CV, durante la maduración.

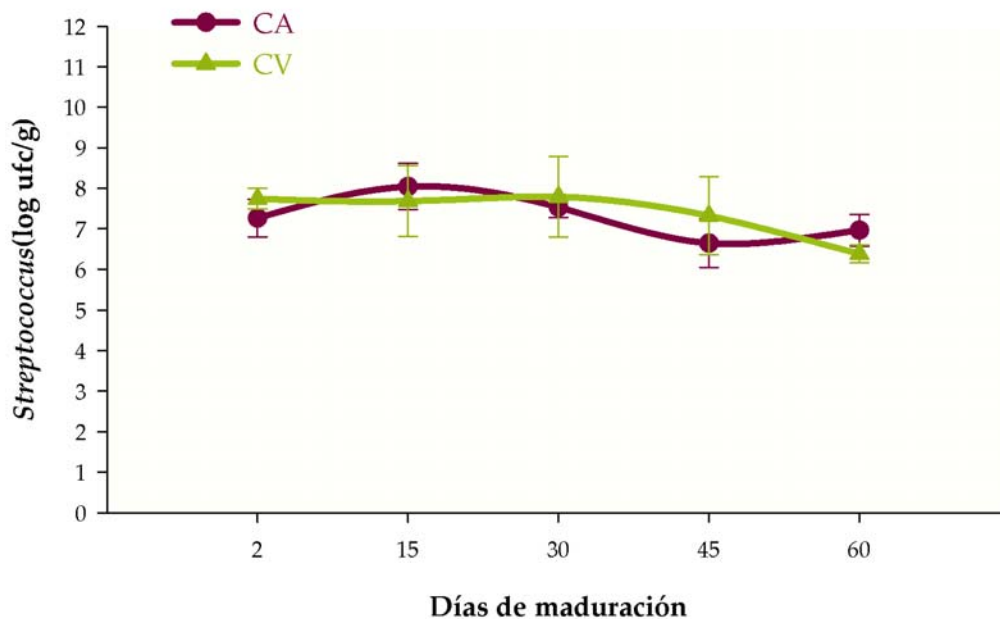


Figura 66. Evolución de los recuentos de *Streptococcus* en KF, a lo largo de la maduración

Se puede apreciar que el tiempo de maduración no afectó de manera significativa ($p > 0,05$) al recuento de este grupo bacteriano de los quesos. Este recuento muestra una evolución semejante a la que experimentan los recuentos en el medio de cultivo M₁₇, aunque con valores inferiores.

Los recuentos en KF, no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los quesos elaborados con CA y CV.

4.1.3.2.d) Recuentos en medio de cultivo RA

El agar Rogosa es uno de los medio utilizados para el aislamiento de *Lactobacillus*.

En la **Tabla 44** y **Figura 67** se presentan la evolución de los recuentos de *Lactobacillus* a lo largo de la maduración de quesos de Murcia al Vino elaborados con CA y con CV.

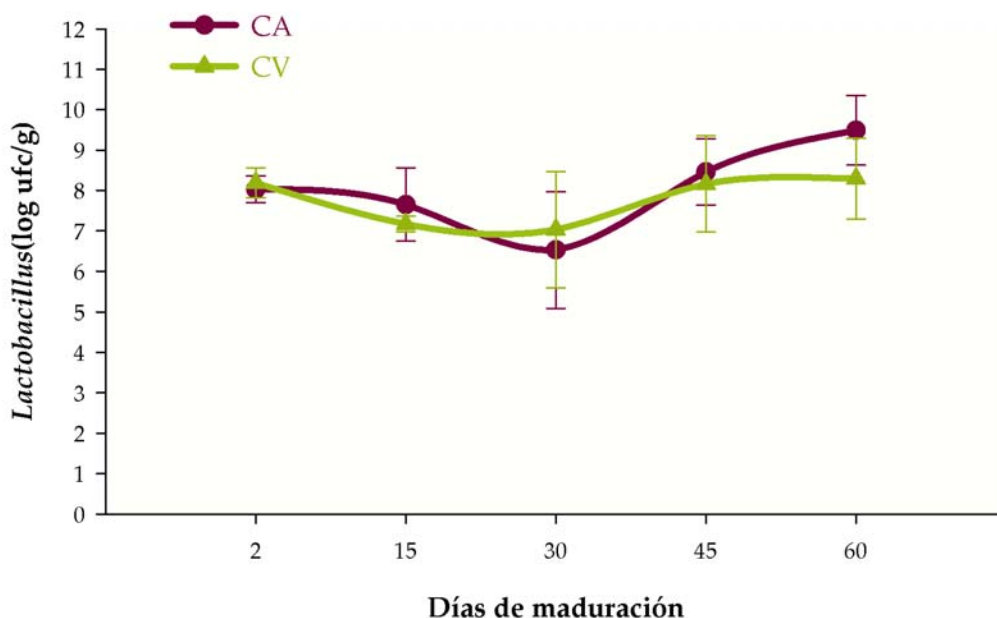


Figura 67. Evolución de los recuentos de *Lactobacillus*, en RA, a lo largo de la maduración

Se puede apreciar que, el tiempo de maduración afectó de manera significativa ($p < 0,05$) a los recuentos de este grupo bacteriano en el queso.

Los *Lactobacillus* son bacterias lácticas que no se emplean habitualmente como cultivos iniciadores (Demarigny *et al.*, 1996; Williams y Banks, 1997). Al ser inactivadas con la pasteurización, su presencia en el queso desde etapas

tempranas de la maduración, se atribuye a una contaminación posterior al tratamiento térmico, con cepas que existan en los equipos de elaboración de queso (Fitzsimons *et al.*, 1999; Ferrazza *et al.*, 2003), o/y en el ambiente de la quesería.

Ya en el día 2 de maduración, se observan valores muy elevados para el recuento de *Lactobacillus*. Quizás por este motivo se detecta un descenso significativo ($p < 0,05$) a los 30 días de maduración, con valores que disminuyen desde los 8,03 log ufc/g detectados a los 2 días, hasta los 6,53 log ufc/g, a los 30 días de maduración. Finalmente los *Lactobacillus* aumentan de manera significativa ($p < 0,05$) alcanzando al final de la maduración recuentos de 9,49 log ufc/g.

El descenso significativo en las dos primeras semanas de maduración se produce al mismo tiempo que, aumenta el de *Lactococcus*. Los *Lactobacillus* tienen menor ritmo metabólico al tener requerimientos nutricionales de aminoácidos y vitaminas mayores que *Lactococcus*. Este hecho limita su capacidad de biosíntesis, y por tanto, su crecimiento inicial es más lento (Morishita *et al.*, 1981; Ferrazza *et al.*, 2004).

Sin embargo, al ser los *Lactobacillus* más tolerantes a las condiciones ácidas, el descenso de pH del queso (con valores de 5,03 a los 30 días), tiene un efecto selectivo sobre la flora, favoreciendo a este grupo bacteriano en detrimento de los *Lactococcus*, menos tolerantes al ácido que ellos.

A partir del día 30, los recuentos de *Lactobacillus* irán aumentando hasta alcanzar su máximo al final del periodo de estudio, donde es el grupo dominante. En otras variedades de queso (queso Cameros (Olarde *et al.*, 2000), queso Zamorano (Ferrazza *et al.*, 2004) o queso de cabra elaborado con leche pasteurizada (Guizani *et al.*, (2006) entre otros), también aparece *Lactobacillus* como grupo bacteriano dominante al final de la maduración.

Crow *et al.* (2001) apuntaron, que las bacterias lácticas no pertenecientes al cultivo iniciador pueden actuar como coadyuvantes de los fermentos lácticos en la mejora del flavor de los quesos durante el proceso de maduración. Esto es debido a que, el gran crecimiento de *Lactobacillus* puede contribuir a incrementar la cantidad de proteasas y peptidasas intra y extracelulares capaces de hidrolizar polipéptidos y péptidos de mediano y pequeño peso molecular a aminoácidos. En este sentido, en nuestro estudio se ha correlacionado positivamente los recuentos

de *Lactobacillus* con los contenidos de NNP, NAA y Np a los 60 días de maduración; así como, con las mayores puntuaciones obtenidas en los quesos para la intensidad de olor.

El tipo de coagulante no afectó significativamente ($p>0,05$) a los recuentos de *Lactobacillus* del queso de Murcia al Vino, aumentando ambas de manera significativa ($p<0,05$) a lo largo de la maduración.

Sánchez (1999), Gómez *et al.* (2001) o Tejada (2001) en queso de oveja tampoco detectaron diferencias significativas entre los recuentos de *Lactobacillus* obtenidos en quesos elaborados con CV liofilizado y CA, coincidiendo con los resultados obtenidos por Freitas y Malcata (1996) en queso Picante. No obstante, Sousa y Malcata (1997b) en queso Serra, obtuvieron al final de la maduración recuentos de *Lactobacillus* más elevados en quesos elaborados con coagulante vegetal fresco que en los fabricados con cuajo, aunque a los 28 días de maduración observaron exactamente el fenómeno contrario.

4.1.4. Análisis Sensorial

En la **Tabla 45** se recogen los descriptores utilizados en el presente estudio agrupados según el tipo de percepción sensorial, siguiendo la norma UNE 87-001-94.

Tabla 45. Atributos utilizados en el análisis sensorial de las muestras de quesos

A) APARIENCIA INTERNA	Son todos los atributos visibles de una sustancia u objeto.
A.1. Color	Es la sensación resultante de estimular la retina por las ondas luminosas comprendidas en la región del visible. Color característico del queso de cabra.
A.2. Número ojos	Numero de ojos que se aprecia sobre la superficie de corte del queso.
A.3. Tamaño ojos	Apreciación del tamaño de los ojos en la superficie de corte del queso.
A.4. Distribución ojos	Distribución de los ojos sobre la superficie de corte del queso.
B) OLOR	Propiedad organoléptica perceptible por el órgano olfativo cuando inspira determinadas sustancias volátiles.
B.1. Intensidad	Magnitud de la sensación percibida (magnitud del olor percibido).
B.2. Acido	Olor característico del ácido láctico. Asociado con el olor del yogurt.
B.3. Vino	Olor característico de la variedad de vino tinto doble pasta de la Región de Murcia
C) TEXTURA	Es el conjunto de propiedades mecánicas, geométricas y de composición de un producto perceptibles por los mecano-receptores, los receptores táctiles y en ciertos casos, los visuales y auditivos. Las propiedades de textura del queso se manifiestan cuando sufre una deformación, es decir, debe de ser manipulado antes (con los dientes, con los dedos, con la lengua, con un cuchillo...).
C.1. Dureza	Es la propiedad mecánica de la textura relativa a la fuerza requerida para deformar el queso o para hacer penetrar un objeto (cuchara, cuchillo) en él.
C.2. Granulosidad	Es la propiedad geométrica de la textura relativa a la percepción de las dimensiones y de la forma de las partículas del producto.
C.3. Cremosidad	Es un atributo específico para los quesos. Solubilidad en la boca.
D) SABOR	Sensaciones percibidas por el órgano del gusto cuando es estimulado por ciertas sustancias solubles.
D.1. Intensidad	Magnitud de la sensación percibida (magnitud del sabor percibido).

D.2. Vino	Sabor característico de la variedad de vino tinto doble pasta de la Región de Murcia.
D.3. Acido	Describe el sabor elemental que se percibe en la lengua producido por disoluciones acuosas diluidas de la mayoría de los ácidos.
D.4. Salado	Sabor elemental producido por disoluciones acuosas de varias sustancias, como cloruro sódico.
D.5. Amargo	Sabor elemental producido por disoluciones acuosas diluidas de diversas sustancias tales como la quinina, algunos otros alcaloides y la cafeína.

La **Tabla 46** muestra las medias y las desviaciones standard de las puntuaciones obtenidas para los parámetros sensoriales analizados a los 30, 45 y 60 días de maduración en el queso de Murcia al Vino, elaboradas con cuajo animal (CA) y coagulante vegetal (CV). De igual forma, se muestran los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas obtenidas mediante el test LSD.

En las **Figuras 68** y **69** se representan los perfiles sensoriales de los quesos elaborados con CA y CV, respectivamente, durante su maduración. Estos perfiles sensoriales van a reflejar en sendos diagramas de araña, los valores de las puntuaciones medias otorgadas por los panelistas para los atributos sensoriales de los quesos. Cada uno de los atributos analizados se va a representar en un radio del gráfico, donde el centro de la figura se corresponderá con la intensidad cero del valor, y esta se irá incrementando conforme nos alejamos hacia el extremo opuesto.

Tabla 46. Características sensoriales del queso de Murcia al Vino elaborado con CV y CA durante su maduración. Medias y desviaciones estándar

Atributos	Días de maduración					
	30 días		45 días		60 días	
	CV	CA	CV	CA	CV	CA
Intensidad olor	4,5 ± 0,8 ^a	4,6 ± 0,8 ^{ab}	4,6 ± 1,0 ^a	5,1 ± 0,6 ^{bc}	5,4 ± 0,9 ^{cd}	5,6 ± 0,4 ^d
Olor ácido	3,6 ± 1,4 ^a	3,6 ± 1,3 ^a	4,2 ± 0,9 ^a	4,3 ± 0,6 ^a	4,2 ± 0,5 ^a	4,2 ± 1,8 ^a
Olor a vino	3,0 ± 0,5 ^a	2,7 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,8 ^a	2,9 ± 1,0 ^a	3,6 ± 1,2 ^a	3,1 ± 1,2 ^a
Color	3,5±0,3 ^b	2,3 ± 0,6 ^a	3,8 ± 0,5 ^{bc}	2,5 ± 0,2 ^a	4,5 ± 0,8 ^c	3,1 ± 0,7 ^b
Nº ojos	3,1 ± 0,5 ^a	2,4 ± 0,6 ^a	2,9 ± 1,4 ^a	2,4 ± 1,2 ^a	3,0 ± 1,8 ^a	2,2 ± 0,7 ^a
Tamaño ojos	2,7 ± 0,2 ^c	2,8 ± 0,3 ^c	2,5 ± 0,6 ^c	2,1 ± 0,3 ^b	2,1 ± 0,8 ^b	1,7 ± 0,5 ^a
Distribución ojos	2,3 ± 1,1 ^a	2,1 ± 0,6 ^a	2,7 ± 0,4 ^a	2,3 ± 1,2 ^a	1,7 ± 0,8 ^a	1,8 ± 0,6 ^a
Dureza	1,6 ± ,4 ^a	3,2 ± 0,5 ^b	2,4 ± 1,3 ^a	4,4 ± 1,0 ^{bc}	3,1 ± 0,6 ^{ab}	5,1 ± 1,7 ^c
Granulosidad	1,6 ± 0,4 ^a	3,8 ± 0,8 ^{cd}	2,0 ± 1,3 ^{ab}	3,6 ± 1,1 ^{bcd}	2,1 ± 0,4 ^{abc}	4,5 ± 1,3 ^d
Cremosidad	7,9 ± 0,1 ^c	5,9 ± 0,3 ^{ab}	7,6 ± 0,6 ^c	4,9 ± 0,9 ^a	7,1 ± 0,9 ^{bc}	5,2 ± 1,2 ^a
Intensidad sabor	5,9 ± 0,2 ^a	5,4 ± 0,0 ^a	6,4 ± 0,2 ^{ab}	5,9 ± 0,1 ^a	7,2 ± 0,7 ^b	6,0 ± 0,9 ^a
Sabor vino	2,8 ± 0,4 ^a	2,3 ± 0,4 ^a	3,0 ± 0,9 ^a	3,3 ± 0,3 ^a	3,3 ± 1,7 ^a	3,2 ± 1,5 ^a
Sabor ácido	4,1 ± 0,9 ^a	4,3 ± 0,0 ^a	5,0 ± 0,8 ^a	5,0 ± 0,7 ^a	4,4 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,3 ^a
Sabor salado	4,0 ± 0,0 ^a	4,0 ± 0,4 ^a	4,6 ± 0,8 ^{ab}	4,7 ± 0,4 ^{ab}	5,2 ± 0,7 ^b	5,0 ± 0,8 ^{ab}
Sabor amargo	4,0 ± 1,0 ^{ab}	3,9 ± 0,1 ^{ab}	4,3 ± 0,8 ^{ab}	3,7 ± 0,4 ^a	4,8 ± 0,8 ^b	3,4 ± 0,8 ^a

Valores medios de 12 catadores.

Resultados comparación múltiple de medias (prueba LSD). ^{a-d} Valores medios del mismo parámetro sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

CV: quesos elaborados con coagulante vegetal, CA: quesos elaborados con cuajo animal.

Por otra parte, en la **Figura 70, 71 y 72** se muestran de forma comparativa los perfiles sensoriales de los quesos elaborados con CA y CV a los 30, 45 y 60 días de maduración, respectivamente.

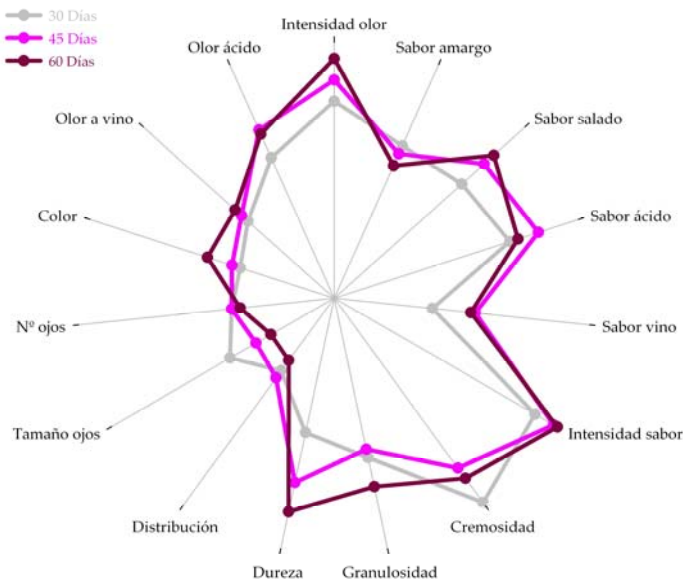


Figura 68. Perfil sensorial de los quesos de Murcia al Vino elaborado con CA a los 30, 45 y 60 días de maduración

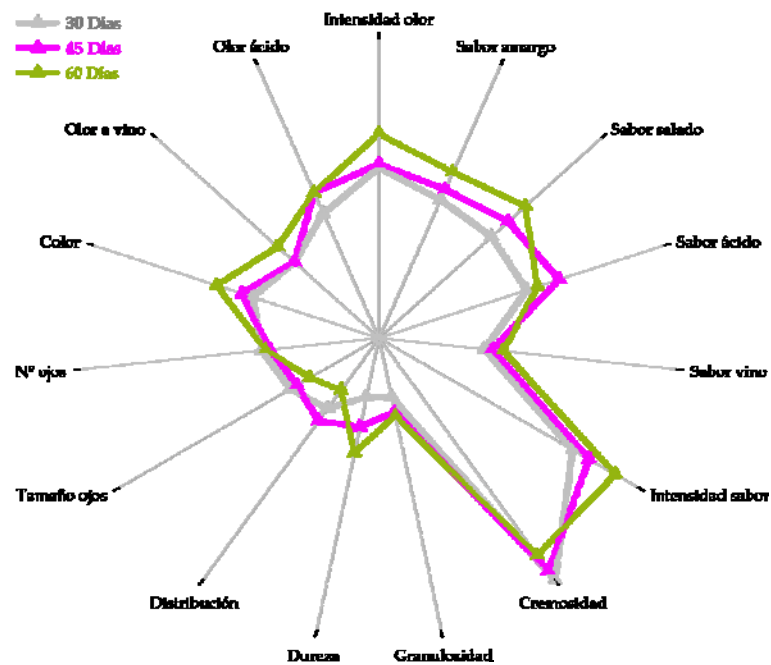


Figura 69. Perfil sensorial de los quesos de Murcia al Vino elaborado con CV a los 30, 45 y 60 días de maduración

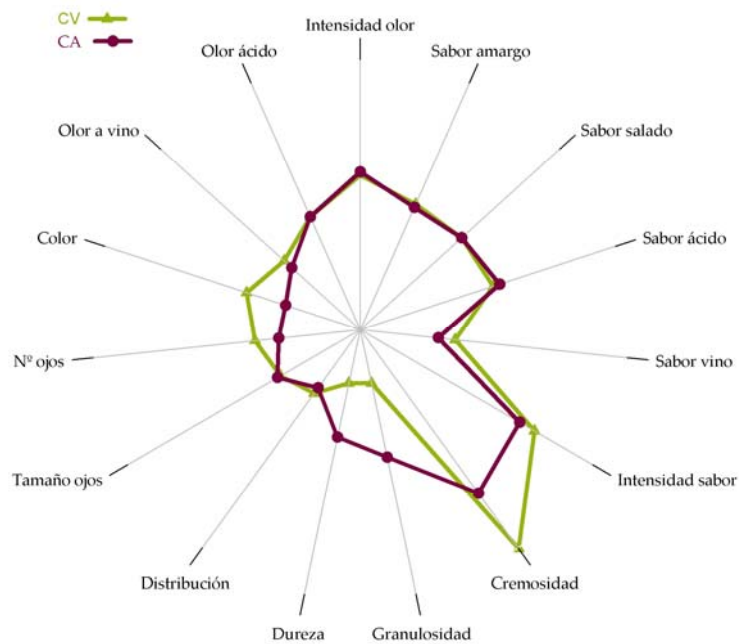


Figura 70. Perfil sensorial de los quesos elaborados con CA y CV a los 30 días de maduración

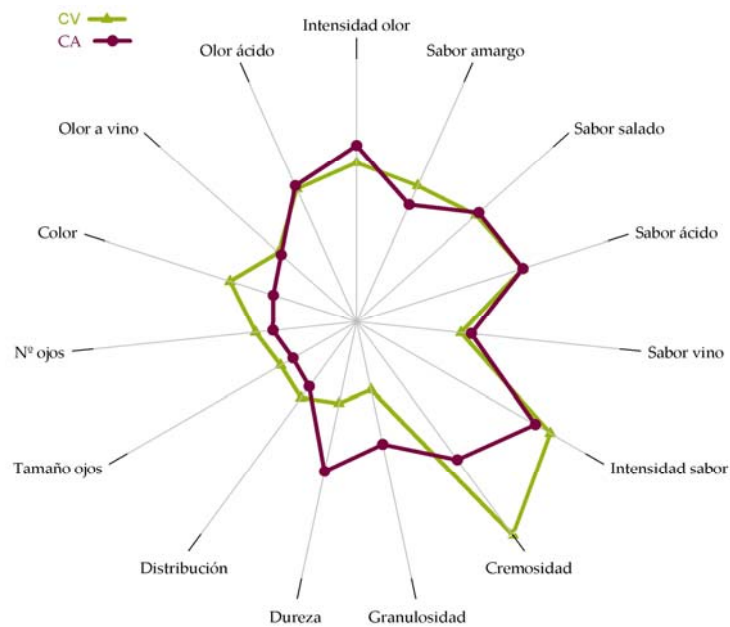


Figura 71. Perfil sensorial de los quesos elaborados con CA y CV a los 45 días de maduración

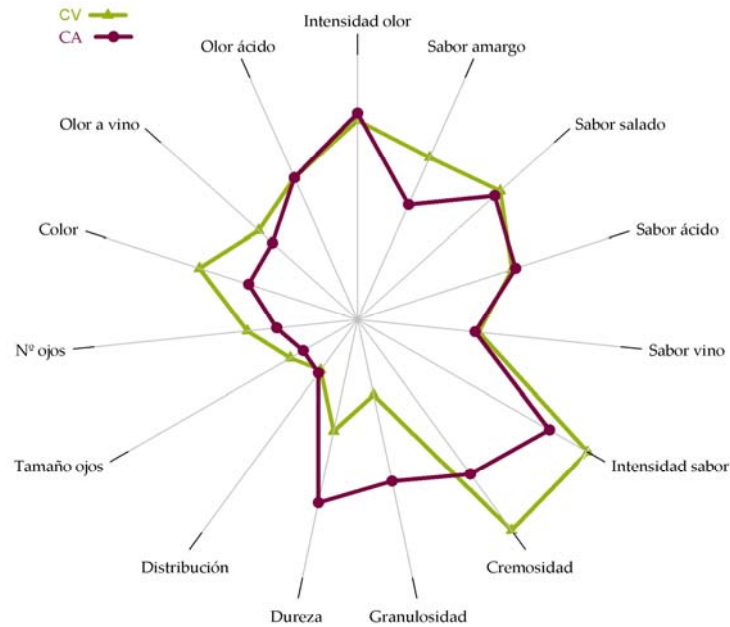


Figura 72. Perfil sensorial de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración

Tal y como se puede observar, las características sensoriales de los quesos se van modificando a medida que se incrementa el tiempo de maduración de los mismos. De igual manera, se evidencian las diferencias entre los quesos elaborados con CA y CV, sobre todo en los atributos referentes a la apariencia interna de los quesos y a la textura, a lo largo de toda la maduración; así como también para el sabor amargo a los 60 días.

A continuación vamos a analizar y discutir los resultados obtenidos para cada parámetro, agrupados según el tipo de percepción sensorial: olfativas, visuales, de textura y gustativas.

4.1.4.1. Percepciones olfativas

En la **Tabla 46** y **Figura 73** se puede observar la evolución de los valores para los atributos olfativos durante el periodo de estudio. A pesar de que todos ellos aumentan a medida que lo hace el tiempo de maduración, tan sólo se

establecen diferencias significativas ($p < 0,001$) en la intensidad de olor total. En la comparación múltiple de medias se observa un incremento significativo ($p < 0,05$) de este atributo durante la maduración, con valores a los 30 y 60 días de 4,6 y 5,6, respectivamente en quesos elaborados con CA.

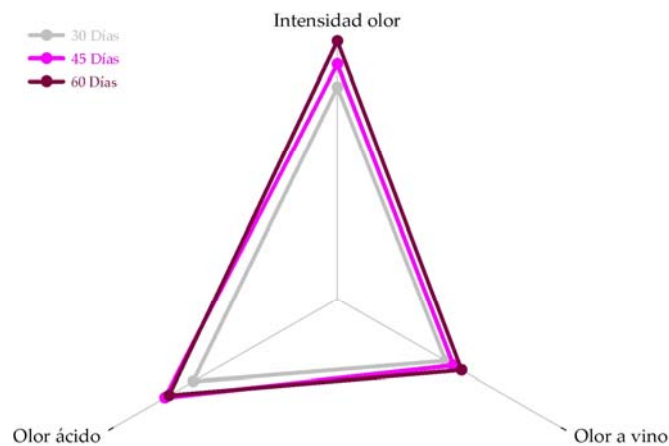


Figura 73. Atributos sensoriales del olor para quesos CA a lo largo de la maduración

Tal y como se ha detectado en otras variedades de queso, el aumento en la intensidad del olor observado está determinado por la aparición de diversos componentes volátiles y no volátiles (y de las proporciones en las que se encuentren), originados en los quesos durante la proteólisis y la lipólisis (Fox *et al.*, 2000; Gaborit *et al.*, 2001; Martínez-Cuesta *et al.*, 2001; Pino, 2007; Delgado *et al.*, 2009 y Galán, 2008).

A lo largo de toda la maduración, se percibe el aumento de las puntuaciones correspondientes al olor ácido de los quesos, aunque el incremento no resultó ser significativo ($p > 0,05$). Este aumento se correlaciona positivamente ($r^2 = 0,44$) con el índice de acidez (ácido láctico) de los quesos.

La evolución que experimenta la acidez de los quesos también puede estar relacionada con el aumento de la concentración de ácidos grasos libres, especialmente de cadena corta, que van a ser responsables de esta característica sensorial (Lawrie y Lawrence, 1972; Kanawjia *et al.*, 1995). Los ácidos grasos liberados en el queso se transforman en cetoácidos mediante reacciones de β -oxidación. Estos cetoácidos posteriormente son descarboxilados y transformados en metil-cetonas y, éstas a su vez pueden ser reducidas transformándose en

alcoholes. Por esta razón, como consecuencia del aumento de la lipólisis durante la maduración, se va a producir un incremento de los compuestos volátiles que desarrollan el aroma del queso, y que causan un aumento de su acidez.

Por otra parte, el incremento del olor ácido de los quesos podría relacionarse con los valores para los atributos de intensidad del sabor o el olor detectados en los mismos, que mostraron la misma tendencia; hecho que también fue observado por Ballesteros *et al.* (2006) en quesos Manchegos.

En relación a esto, son muchos los autores que actualmente vienen englobando los atributos del sabor y del olor dentro del concepto único conocido como flavor. Este concepto se traduciría, según la AENOR (1997), como una sensación olfato-gustativa; ya que para percibir el sabor, resulta imprescindible que numerosas sustancias volátiles alcancen los centros olfativos de las fosas nasales durante la permanencia del queso en la boca. Por este motivo, se ha comprobado que la mayoría de los compuestos que participan en el aroma, también son responsables del sabor. De hecho, en este trabajo, se ha detectado una correlación positiva ($r^2=0,66$) entre los atributos de olor y sabor, observando, que el aumento de las percepciones olfativas conlleva un aumento de las gustativas, incrementándose ambas a medida que transcurre la maduración.

En términos generales, con respecto a las percepciones olfativas del queso de Murcia al Vino, podríamos decir que este queso se caracteriza por una intensidad de olor media y un suave olor a ácido y a vino. Esta descripción complementa la reseña simple de “aroma suave” que aparece para estos tipos de quesos en su Reglamento de la Denominación de Origen (Anónimo, 2001).

En la **Tabla 46** y **Figura 74**, se muestran los valores y las puntuaciones obtenidas para los atributos de olor de los quesos elaborados con CA y CV, a los 60 días de maduración.

Se puede observar que el panel de catadores no estableció diferencias significativas ($p>0,05$) en las características de olor entre quesos elaborados con diferente coagulante. Así, se establece que la intensidad de olor y el olor ácido fue muy similar en los quesos elaborados con CA y con CV (con valores a los 60 días 5,6 y 5,4, y de 4,2, respectivamente); mientras que para el olor a vino, los valores se mostraron ligeramente superiores para los quesos elaborados con CV (con puntuaciones de 3,6 frente a los 3,1 de los elaborados con CA).

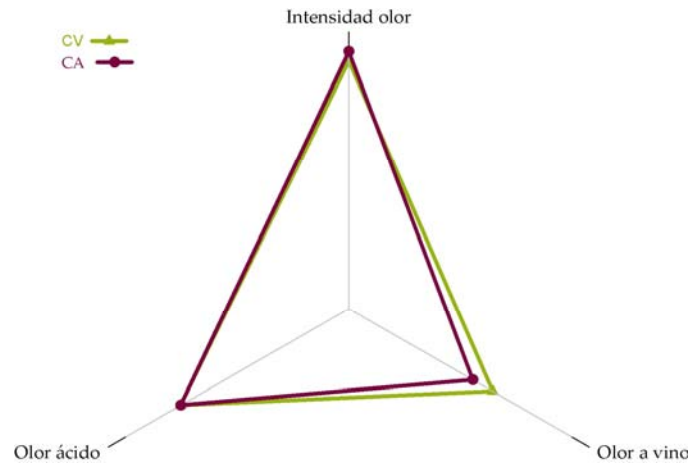


Figura 74. Atributos sensoriales olfativos de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración

Pino (2007), tampoco encontró diferencias significativas en la intensidad de olor y olor ácido entre los quesos elaborados con leche de cabra y con diferentes coagulantes. Sin embargo, en otros trabajos similares realizados en quesos de oveja, autores como Sanjuán (1992) o Tejada *et al.* (2007), detectaron que los quesos elaborados con CV presentaban una mayor intensidad del aroma así como, mayores puntuaciones en los atributos intensidad de olor y olor ácido que los quesos elaborados con CA, lo que se atribuye a la mayor proteólisis producida. De hecho, se ha comprobado que la degradación de las caseínas a pequeños péptidos y aminoácidos libres contribuye al aroma de los quesos al ser precursores de sustancias aromáticas (Fox, 1989; Garde *et al.*, 1997; Oumer *et al.*, 1999). No obstante en otros quesos, como en el queso de Murcia al Vino, péptidos y aminoácidos ejercen una menor influencia en el olor del queso, al estar relacionados con sabores básicos, sobre los que existe una superposición de sabores existentes en el queso (Engels y Visser, 1994); o quizás porque el sabor de los quesos pudiera provenir de efectos sinérgicos entre los aminoácidos entre sí o de los aminoácidos con otros componentes (Salles *et al.*, 2000; Mallatou *et al.*, 2003).

Por otra parte, probablemente, el tiempo de maduración de este tipo de queso (máximo de 60 días) es demasiado corto para que se produzcan todas las

reacciones que transforman péptidos y aminoácidos en sustancias volátiles responsables del aroma. En la mayoría de los quesos el perfil aromático está definido, fundamentalmente, por los ácidos grasos libres, sobre todo de cadena corta, y en menor medida, por ésteres y cetonas, y derivados del benceno (McSweeney y Sousa, 2000; Fernández-García *et al.*, 2002; Hayaloglu *et al.*, 2007; Póveda *et al.*, 2008, Delgado *et al.*, 2009).

4.1.4.2. Percepciones visuales: apariencia de la pasta

En la **Tabla 46** y en la **Figura 75** se muestran los atributos relacionados con la apariencia interna de los quesos.

Se puede apreciar que el tiempo de maduración afectó al tamaño de los ojos de los quesos de Murcia al Vino, que disminuyó significativamente ($p < 0,05$) a lo largo de todo el periodo de estudio, obteniéndose a los 2 y 60 días, puntuaciones de 2,8 y de 1,7, respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el número de ojos y la distribución de los mismos en las muestras analizadas.

La disminución en el tamaño de los ojos del queso se produce como consecuencia de la pérdida progresiva de agua, provocando una modificación de la textura. Esta modificación va a ir destruyendo la estructura que conforman las paredes de los ojos, disminuyendo el tamaño de los mismos, e incluso llegando a desaparecer. Este hecho coincide con lo encontrado por Pino (2007) en el queso de Los Pedroches, o por Tejada *et al.* (2007) o Galán (2008) en quesos de oveja.

La intensidad de color del queso de Murcia al Vino se incrementó de forma significativa ($p > 0,05$) durante la maduración, coincidiendo con lo observado con otros tipos de quesos (Kilic *et al.*, 1997; Rohn *et al.*, 1997; Tejada *et al.*, 2007; Pino, 2007; Pompei *et al.*, 1991; o Frau *et al.*, 1999). Este aumento de color observado, podría estar relacionado, como afirman algunos autores (Tejada *et al.*, 2007; Rohm y Jaros, 1997b), con la proteólisis que sufren los quesos a lo largo de la maduración. Además, a medida que avanza la maduración, la pérdida de agua que sufren los quesos produce una reducción de los espacios vacíos dentro de la microestructura de los quesos que se vuelve mas densa y compacta y lleva consigo un aumento ligero en la intensidad del color (Saldo, 2002). De hecho, hemos detectado una correlación positiva significativa ($p < 0,05$) entre el extracto

seco total y el color, coincidiendo con Frau (1999); Rohm y Jaros (1997a) y Tejada *et al.*, 2007.

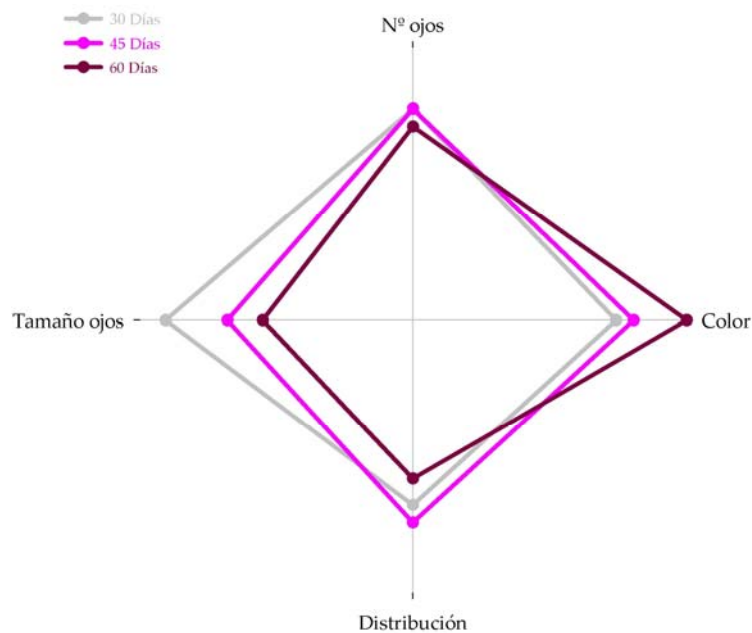


Figura 75. Atributos de apariencia para quesos CA a lo largo de la maduración

Los resultados de este trabajo caracterizan, la apariencia interna del queso de Murcia al Vino, como una pasta homogénea de color blanco y con ojos poco abundantes y pequeños, distribuidos irregularmente por la misma; en consonancia con la Reglamentación de la Denominación de Origen (Anónimo, 2001) que la describe como “masa de color blanca con pocos y pequeños ojos”.

El tipo de coagulante solo afectó significativamente ($p < 0,05$) al tamaño de los ojos y al color (**Tabla 46** y **Figura 76**). A partir de los 45 días el tamaño de los ojos resultó ser significativamente mayor ($p < 0,05$) en quesos elaborados con CV que en los elaborados con CA, presentando a los 60 días de maduración, valores de 2,1 y 1,7, respectivamente.

A pesar de que sólo se ve afectado significativamente el tamaño de ojos, se observó que el número de ojos en los quesos elaborados con CV es ligeramente superior a los encontrados en los elaborados con CA, presentando a los 60 días valores de 3,0 y de 2,2, respectivamente. Esto podría estar provocado por la mayor concentración de GABA de los quesos elaborados con CV; ya que hay autores que correlacionan la presencia de este aminoácido con un mayor número de ojos (Christensen *et al.*, 1999).

Los valores atribuidos por los jueces al color de los quesos elaborados con CV fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que los elaborados con CA, observándose unas puntuaciones a los 60 días de 4,5 y 3,1, respectivamente. Otros autores como Tejada *et al.* (2007) y Pino (2007), encontraron resultados similares en estudios con quesos elaborados con diferentes coagulantes, obteniendo también valores superiores para los quesos elaborados con un CV.

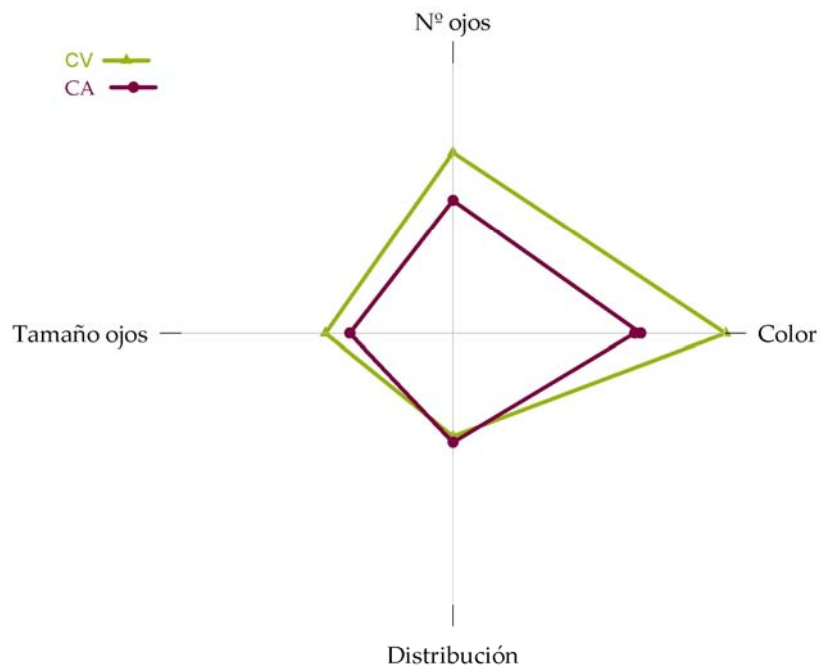


Figura 76. Atributos sensoriales de apariencia interna de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración

El hecho de observar un color más intenso en los quesos elaborados con CV con respecto a los elaborados con CA, podría justificarse también, por la mayor

proteolisis producida en los primeros, ya que se ha detectado una relación directa entre el color que presentan los quesos y el grado de proteolisis que sufren los mismos, al igual que observaron también Rohm *et al.* (1997) y Tejada (2001) en quesos de vaca y de oveja, respectivamente. De hecho, se han detectado correlaciones positivas estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el color del queso y las fracciones nitrogenadas (NS, NNP), y los subproductos de α y β -CN y, negativas con respecto las α y β -CN.

4.1.4.3. Percepciones de textura

En la **Tabla 46** y en la **Figura 77** se muestran los atributos sensoriales de textura de las muestras de quesos de Murcia al Vino.

Tal y como se puede comprobar, el tiempo de maduración afectó de manera desigual a los atributos de textura de los quesos. Así, se observa un incremento significativo en la dureza ($p < 0,05$) mientras que la granulosidad, aunque también aumentó no lo hicieron de manera significativa ($p > 0,05$).

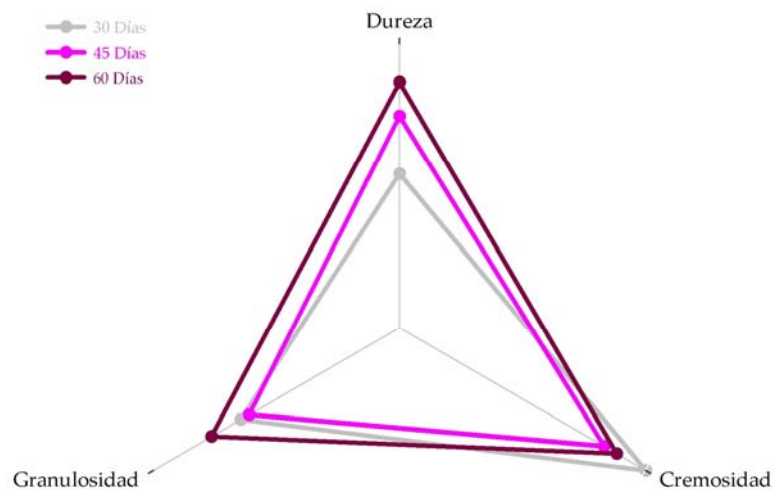


Figura 77. Atributos de textura para quesos CA a lo largo de la maduración

Tanto en los quesos elaborados con CV como en los elaborados con CA, se han establecido correlaciones positivas ($p < 0,05$) entre los ST y la dureza. El aumento de la dureza de los quesos, conforme avanza la maduración, es un

resultado esperado, ya que al disminuir la humedad se produce una deshidratación de la proteína que provoca una disminución de su libertad de movimiento y por tanto, una mayor firmeza de la matriz del queso (Buffa *et al.*, 2001). La disminución del contenido en agua en la matriz del queso determina una concentración de las caseínas y un aumento del número de enlaces entre ellas, factores ambos que van a influir de manera positiva sobre la dureza del queso.

Por otra parte, Carmona y Gómez (1994), en queso de Los Pedroches; Amantea *et al.* (1986) en queso Cheddar; Luyten *et al.* (1991) en queso Gouda y Pompei *et al.* (1991) en queso Provolone, observaron al igual que nosotros, un incremento de la dureza de los quesos durante la maduración.

En relación a la cremosidad, se observan puntuaciones irregulares a lo largo de la maduración de los quesos, aunque al final de ella los valores van a ser ligeramente inferiores. Autores como Sanjuán (1992) o Pino (2007) correlacionan positivamente la cremosidad con la cantidad de grasa de los quesos, detectando puntuaciones superiores para este atributo en las muestras con cantidades superiores de grasa.

Resumiendo podríamos decir que el queso de Murcia al Vino se caracteriza por ser blando, un poco granuloso y con cremosidad media. La Denominación de Origen para este queso (Anónimo, 2001) establece que “la masa es compacta al corte, de textura cremosa y elástica”.

En la **Figura 78** se muestran los atributos sensoriales de textura de las muestras de quesos elaboradas con CV y CA, a los 60 días de maduración. El tipo de coagulante afectó significativamente a la dureza ($p < 0,01$), granulosidad ($p < 0,001$) y cremosidad ($p < 0,001$). De hecho, con la comparación múltiple de medias se comprueba que desde los 30 días de maduración, los quesos de Murcia al Vino elaborados con CA fueron significativamente más duros ($p < 0,05$) y granulosos ($p < 0,05$), y menos cremosos ($p < 0,05$), que los elaborados con CV. A los 60 días de maduración se observan unos valores de dureza, granulosidad y cremosidad de 5,1 y de 3,1, 4,5 y 2,1 y 5,2 y 7,1 para quesos elaborados con CA y CV, respectivamente.

La mayor dureza observada en los quesos elaborados con CA puede deberse a la menor proteólisis desarrollada en estos quesos, ya que existe una

relación indirecta entre el grado de proteolisis y la dureza, tal y como han establecido otros autores como Fernández del Pozo *et al.* (1988); Rohm *et al.* (1992); Yun *et al.* (1993); Uceda *et al.* (1994a) o Ustunol y Zeckzer (1996). Por su parte, Freitas y Malcata (1996) en queso Picante; Pino (2007) en el queso de Los Pedroches o Tejada (2001) y Galán (2008) en quesos de oveja, también observaron que los quesos elaborados con CV eran más blandos que los elaborados con cuajo.

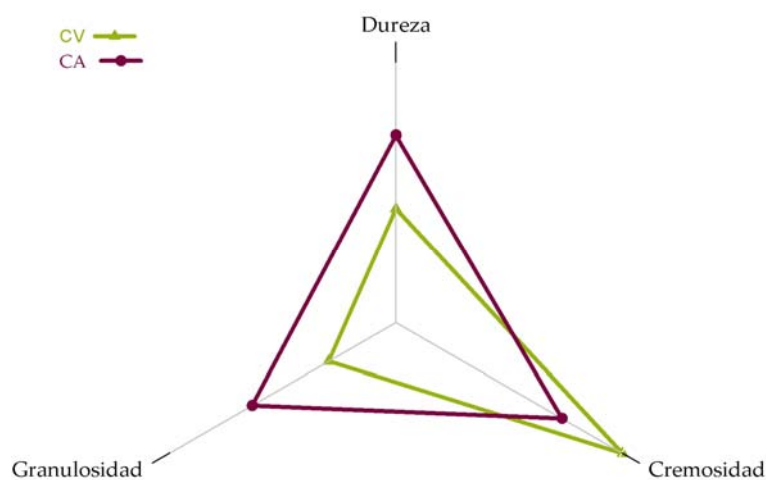


Figura 78. Atributos sensoriales de textura de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración

Los valores superiores en las puntuaciones para la cremosidad que presentan los quesos elaborados con CV a lo largo de toda la maduración, se deben, sin duda, a la intensa proteolisis que tiene lugar en los mismos, que desintegra la red caseínica dando lugar a una estructura más homogénea (Green y Grandison, 1987). Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores en otras variedades de quesos (Sanjuán, 1992; Freitas y Malcata, 1996; Tejada, 2001; Prados, 2005; Pino, 2007; Galán, 2008). Hort *et al.* (1997a) también observaron en queso Cheddar una relación directa entre proteolisis y cremosidad, mientras que Fenelon *et al.* (1999) o Hayaloglou *et al.* (2005) relacionaron directamente la obtención de una textura suave de los quesos con la degradación sufrida por la α_{s1} -CN. En nuestro estudio la cremosidad se ha correlacionado de forma directa con el NS ($p < 0,05$) y de forma indirecta con la α , β , y γ -caseínas.

Otros autores como Sanjuán (1992) atribuyen la mayor cremosidad de los quesos elaborados con CV a los mayores contenidos en grasa observados con respecto a los elaborados con CA. En nuestro caso no ocurre esto, ya que no existen diferencias significativas entre el contenido de grasa de los quesos elaborados con ambos tipos de coagulantes.

4.1.4.4. Percepciones gustativas

En la **Tabla 46** y **Figura 79** se muestran los valores medios de las puntuaciones, otorgadas por los panelistas, para las percepciones gustativas del queso de Murcia al Vino a lo largo de su maduración.

Se puede observar que el tiempo de maduración afectó de forma significativa ($p < 0,05$) a la intensidad global de sabor y al sabor salado, observándose un incremento de ambos atributos durante la maduración. Gaborit *et al.* (2001) también detectaron un incremento significativo de la intensidad de sabor durante la maduración de varios quesos de cabra. No se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para el resto de los atributos estudiados (sabor a vino, sabor ácido y sabor amargo).

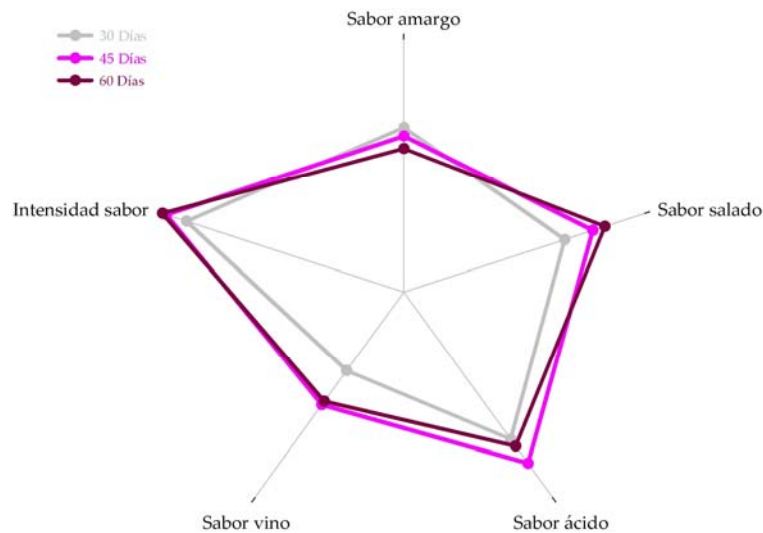


Figura 79. Atributos de sabor para quesos CA a lo largo de la maduración

El hecho de que todos los atributos de sabor, menos el sabor amargo, se incrementen durante la maduración, puede ser debido al aumento de los compuestos responsables del sabor en el queso, que surgen como consecuencia de las transformaciones químicas que sufren los mismos (Morgan y Gaborit, 2001; Pizzillo *et al.*, 2005), al igual que ocurría con el atributo del olor. Por otra parte, coincidiendo con lo detectado por autores como Carmona *et al.* (1999), en queso de oveja, y Fernández del Pozo *et al.* (1988) en queso de La Serena, podríamos relacionar el incremento de la intensidad de sabor con el aumento que experimentan las fracciones nitrogenadas, al detectar una correlación positiva entre ambas ($r^2=0,92$).

El aumento significativo que experimenta el sabor salado del queso, (que presenta valores de 4,0 y de 5,0, a los 2 y 60 días, respectivamente), está asociado al aumento en la concentración de sal que experimenta éste durante su maduración ($r^2=0,9$), y que va a propiciar un cambio en la difusión de la misma dentro de la boca durante la masticación (Jack *et al.*, 1995).

Los sabores a vino y a ácido aumentan ligeramente a lo largo de toda la maduración, mientras que el sabor amargo disminuye, aunque ninguno de ellos lo hace de manera significativa ($p>0,05$).

De manera global podría decirse, por tanto, que los quesos de Murcia al Vino presentan una intensidad de sabor media, un suave sabor a ácido láctico y a vino, y un sabor ligeramente salado. Estos resultados se corresponden con la descripción que aparece en el Reglamento de la Denominación de Origen (Anónimo, 2001) que describe las características gustativas como "...sabor agradablemente ácido, poco salado y aroma suave. Con escasa acidez que disminuirá con el tiempo de maduración al revés que el punto de salado y aroma, que aumentarán".

En la **Tabla 46** y en la **Figura 80**, se representan de manera comparada los atributos sensoriales del sabor para los quesos elaborados con CV y CA a los 60 días de maduración. El tipo de coagulante utilizado para elaborar el queso de Murcia al Vino sólo afectó de manera significativa ($p<0,05$) a la intensidad del sabor y al sabor amargo, que fue superiores en los quesos elaborados con CV, no

estableciéndose diferencias significativas ($p>0,05$) en el sabor a vino, ácido o salado, a pesar de que este último sea ligeramente superior.

El sabor de los quesos elaborados con CV fue más intenso que los elaborados con CA, aunque no se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$) hasta los 60 días de maduración, donde se observaron valores de 7,2 y 6,0, respectivamente.

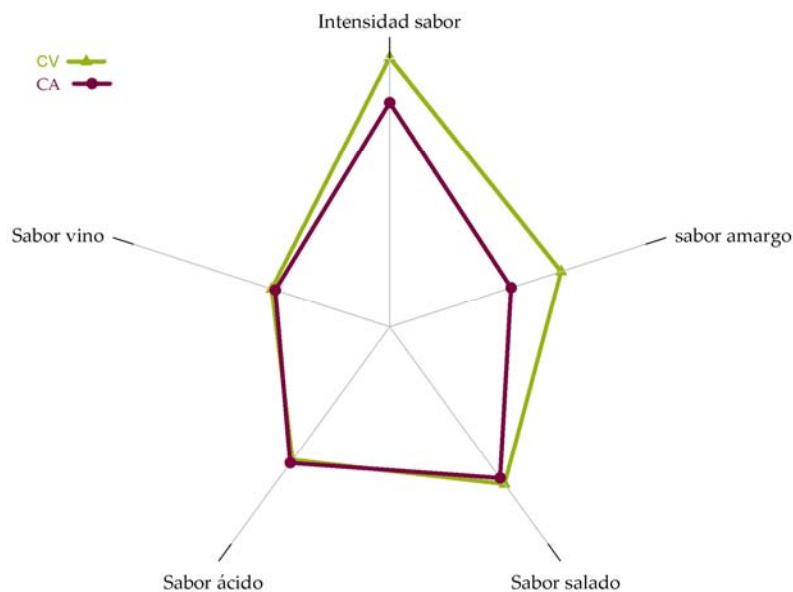


Figura 80. Atributos sensoriales de sabor de los quesos elaborados con CA y CV a los 60 días de maduración

Estos resultados coinciden con los encontrados por autores como Sanjuán (1992) y Tejada *et al.* (2007) en el queso de Los Pedroches; Núñez *et al.* (1991) en queso de la Serena; Picón *et al.* (1996 y 1997) en queso Manchego; Freitas y Malcata (1996) en queso Picante y Galán (2008) en queso de oveja; que también observaron mayor intensidad de sabor en los quesos elaborados con CV que en los elaborados con CA.

Este hecho se debe, probablemente, a la mayor proteólisis de los quesos elaborados con CV, presentando mayores concentraciones de péptidos y aminoácidos que contribuyen de forma importante en el sabor del queso. Así, se conoce que los pequeños péptidos pueden proporcionar sabores amargos y

dulces; mientras que los aminoácidos, van a generar un amplio espectro de sabores, debido a su capacidad de reaccionar con múltiples compuestos o al sufrir diversas degradaciones.

En este sentido, Ballesteros *et al.* (2006) detectaron una relación directa entre la intensidad de sabor de los quesos y la concentración de nitrógeno soluble en agua en los mismos. Por su parte, Aston *et al.* (1983a, 1983b y 1986) apuntaron que las fracciones de nitrógeno soluble en agua eran las principales responsables, junto a las fracciones de Nitrógeno no proteico en ácido fosfotúngico (PTASN), del flavor de los quesos. Mendía (2000) encontró en queso Idiazabal valores superiores para los atributos olfativos y gustativos en los quesos que presentaban una intensa degradación de α y β -CN, así como de altos niveles de fracciones nitrogenadas y aminoácidos libres; mientras que Madkor *et al.* (2000) y Hayaloglu *et al.* (2005) establecieron una relación directa entre intensidad de sabor y la concentración de fracciones nitrogenadas y aminoácidos libres presentes en los quesos.

Las puntuaciones para el sabor amargo fueron muy similares para todos los quesos hasta el día 30 de maduración. A partir de ese momento el sabor amargo de los quesos elaborados con CV aumentó, mientras que el de los elaborados con CA disminuyó ligeramente. De esta manera, al final de la maduración se establecieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los quesos elaborados con CV y CA observándose valores de 4,8 y de 3,4, respectivamente.

El sabor amargo no siempre puede considerarse un defecto, ya que puede ser uno de los componentes de la calidad de sabor del queso (Shinoda *et al.*, 1986b). De esta manera, los resultados encontrados en nuestros quesos coinciden, en líneas generales, con los obtenidos en quesos elaborados con CV (Picón *et al.*, 1996; Gaya *et al.*, 1999; Tejada *et al.*, 2007; Pino, 2007), en los que tampoco se detectaron sabores amargos desagradables a diferencia de lo que ocurre en quesos elaborados con leche de vaca (Barbosa *et al.*, 1981; Banks *et al.* 1998; Carrera *et al.*, 1999). Probablemente, este hecho se deba a que las caseínas de leche de oveja y de cabra van a ser menos susceptibles que las bovinas a la formación de péptidos hidrofóbicos amargos por acción de las proteasas (Pelissier y Manchón, 1976).

El sabor amargo del queso parece estar provocado por las cadenas laterales de los péptidos producidos durante la proteólisis y por la presencia de aminoácidos básicos (como la arginina o la histidina). Así, diversos autores

relacionan el sabor amargo característico de los quesos elaborados con CV, con el índice de péptidos HO/HI y con la cantidad de péptidos HO (Sanjuán, 1992; Núñez *et al.*, 1991; Picón *et al.*, 1996 y 1997; Freitas y Malcata, 1996; Singh *et al.*, 2003). En nuestro caso, también se ha detectado una correlación positiva ($r^2=0,99$) entre el sabor amargo de los quesos de Murcia al Vino y las concentraciones de péptidos HO.

Por otra parte, algunos autores como Polo *et al.*, 1985 o Lemieux y Simard, 1992 afirman que la arginina confiere un sabor amargo a los quesos. En relación a esto, el mayor sabor amargo de los quesos elaborados con CV puede estar provocado por la mayor concentración de arginina observada en estos quesos con respecto a los elaborados con CA.

El tipo de coagulante no afectó significativamente ($p>0,05$) al sabor a vino, sabor ácido y sabor salado de los quesos.

4.1.4.5. Análisis multivariante

Análisis de componentes principales

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial, que se han comentado anteriormente, han sido confirmados con un análisis de componentes principales (ACP) (Tabla 47).

El CP1, que explica el 31% del total de la varianza, se relacionó positivamente con el número de ojos, el sabor amargo, la cremosidad, y la intensidad de sabor total entre otros atributos, mientras que lo hizo de manera negativa con al dureza y la granulosidad. El sabor amargo y el número de ojos fueron los atributos con mayor efecto diferenciador.

El CP2 explica el 27% del total de la varianza. Presenta correlaciones positivas con la dureza y granulosidad y negativas con la cremosidad y tamaño de los ojos entre otros. Dureza, sabor salado e intensidad de olor son los atributos que presentaron unas correlaciones más altas.

En la **Figura 81**, se representan los quesos en un espacio bidimensional en función de los dos CP extraídos. El CP2 diferencia entre los quesos con 30 días de maduración y los de 45 y 60, localizándose en la parte inferior y superior,

respectivamente. El CP1 diferencia entre los quesos elaborados con CV y CA, que se localizan en el hemisferio derecho e izquierdo, respectivamente.

Tabla 47. Análisis de componentes principales de los atributos sensoriales de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y CV a lo largo de la maduración

	1	2
Intensidad olor	-0,008	0,764
Olor ácido	0,112	0,242
Olor vino	0,660	0,500
Color	0,527	0,033
Nº ojos	0,807	-0,037
Tamaño ojos	0,348	-0,693
Distribución ojos	0,398	-0,234
Dureza	-0,455	0,819
Granulosidad	-0,549	0,619
Creмосidad	0,707	-0,526
Intensidad sabor	0,701	0,579
Sabor vino	0,722	0,552
Sabor ácido	0,450	0,287
Sabor salado	0,269	0,794
Sabor amargo	0,824	-0,081

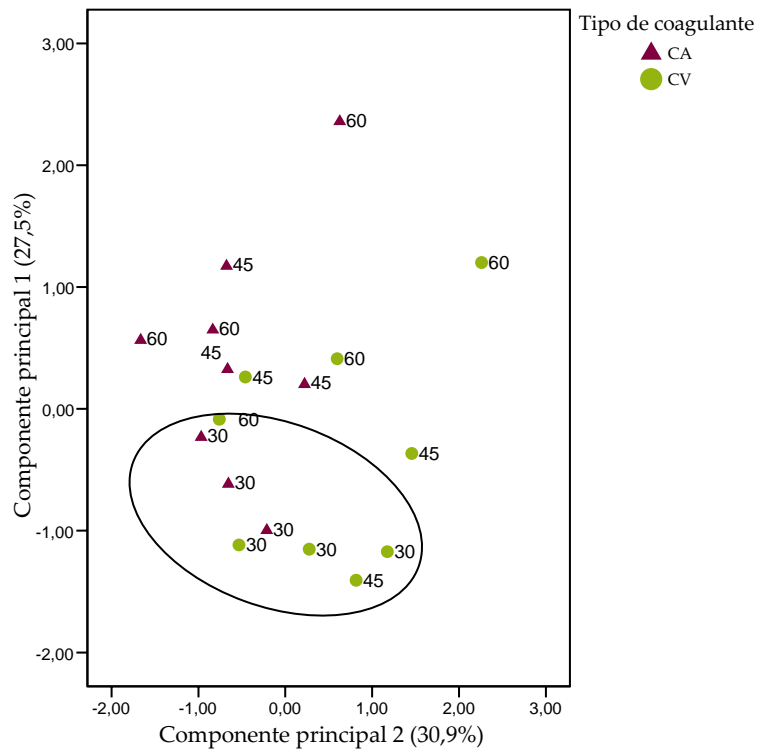


Figura 81. Representación de los quesos elaborados con CV y CA en el plano definido por los 2 CP extraídos de los valores de los atributos sensoriales a lo largo de la maduración

Análisis Discriminante

- Aplicación con respecto al tiempo de maduración

En la **Tabla 48** se representan los principales valores de Lambda de Wilks y de F calculados a partir de los atributos sensoriales determinadas en los quesos. Se puede observar que intensidad de olor, cremosidad y sabor ácido son las variables que más han contribuido en la diferenciación de los diferentes periodos de maduración, con valores de F y de Lambda de Wilks de 217,3, 109,3 y 103,1 y 0,01 respectivamente.

Tabla 48. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	Intensidad olor	Sabor ácido	Tamaño ojos	Color	Creemosidad	Sabor picante	Granulosidad
Lambda de Wilks	0,01	0,01	0,02	0,25	0,01	0,21	0,03
Valor F	217,3	103,1	93,7	4,6	109,3	5,7	51,8

	Sabor amargo	Sabor salado	Olor ácido	Nºojos	Olor vino	Distribución ojos
Lambda de Wilks	0,02	0,35	0,03	0,04	0,05	0,12
Valor F	81,4	2,9	41,5	36,7	30,0	11,0

En la **Tabla 49** se observan las distancias establecidas entre los diferentes periodos de maduración. Las diferencias menos marcadas se detectaron entre los quesos madurados durante 30 y 45 días, que presentaron una distancia de los cuadrados de Mahalanobis de 2270,77. Por otra parte y como era esperado, la máxima distancia se establece entre los quesos madurados entre 30 y 60 días.

Tabla 49. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis

	30	45	60
30	0,0	2270,77	11.983,44
45	2270,77	0,0	3859,63
60	11.983,44	3859,63	0,0

A partir de las variables se obtuvieron las funciones de clasificación y con ellas, la matriz de clasificación (**Tabla 50**) en la cual aparecen correctamente clasificados el 100% de los quesos.

Mediante las dos primeras funciones canónicas (FC) se representan en un diagrama de dispersión (**Figura 82**) los quesos con 30, 45 y 60 días de maduración.

Tabla 50. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	30	45	60
30	100	6	0	0
45	100	0	6	0
60	100	0	0	6
Total correcto	100	6	6	6

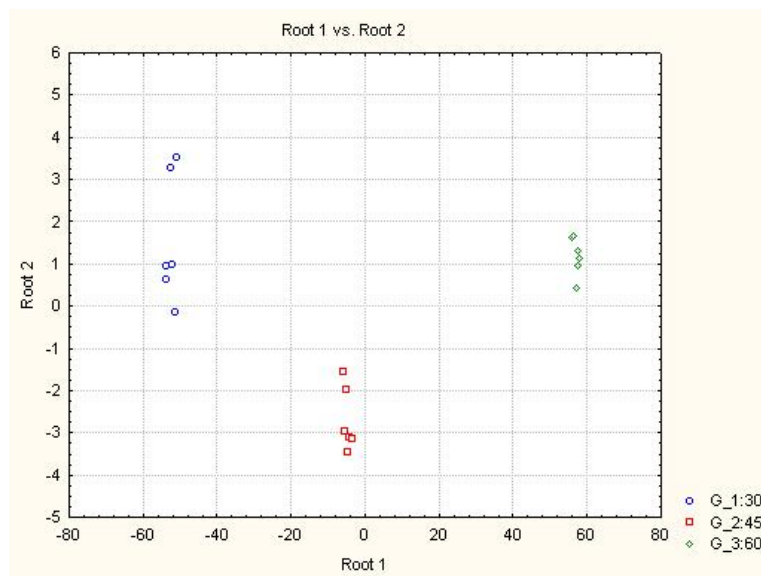


Figura 82. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2

- Aplicación con relación al factor tipo de coagulante

Como se puede observar en la **Tabla 51**, fueron cremosidad, granulosis y dureza las variables que presentaron mayor capacidad discriminante en los quesos elaborados con los diferentes coagulantes.

Las diferencias de cuadrados de Mahalanobis establecidas entre los quesos elaborados con CV y CA fué de 63.50.

Tabla 51. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	Intensidad olor	Sabor amargo	Tamaño ojos	Dureza	Creemosidad	Nº ojos	Granulosidad
Lambda de Wilks	0,60	0,55	0,59	0,36	0,19	0,44	0,29
Valor F	6,76	8,31	7,04	17,92	42,47	12,94	24,35

La función de clasificación clasificó correctamente el 100% de los quesos (Tabla 52).

Tabla 52. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	CA	CV
CA	100	9	0
CV	100	0	9
Total correcto	100	9	9

4.2. EFECTO DEL TAMAÑO DEL QUESO SOBRE SUS CARACTERÍSTICAS COMPOSICIONALES

En este apartado nos centraremos sólo en discutir el efecto que tiene el tamaño del queso de Murcia al Vino sobre las características del mismo. No nos detendremos en estudiar el efecto del tiempo de maduración puesto que, en líneas generales, coincide con lo expuesto en el apartado 4.1.

4.2.1. Composición

4.2.1.1. Composición general

En la **Tabla 53** se presentan los valores medios y las desviaciones estándar de las características composicionales de los quesos grandes (CAG) y pequeños (CAP), a los 2, 30, 45 y 60 días de maduración. De la misma manera, se muestran los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas realizadas mediante el test LSD.

Los valores de pH determinados en los quesos CAG disminuyeron significativamente ($p < 0,001$) a lo largo de toda su maduración, al igual que lo hicieron los quesos CAP, no estableciéndose diferencias significativas ($p > 0,05$) en función de su tamaño. Así, los cambios que se producen en la elaboración de los quesos (en el prensado, salado y, principalmente, en la distinta área superficial de las piezas grandes y pequeñas), no modifican los valores de pH.

Los contenidos en grasa, proteína, cenizas, y acidez titulable (AT) no se modificaron significativamente ($p > 0,05$) por el tamaño de los quesos, dado que son componentes que van a quedar retenidos en la cuajada, antes del desuerado. Al producirse las diferencias del proceso de elaboración, en una etapa posterior a la formación de la cuajada, no van a afectar a dichos contenidos.

Por el contrario, tanto el contenido en sólidos totales (ST) como la cantidad de NaCl, se vieron afectados por el tamaño de manera significativa ($p < 0,05$).

Tabla 53. Características composicionales del queso de Murcia al Vino (valores medios y desviaciones estándar) de tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP) a lo largo de la maduración

	Tamaño queso	Días de maduración			
		2	30	45	60
	CAG				
pH		5,4±0,1 ^a	5,1±0,1 ^{bc}	5,0±0,1 ^{bcd}	5,2±0,1 ^{bd}
AT ²		1,2±0,2 ^a	1,6±0,2 ^{bc}	1,7±0,1 ^c	1,9±0,1 ^{cd}
ST ¹		51,1±1,3 ^a	56,6±1,2 ^b	58,0±0,9 ^{bc}	59,6±1,0 ^c
Grasa ²		61,1±1,8 ^a	61,7±0,8 ^a	59,9±1,9 ^a	60,2±1,9 ^a
Proteína ²		34,1±0,4 ^a	32,4±0,6 ^a	32,5±1,0 ^a	33,0±1,1 ^a
Cenizas ²		6,1±0,7 ^a	6,3±0,2 ^a	6,1±0,3 ^a	6,1±0,3 ^a
NaCl ²		1,6±0,1 ^a	3,3±0,2 ^c	2,7±0,3 ^{bc}	3,2±0,3 ^c
	CAP				
pH		5,36± 0,17 ^d	5,07± 0,13 ^{ab}	5,02± 0,06 ^a	5,16±0,05 ^{bc}
AT ²		1,47± 0,39 ^a	1,87± 0,51 ^c	1,97± 0,34 ^d	2,11±0,22 ^{de}
ST ¹		53,34± 2,71 ^a	60,26±1,87 ^{cd}	63,17±2,41 ^{de}	63,84± 2,87 ^{de}
Grasa ²		60,71±2,40 ^a	59,88±2,08 ^a	56,79±2,42 ^a	60,32±0,44 ^a
Proteína ²		34,43±1,99 ^a	34,34±1,45 ^a	34,68±0,97 ^a	33,81±1,96 ^a
Cenizas ²		5,31±0,80 ^a	5,93±0,36 ^a	5,65±0,15 ^a	6,24±0,66 ^a
NaCl ²		1,88±0,38 ^a	2,24±0,18 ^b	2,33±0,24 ^b	2,48±0,28 ^b

¹ Expresados como gramos por 100 g queso

² Expresados como gramos por 100 g de sólidos totales

^{a-e} Resultados del Test de Fisher (LSD). Medias del mismo parámetro en la misma fila sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

CAG: quesos grandes elaborados con cuajo animal; CAP: quesos pequeños elaborados con cuajo animal.

Desde los 2 días de maduración el contenido de ST de los quesos pequeños fue superior al de los grandes (**Figura 83**). Las diferencias de los ST entre los dos tipos de quesos fueron haciéndose mayores hasta ser significativas ($p < 0,05$) a los 30 días; presentando, a los 60 días de maduración, valores de 63,84 y de 59,6g ST/100g queso en quesos CAP y CAG, respectivamente.

El mayor incremento de los ST se produce durante los primeros 30 días de maduración, experimentando un aumento del 64,71 y del 65,91%, coincidiendo con las mayores pérdidas de peso que experimentan los quesos (que es del 11,25 y

del 14,83% en quesos CAG y CAP, respectivamente). Este hecho permite establecer una correlación negativa ($p < 0,05$), entre el peso de los quesos y la cantidad de ST que presentan los mismos.

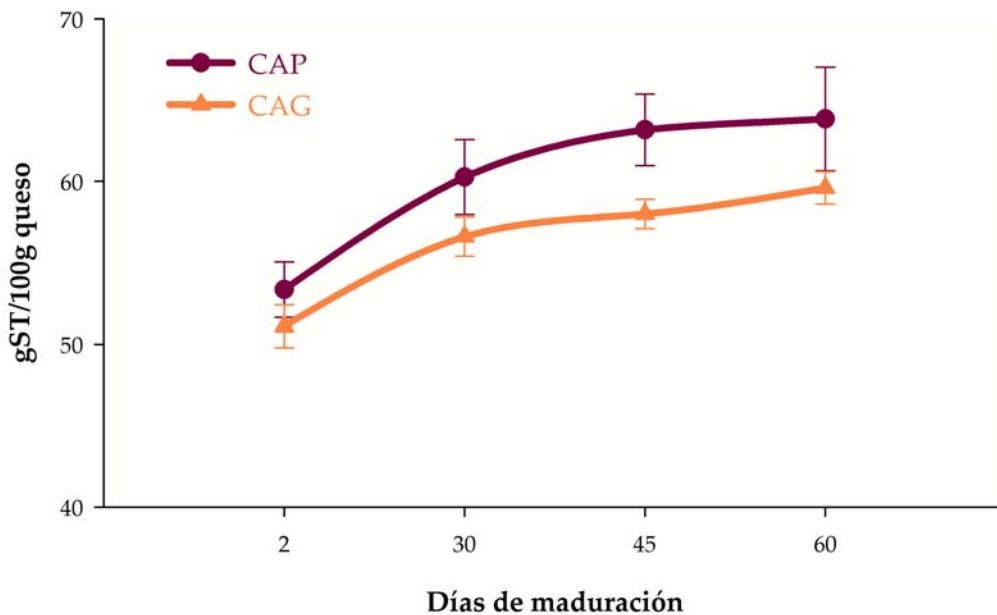


Figura 83. Evolución del ST lo largo de la maduración de los quesos con tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP)

Puesto que las condiciones de maduración, humedad y temperatura, fueron idénticas para todos los quesos (tal y como se ha visto en el capítulo de Material y Métodos), las mayores pérdidas de humedad de los quesos CAP se producen al tener estos unas dimensiones más pequeñas. Las diferencias en ST están provocadas, sin duda, por los diferentes moldes utilizados (microperforados en CAG y cilíndricos-lisos en CAP) y las distintas condiciones de prensado aplicadas en la DDOO para cada queso. Por otra parte, estas dimensiones determinan una mayor relación superficie/volumen que va a facilitar la pérdida de agua, por lo que sus ST serán superiores a los de los quesos CAG.

Tal y como se observa en la **Figura 84**, el tamaño de los quesos afectó significativamente ($p < 0,05$) al contenido en NaCl de los mismos. Este fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los quesos CAG, desde el día 30 de la maduración; alcanzaron a los 60 días valores de 3,2 y de 2,48 g NaCl/100 g ST, en quesos CAG y CAP, respectivamente.

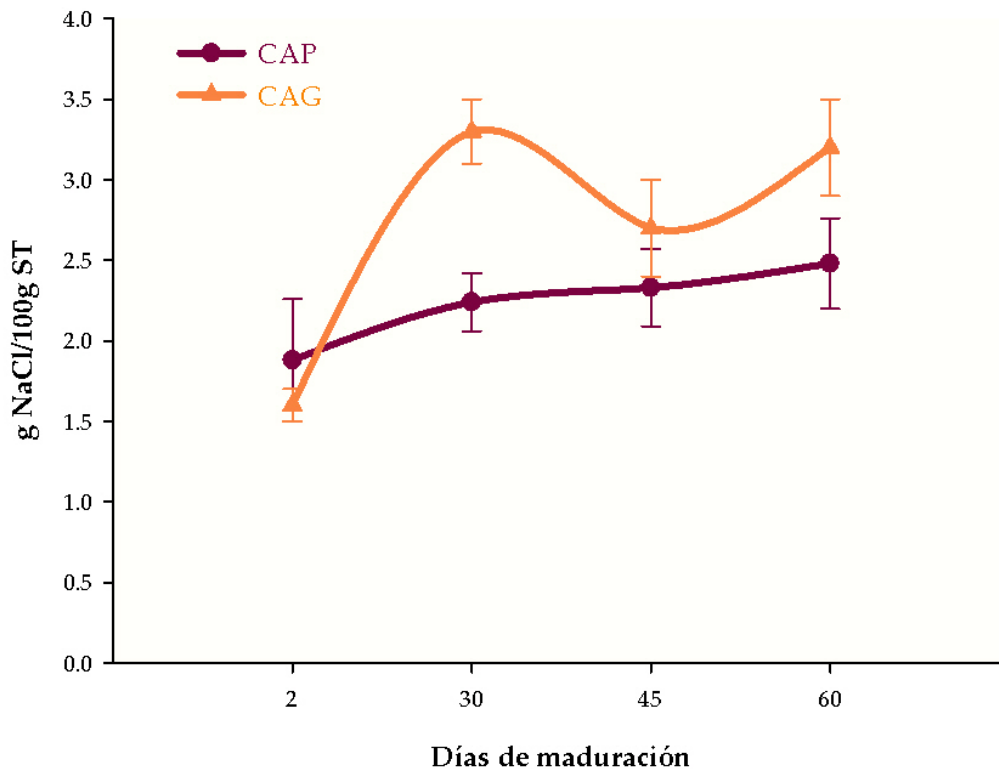


Figura 84. Evolución del NaCl en los quesos grandes (CAG) y pequeños (CAP) a lo largo de la maduración

Los contenidos de sal y agua de los quesos, después de su salado en salmuera, dependen fundamentalmente del contenido en agua inicial, del contenido graso, de la relación entre superficie y masa, de la concentración de salmuera y de la duración del salado (Walstra *et al.*, 2001). En los quesos CAP, la sal penetra con mayor rapidez que en los CAG, observándose a los dos días de maduración valores más altos, debido a que en los quesos con mayor formato la sal necesita más tiempo para difundirse. Así, los menores contenidos en NaCl de los quesos CAP podrían deberse a la limitación de la absorción de sal que se

produce en las superficies curvas, es decir, cerca de los bordes. Cuanta más pequeña es la pieza del queso, más superficie curva presenta y por tanto, más acusado sería este efecto.

Además, la cantidad de agua del queso también influye en la difusión de la sal, estando durante el salado los transportes de sal y agua cuantitativamente relacionados, de manera que cuanto mayor cantidad de agua tiene el queso, mayor cantidad de sal penetra. De hecho, los valores de humedad se correlacionan positivamente con los valores de NaCl, desde los 30 días hasta el final de la maduración.

Por otra parte, parece que los tiempos de salado empleados por la DDOO en la elaboración de los quesos con tamaños diferentes no son equivalentes (los quesos CAG se sumergen en salmuera durante 20h mientras que los CAP permanecen 8h), y provocan contenidos de NaCl superiores en los quesos grandes.

Tan sólo tenemos referencias del efecto del tamaño del queso sobre los parámetros composicionales en el queso Canestrato Pugliese. En este tipo de queso no se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el pH, grasa, proteína y ST de quesos elaborados con dos pesos diferentes (3 y 7 Kg) (Faccia *et al.*, 2003).

4.2.1.2. Valor calórico

En la **Tabla 54** se presentan las medias y las desviaciones estándar del valor calórico (Kilocalorías/100 g de queso), obtenidas para quesos elaborados con diferente tamaño durante la maduración. Los valores de energía expresados como Kcal de ETD y EM se han calculado a partir de la composición química de los quesos, mientras que las de ET se han determinado con la bomba calorimétrica. De igual forma, se muestran los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas realizadas mediante el test LSD.

Tabla 54. Kilocalorías de Energía total (ET), Energía metabolizable (EM) y de energía total determinada con la bomba calorimétrica (ETB)/100g queso de los quesos de tamaño grande y pequeño

	Días de maduración			
	2	30	45	60
CAP				
ET	407 ± 19 ^a	458 ± 18 ^a	470 ± 14 ^a	485 ± 26 ^{ab}
ETD	392 ± 23 ^a	444 ± 25 ^a	458 ± 31 ^b	470 ± 31 ^b
EM	368 ± 12 ^b	412 ± 18 ^b	415 ± 10 ^c	438 ± 21 ^c
CAG				
ET	413 ± 5 ^a	463 ± 6 ^b	453 ± 0,1 ^b	454 ± 2 ^{bc}
ETD	387 ± 1 ^{ab}	427 ± 3 ^b	425 ± 6 ^c	419 ± 0,2 ^{cd}
EM	373 ± 5 ^b	418 ± 5 ^b	404 ± 7 ^d	405 ± 5 ^d

^{a-e} Resultados del Test de Fisher (LSD). Medias del mismo parámetro en la misma fila sin superíndices comunes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

CAG: quesos grandes elaborados con cuajo animal; CAP: quesos pequeños elaborados con cuajo animal.

La **Figura 85** representa la evolución del valor calórico a los 2, 30, 45 y 60 días de su maduración, de los quesos elaborados con cuajo animal y de tamaño grande (CAG).

El tamaño de los quesos influyó de manera significativa ($p < 0,05$) en el contenido calórico de los mismos. Así, la ET se modificó significativamente ($p < 0,05$) en función del tamaño del queso. En los quesos de tamaño grande, tan sólo se detecta un incremento significativo ($p < 0,05$) de los valores de ET durante el primer mes de maduración (una media de 45 Kcal/100g queso), para luego mantenerse constante, alcanzando a los 60 días valores de 454 Kcal de ET/100 g queso. El aumento experimentado es diferente al que se observa en los quesos pequeños, donde se produce de forma paulatina a lo largo de toda la maduración, alcanzándose valores de 484 Kcal de ET/100g queso a los 60 días. Este hecho probablemente es debido a que los ST de los quesos grandes no evolucionan apenas a partir de los 30 días, sobre todo en lo referente a los valores de grasa.

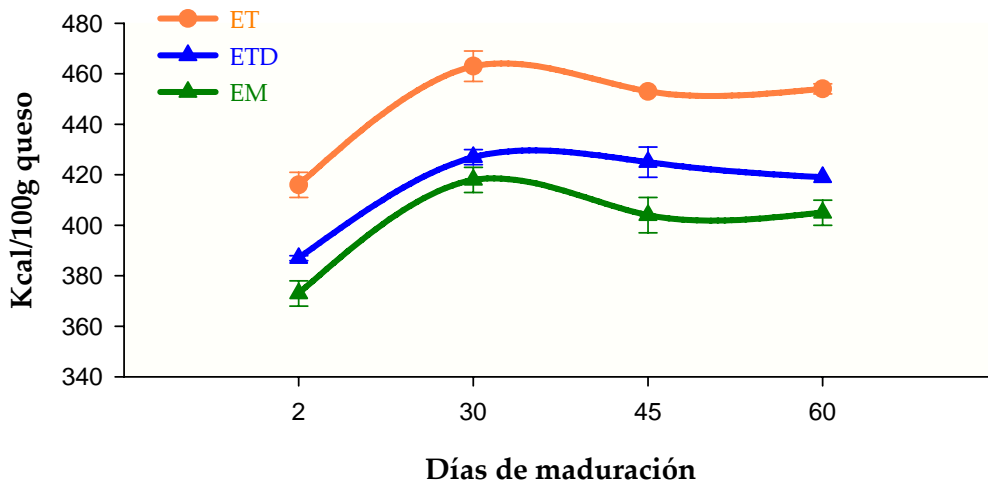


Figura 85. Evolución del contenido calórico (en kilocalorías/100g queso) a lo largo de la maduración de los quesos de tamaño grande (CAG)

ET: energía total, ETD: energía total digerible, EM: energía metabolizable

De la misma forma, el tamaño de los quesos también influyó de forma significativa ($p < 0,05$) sobre la ETD y EM del queso de Murcia al vino, obteniéndose a los 60 días valores de 419 y 470 Kcal y de 405 y 438Kcal, para quesos CAG y CAP, respectivamente. En cualquier caso, los valores observados son inferiores a los detectados para la ET.

Se evidencia que a los 30 días de maduración (fecha en la que habitualmente se realiza la comercialización de los quesos CAP), estos presentan un valor calórico semejante que los de tamaño grande con 45 días.

4.2.1.3. Análisis multivariante

4.2.1.3.a) Análisis de componentes principales

Se ha realizado un análisis de componentes principales (**Tabla 55**) con todos los parámetros composicionales analizados. Se han extraído dos componentes que explican el 84,05% del total de la varianza observada. El componente principal 1 (CP1), que explica un 48,32% del total de la varianza se correlaciona positivamente con ST, cenizas, ácido láctico y sal, variables que se han

incrementado durante la maduración. pH, ST y ácido láctico son las variables que presentan una correlación más alta con el CP1.

El CP2 explica un 35,7 % del total de la varianza, presentando una correlación más alta con las variables que no se modifican durante la maduración (proteínas, grasa y cenizas), seguidas de las variables con valores más elevados en quesos pequeños (sal y ST).

Tabla 55. Análisis de componentes principales de datos de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con dos tamaños, pequeño y grande, a lo largo de la maduración

	Componente principal	
	1	2
pH	-0,888	0,048
ST	0,843	-0,452
Grasa	-0,378	0,838
proteínas	-0,453	-0,843
Cenizas	0,459	0,686
Ácido láctico	0,849	-0,404
NaCl	0,776	0,498

En la **Figura 86**, se representa en el plano las puntuaciones de los dos primeros componentes detectados para los distintos quesos estudiados. Según lo expuesto podemos afirmar que, el primer componente se corresponde con el tiempo de maduración y, las principales diferencias se establecen entre los quesos con 2 días de maduración y el resto.

Como se puede apreciar, el segundo componente diferencia a los quesos de distinto tamaño, fundamentalmente a partir de los 30 días de maduración.

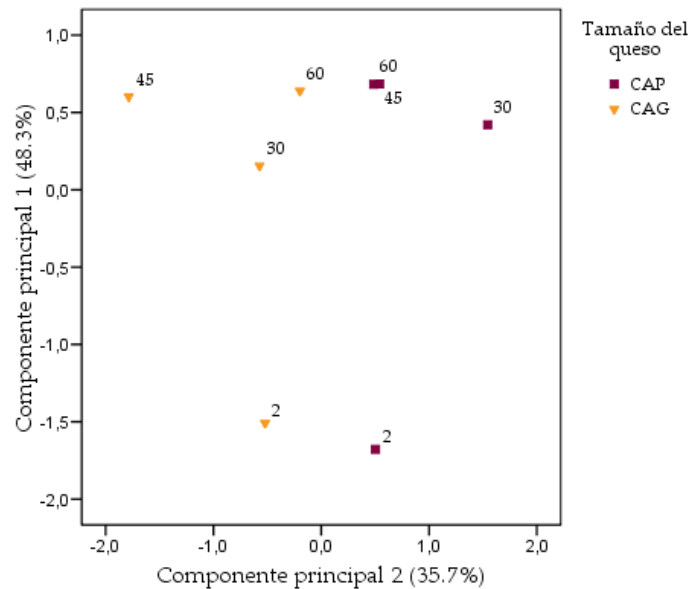


Figura 86. Análisis de componentes principales. Representación en el plano de las puntuaciones obtenidas por regresión para los distintos tipos de queso

4.2.1.3.b) Análisis Discriminante (AD)

Se ha aplicado un AD de exclusión por pasos como en los apartados anteriores. Las variables que más han contribuido a la discriminación de los quesos con distinto tamaño han sido la sal, la AT y el ST.

Con la función de clasificación obtenida tan sólo se han clasificado correctamente el 78% de los quesos, siendo los quesos grandes los peor clasificados con un 68,75%.

4.2.2. Proteolisis

4.2.2.1. Proteolisis primaria, cambios en la fracción insoluble a pH 4,6, PAGE de caseína

En la **Figura 87** se muestra el electroforetograma en Urea-PAGE de las fracciones insolubles a pH 4,6 del queso de Murcia al Vino de tamaño grande y pequeño a lo largo de la maduración.

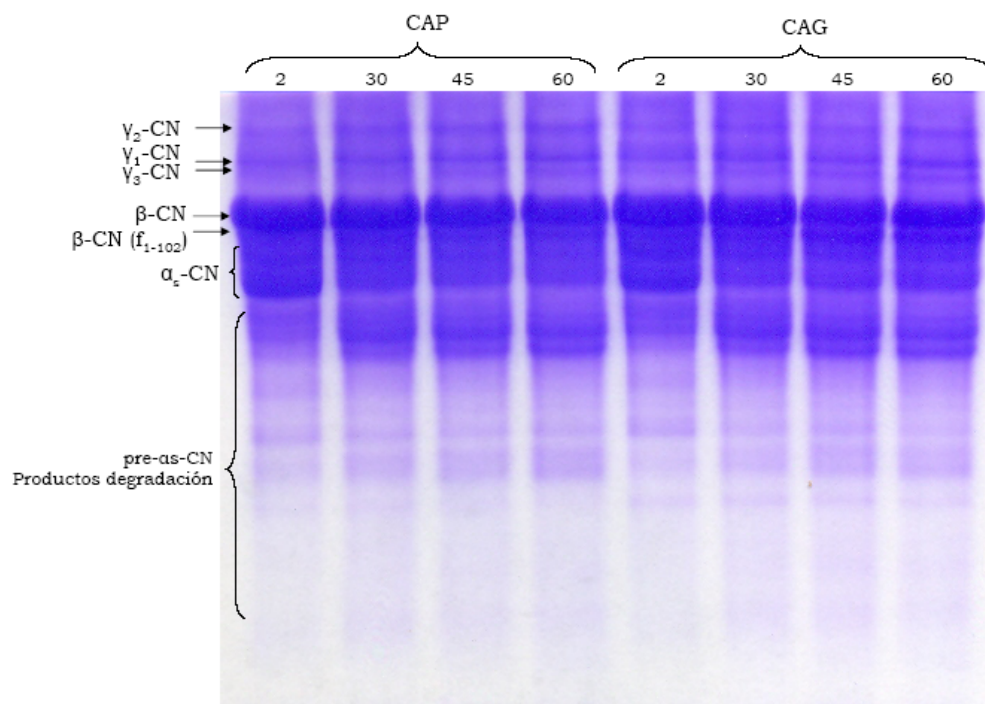


Figura 87. Electroforesis en gel de Urea-poliacrilamida (urea-PAGE) del extracto insoluble en agua de quesos de Murcia al Vino con diferentes tamaños

CAG: quesos grandes elaborados con cuajo animal; CAP: quesos pequeños elaborados con cuajo animal.

Así mismo, en la **Tabla 56** se muestra la evolución, durante la maduración, de las caseínas y de sus productos de degradación, expresados como porcentaje de densidad total óptica, del queso de Murcia al Vino con diferentes tamaños (CAG y CAP).

Tabla 56. Cambios a lo largo de la maduración de las fracciones de caseína de quesos de Murcia al Vino elaborados con distinto tamaño. Valores expresados como porcentaje de densidad óptica total

Tamaño queso	Días de maduración			
	2	30	45	60
CAP				
γ_2 -CN	3,40±0,33 ^a	4,09±0,74 ^a	3,52±0,79 ^a	3,56±0,91 ^a
γ_1 -CN	2,19±0,33 ^a	2,51±0,30 ^a	2,41±0,73 ^a	2,67±1,08 ^a
γ_3 -CN	0,72±0,65 ^a	1,08±0,74 ^a	0,87±0,82 ^a	1,38±0,64 ^a
β -CN	36,70±0,98 ^a	30,20±5,01 ^{ab}	28,99±5,62 ^{ab}	25,01±2,65 ^b
β -CN (f ₁₋₁₉₂)	10,18±1,73 ^a	13,37±2,85 ^a	11,51±3,01 ^a	14,30±6,28 ^a
α -CN	38,3±0,51 ^a	28,74±0,94 ^b	24,72±1,63 ^c	23,55±3,59 ^{cd}
Pre- α -CN	10,40±0,73 ^a	21,88±1,33 ^b	25,77±5,42 ^{bc}	28,07±6,51 ^{cd}
CAG				
γ_2 -CN	3,03±0,63 ^a	3,31±1,11 ^a	2,86±1,06 ^a	3,40±1,89 ^a
γ_1 -CN	2,07±0,57 ^a	2,32±0,63 ^a	2,31±0,58 ^a	3,05±1,47 ^a
γ_3 -CN	0,65±0,47 ^a	1,21±0,73 ^a	1,83±0,77 ^a	1,96±0,81 ^a
β -CN	33,87±3,96 ^{ab}	25,31±6,58 ^b	23,47±3,81 ^c	22,89±1,71 ^c
β -CN (f ₁₋₁₉₂)	11,48±4,67 ^a	12,34±4,86 ^a	13,14±4,60 ^a	11,93±2,98 ^a
α -CN	35,36±1,72 ^a	23,64±3,57 ^{cd}	21,56±0,79 ^{cd}	20,61±0,82 ^c
Pre- α -CN	12,66±1,27 ^a	26,51±4,57 ^c	32,00±3,29 ^d	33,35±0,42 ^d

Resultados del test de Fisher (LSD); medias del mismo parámetro sin letra común (a-e) difieren significativamente ($p < 0,05$)

CAG: quesos grandes elaborados con cuajo animal; CAP: quesos pequeños elaborados con cuajo animal.

Tal y como se puede observar, el tamaño del queso de Murcia al Vino afectó significativamente a las concentraciones de β -CN ($p < 0,05$), de α -CN ($p < 0,01$), y de sus productos de degradación, pre- α_s -CN ($p < 0,01$). Sin embargo, las γ -CN no se modificaron significativamente ($p > 0,05$) por el tamaño del queso.

Tras 30 días de maduración, los quesos grandes presentaron valores de α y β -CN significativamente más bajos ($p < 0,05$) que los pequeños, mientras que la concentración de pre- α_s -CN fue mayor ($p < 0,05$). En este sentido, Santoro y Faccia (1998), en el queso Canestrato Pugliese, también observaron valores de α -CN ligeramente más bajos en quesos de 7 Kg de peso que en quesos de 3 Kg a los 40

días de maduración. No obstante, a partir de los 120 días de maduración ocurría todo lo contrario.

Krause *et al.* (1999) afirman que los quesos con baja humedad presentan una menor proteolisis, debido a que, cuando la cantidad de agua es limitada, esta se usa prioritariamente para la hidratación de las proteínas. Por esta razón, cuando no hay suficiente agua disponible para la hidrólisis de las proteínas, ésta se retarda. Pierre *et al.* (1999), a su vez, detectaron que el porcentaje de agua no disuelta a lo largo de la maduración se incrementaba, y causa un descenso en los valores proteolíticos en los quesos. Por tanto, en quesos CAP, con menores contenidos de agua, la quimosina probablemente muestra una menor actividad proteolítica sobre las α y β -CN, que en los quesos CAG.

4.2.2.2. *Proteolisis secundaria. Cambios en los componentes del nitrógeno*

En la **Tabla 57** se muestran las medias y desviaciones standard de las fracciones nitrogenadas y los componentes nitrogenados calculados después de 2, 30, 45 y 60 días de maduración de quesos de tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP). También se muestran los resultados obtenidos en la comparación múltiple de medias realizada mediante la prueba LSD.

El tamaño de los quesos afectó significativamente al contenido de NS ($p < 0,01$), NC ($p < 0,05$) y Npp ($p < 0,001$).

Los quesos grandes presenta valores de NS superiores a los pequeños durante toda la maduración, aunque no se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$) hasta los 45 días. Santoro y Faccia (1998), en queso Canestrato Pugliese, a los 40 días de maduración, también detectaron valores de NS superiores en quesos de mayor tamaño (7 Kg frente a 3 Kg), aunque después de 120 días observaron todo lo contrario. No obstante, Faccia *et al.* (2003) detectaron, en la misma variedad de queso, valores de NS significativamente mayores ($p > 0,05$) en quesos de menor tamaño.

El Npp también fue mayor en quesos de mayor tamaño durante todo el proceso de maduración, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) ya a los 30 días, lo que hace pensar que la quimosina ofrece una actividad proteolítica más baja en quesos de menor tamaño.

Tabla 57. Efecto del tamaño del queso sobre las fracciones nitrogenadas y los componentes nitrogenados calculados del queso de Murcia al Vino a lo largo de la maduración (valores medios y desviaciones estándar)

Tamaño queso	Días de maduración.			
	2	30	45	60
CAG				
NS ¹	13,3±3,0 ^{ab}	18,1±0,2 ^{bc}	23,0±2,3 ^d	27,3±2,4 ^e
NNP ¹	4,8±1,1 ^{ab}	6,3±0,6 ^{bc}	10,4±0,9 ^{de}	10,7±0,9 ^{de}
NAA ¹	0,1±0,0 ^a	0,5±0,1 ^{bc}	0,5±0,0 ^{bc}	0,8±0,1 ^d
N-NH ₃ ¹	0,5±0,3 ^a	0,7±0,4 ^a	0,5±0,2 ^a	0,8±0,1 ^a
NProteínas ¹	95,2±1,1 ^{ef}	93,7±0,6 ^{de}	89,6±0,9 ^{ab}	89,3±0,9 ^a
NCaseínas ¹	86,7±3,0 ^{cd}	81,9±0,2 ^{bc}	77,0±2,3 ^b	72,7±2,4 ^a
NPolipeptidos ¹	8,5±3,6 ^{ab}	11,8±0,7 ^{bc}	12,6±2,8 ^c	16,7±2,6 ^d
NPeptidos ¹	4,1±1,1 ^{ab}	5,1±0,7 ^{bcd}	9,4±1,1 ^e	8,9±1,1 ^{de}
CAP				
NS ¹	10,6±1,1 ^a	16,5±2,9 ^b	17,7±2,7 ^{bc}	19,04±2,6 ^{cd}
NNP ¹	3,5±0,8 ^a	5,1±0,8 ^{ab}	8,5±1,7 ^{cde}	9,6±1,8 ^{de}
NAA ¹	0,1±0,0 ^a	0,3±0,13 ^b	0,4±0,1 ^{bc}	0,7±0,2 ^d
N-NH ₃ ¹	0,3±0,1 ^a	0,4±0,0 ^a	0,5±0,1 ^a	0,5±0,1 ^a
NProteínas ¹	96,5±0,9 ^f	95,0±0,8 ^{cd}	91,6±1,7 ^{bc}	90,4±1,8 ^{ab}
NCaseínas ¹	89,5±1,1 ^d	88,2±1,2 ^d	82,4±2,7 ^c	81,0±3,5 ^{bc}
NPolipeptidos ¹	7,0±1,6 ^a	6,8±1,8 ^a	9,2±2,9 ^b	9,4±2,6 ^b
NPeptidos ¹	3,08±0,7 ^a	4,31±0,7 ^{abc}	7,50±1,6 ^{cde}	8,40±1,6 ^{de}

¹Expresados como gramos por 100 g de Nitrógeno Total.

^{a-e} Resultados del test de Fisher (LSD). Medias del mismo parámetro en la misma línea sin una letra común difieren significativamente ($p < 0,05$).

CAG: quesos grandes elaborados con cuajo animal; CAP: quesos pequeños elaborados con cuajo animal.

Sin embargo, el tamaño de los quesos no afectó significativamente ($p > 0,05$) al NNP, NAA, N-NH₃, NP y Np, lo que sugiere que la actividad proteolítica microbiana no se modifica por el tamaño del queso.

4.2.2.2.a) Análisis multivariante

Análisis de componentes principales

En la **Tabla 58** se muestran los resultados obtenidos para el análisis de componentes principales de las fracciones nitrogenadas. El CP1 (que explica el 84,15% del total de la varianza), se relaciona de manera negativa con la α -CN y la β -CN, y positivamente con el resto de las variables. pre- α -CN, β -CN y NS son las variables que presentan una correlación más alta con el CP1.

El CP2, explica el 6,96% del total de la varianza, presentando unas correlaciones muy bajas con las variables estudiadas.

Tabla 58. Análisis de componentes principales de datos de las fracciones nitrogenadas de muestras de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con dos tamaños, pequeño y grande

	Componente principal	
	1	2
NAA	0,946	0,095
NS	0,968	-0,11
NNP	0,917	0,080
N-NH ₃	0,777	-0,543
γ -CN	0,794	0,463
β -CN	-0,972	0,163
α -CN	-0,963	-0,03
Pre- α -CN	0,977	0,064

En la **Figura 88** se representan los quesos en un plano definido por los dos componentes principales extraídos. Se observa que el CP1 agrupa a los quesos en función del tiempo de maduración, observándose en el hemisferio negativo, los quesos con 2 días y en el positivo, los de mayor tiempo de maduración. Los quesos CAG y CAP aparecen en dos grupos, más o menos definidos por el CP2.

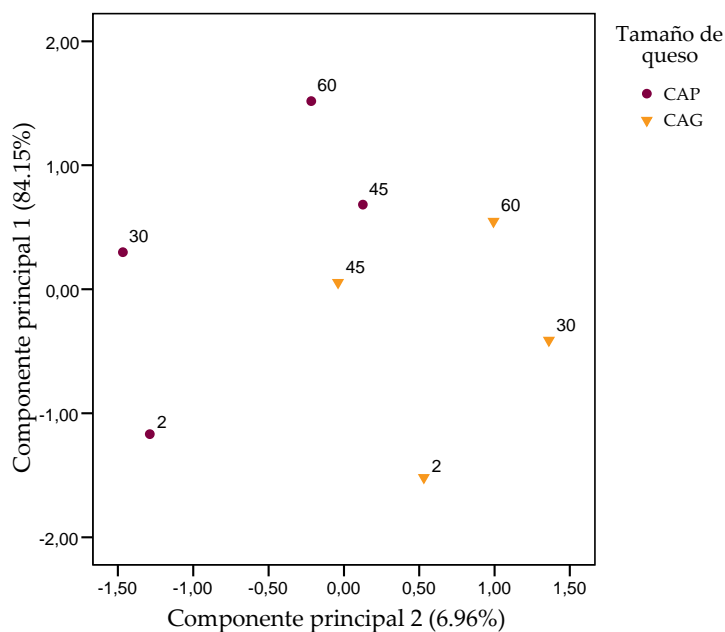


Figura 88. Representación en un plano definido por los dos componentes principales de las fracciones nitrogenadas de los quesos de Murcia al Vino con dos tamaños

4.2.2.3. Cambios en los péptidos hidrófobos e hidrófilos

La **Tabla 59** muestra las medias y desviaciones estándar de los péptidos hidrófilos (HI) e hidrófobos (HO) durante la maduración para las muestras de queso de Murcia al Vino de dos tamaños diferentes, CAG y CAP. También se incluyen los resultados del análisis múltiple de medias realizado con el test LSD.

En la **Figura 89** se representan los cromatogramas obtenidos para los quesos CAG a los 2, 30, 45 y 60 días de la maduración.

El tamaño del queso no afectó de manera significativa ($p > 0,05$) al contenido de péptidos totales, HO e HI, ni a la relación HO/HI.

Al igual que ocurría con los quesos CAP, la cantidad de los péptidos, tanto HI como HO, aumentaron significativamente ($p < 0,001$) durante la maduración, siendo también más acusado este incremento en los HO (alrededor del 57%).

Tabla 59. Evolución de los péptidos hidrófobos (HO) e hidrófilos (HI) (valores medios y desviaciones estándar) durante la maduración de quesos de Murcia al Vino de tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP)

Tamaño queso	Días de maduración.			
	2	30	45	60
CAG				
HO ¹	66,5 ± 2,9 ^a	137,7 ± 13,6 ^b	182,5 ± 36,0 ^{bc}	191,0 ± 30,4 ^c
HI ¹	17,3 ± 1,5 ^a	53,2 ± 11,5 ^{bc}	58,6 ± 16,7 ^c	64,6 ± 25,4 ^c
HO/HI ¹	3,9 ± 0,4 ^a	2,7 ± 0,9 ^a	3,3 ± 1,3 ^a	3,2 ± 1,1 ^a
TOTAL	83,8	190,9	241,1	255,6
% HO	79,4	72,1	75,7	74,7
% HI	20,6	27,9	24,3	25,3
CAP				
HO ¹	69,7 ± 3,6 ^a	154,7 ± 17,8 ^{ab}	171,1 ± 35,2 ^b	192,5 ± 44,5 ^b
HI ¹	27,2 ± 11,4 ^a	44,8 ± 18,4 ^b	59,0 ± 14,8 ^c	64,9 ± 14,1 ^c
HO/HI ¹	2,6 ± 1,0 ^a	3,5 ± 2,5 ^{ab}	2,9 ± 1,6 ^a	3,0 ± 1,2 ^a
TOTAL	97	199,4	230,1	257,4
% HO	72,6	77,6	73,9	74,2
% HI	27,4	22,4	26,1	25,8

¹ Resultado expresados como unidades de área de cromatograma por gramo de queso seco.

^{a-c} Resultados del test de Fisher (LSD). Medias del mismo parámetro en la misma línea sin letra común difieren significativamente ($p < 0,05$).

CAG: queso grande elaborado con cuajo animal; CAP: queso pequeño elaborado con cuajo animal.

A pesar de no detectarse diferencias significativas se observa una evolución diferente en los péptidos HI y HO, fundamentalmente durante los primeros 30 días de maduración. Esta producción de péptidos HI, (que como ya se ha dicho con anterioridad se corresponde con la degradación de las α -CN), va a ser mayor, por la mayor degradación que experimentan las α -CN a los 30 días (que es del 81,5% y de 64,8% para los quesos CAG y CAP, respectivamente); lo que evidencia la mayor actividad proteolítica de la quimosina durante estos primeros días de la maduración.

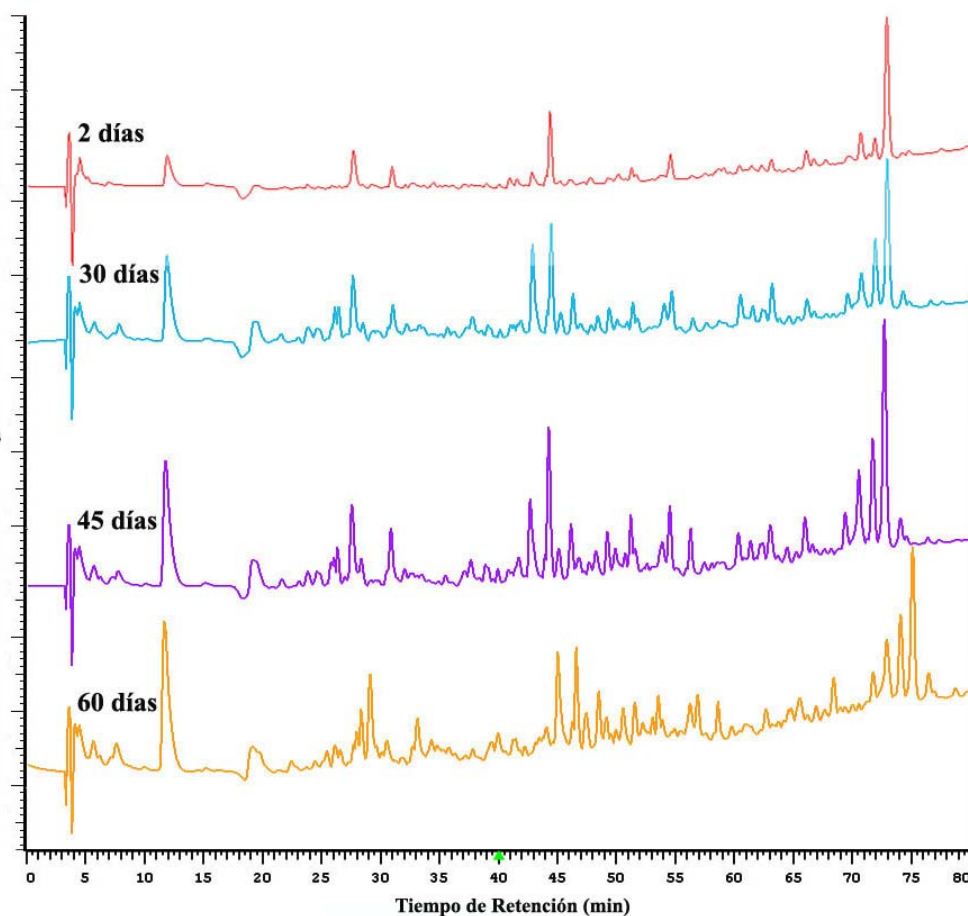


Figura 89. Cromatogramas RP-HPLC de la fracción NS de las muestras de quesos de Murcia al Vino de tamaño grande (CAG) a los 2, 30, 45 y 60 días de maduración. Detección a 214 nm

4.2.2.4 .Cambios en el contenido en aminoácidos libres

En la **Figura 90.a)** y **90.b)** se muestran los cromatogramas típicos de aminoácidos de queso de Murcia al Vino con tamaño grande (CAP) y pequeño (CAG)

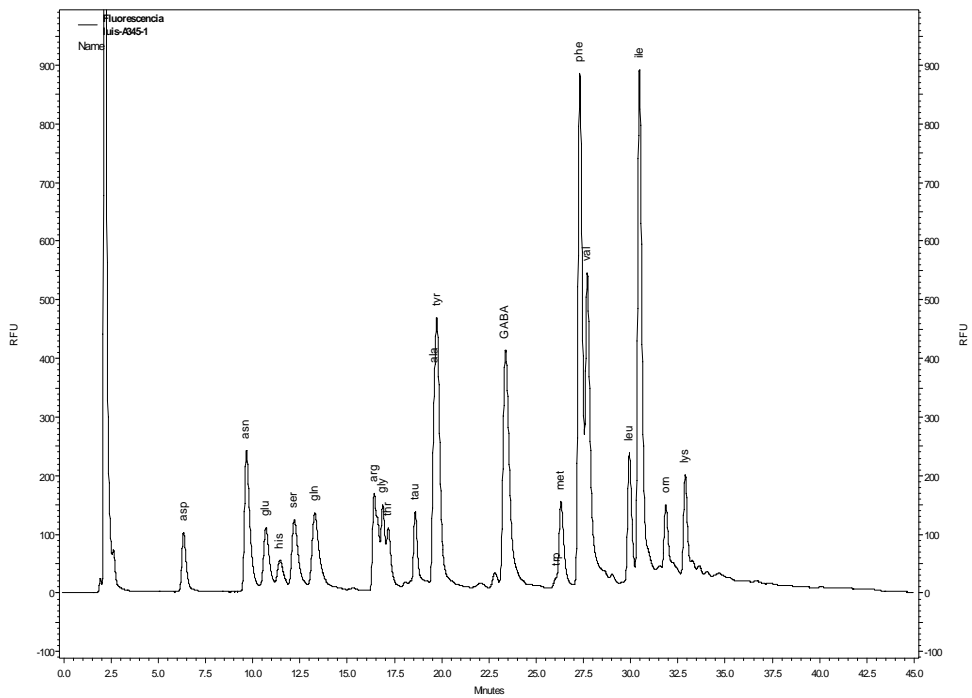


Figura 90.a) Cromatograma RP-HPLC de los aminoácidos libres del queso de Murcia al Vino de tamaño pequeño (CAP)

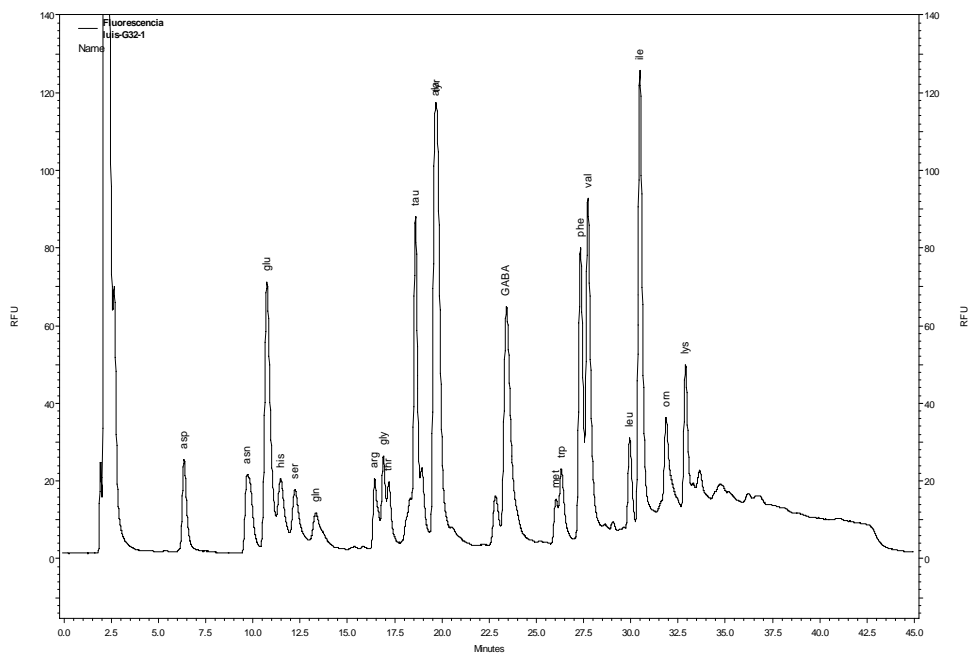


Figura 90.b) Cromatograma RP-HPLC de los aminoácidos libres del queso de Murcia al Vino de tamaño grande (CAG)

En la **Figura 91** y **Tabla 60**, se presenta la evolución de los aminoácidos totales (AAT) (en mg AAT/100g de ST) del queso de Murcia al Vino elaborado con dos tamaños, grande (CAG) y pequeño (CAP), durante su maduración.

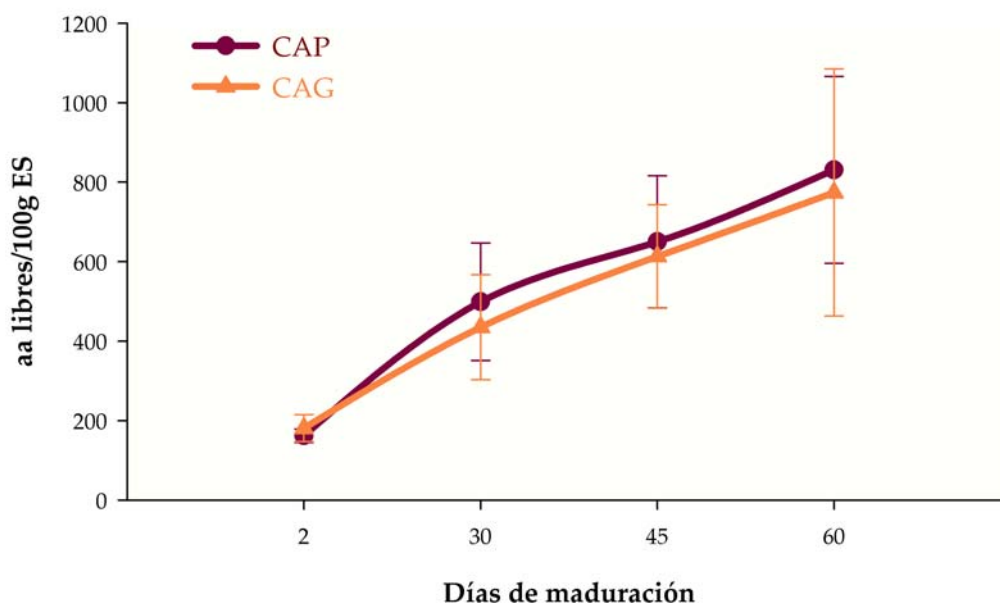


Figura 91. Evolución de los aminoácidos totales (mg AAT/100g ST) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino con dos tamaños (CAG) y (CAP)

El tamaño de los quesos no influyó significativamente ($p > 0,05$) en el contenido de AAT, en consonancia con los resultados obtenidos en el análisis de la fracción de nitrógeno aminoacídico.

Al igual que en los quesos CAP, el tiempo de maduración afectó significativamente ($p < 0,05$) al contenido de AAT de los quesos CAG, que aumentó significativamente, alcanzando los 774 mg de AAT/100g ES a los 60 días.

En la **Figura 92.a)** y **92.b)**, y en la **Tabla 60**, se presentan los valores de los aminoácidos libres (AAL) durante la maduración para quesos CAG y CAP, respectivamente. La concentración de todos los AAL, a excepción de Glu y Trp, se incrementó significativamente ($p < 0,05$) durante la maduración. De hecho, se ha establecido una alta correlación positiva entre el tiempo de maduración y la mayoría de los aminoácidos en los dos tipos de queso (**Tabla 61**).

Tabla 59. Evolución en el contenido de aminoácidos libres (medias y desviaciones estándar) en quesos de Murcia al Vino elaborados con CA y con dos tamaños diferentes, pequeño (CAP) y grande (CAG) a lo largo de la maduración.

aminoácidos	Días de maduración															
	2				30				45				60			
	Tipo de coagulante		CAP	CAG	Tipo de coagulante		CAP	CAG	Tipo de coagulante		CAP	CAG	Tipo de coagulante		CAP	CAG
ASP	3,38±0,08 ^a	4,49±0,22 ^a	7,97±2,13 ^a	8,23±3,46 ^a	10,16±5,53 ^{ab}	9,22±1,83 ^{ab}	13,10±3,50 ^b	13,09±2,30 ^b	4,86±2,16 ^a	8,22±1,20 ^a	17,99±6,94 ^{ab}	25,13±5,78 ^b	24,35±8,23 ^b	28,50±8,84 ^{bc}	32,08±7,30 ^c	34,66±7,10 ^c
ASN	7,76±2,20 ^a	12,33±2,22 ^a	11,99±4,20 ^a	18,40±3,51 ^a	13,19±3,20 ^a	14,81±2,63 ^a	13,93±3,13 ^a	16,61±2,85 ^a	7,75±1,17 ^a	9,26±1,42 ^{ab}	12,47±2,62 ^b	10,41±5,10 ^{ab}	15,41±3,52 ^c	9,16±2,21 ^{ab}	18,52±5,54 ^c	12,85±4,30 ^b
GLU	4,29±0,35 ^a	3,63±0,28 ^a	11,65±4,37 ^b	10,45±3,60 ^b	16,39±4,72 ^{bc}	13,36±2,29 ^b	21,33±8,20 ^c	17,41±4,10 ^{bc}	4,05±0,88 ^a	2,21±0,49 ^a	12,36±2,90 ^b	11,12±3,60 ^b	16,35±2,12 ^{bc}	16,35±2,12 ^{bc}	20,85±8,60 ^c	20,25±3,60 ^c
SER	5,36±1,16 ^a	6,52±1,07 ^a	26,69±5,00 ^c	16,81±5,30 ^{ab}	36,60±6,20 ^{de}	28,04±8,40 ^c	49,13±6,90 ^e	34,03±8,30 ^{de}	3,83±1,80 ^a	3,76±1,30 ^a	11,91±5,30 ^{ab}	10,18±5,40 ^{ab}	17,46±5,60 ^{bc}	12,34±6,86 ^{ab}	22,73±5,60 ^c	19,84±5,50 ^c
ARG	2,80±0,34 ^a	2,44±0,35 ^a	8,79±2,19 ^{ab}	5,57±0,90 ^a	11,12±0,78 ^{bc}	9,64±0,72 ^b	14,33±4,21 ^c	11,77±2,50 ^{bc}	2,80±0,34 ^a	2,44±0,35 ^a	8,79±2,19 ^{ab}	5,57±0,90 ^a	11,12±0,78 ^{bc}	9,64±0,72 ^b	14,33±4,21 ^c	11,77±2,50 ^{bc}
GLY	9,12±2,56 ^{ab}	7,64±2,67 ^a	11,81±2,81 ^{ab}	5,59±2,96 ^a	13,24±3,04 ^b	14,80±3,60 ^b	13,69±1,92 ^b	16,42±2,30 ^b	9,12±2,56 ^{ab}	7,64±2,67 ^a	11,81±2,81 ^{ab}	5,59±2,96 ^a	13,24±3,04 ^b	14,80±3,60 ^b	13,69±1,92 ^b	16,42±2,30 ^b
THR	18,13±5,92 ^a	20,83±8,90 ^a	40,32±12,30 ^b	41,85±19,10 ^b	49,90±13,50 ^c	50,80±14,20 ^c	73,18±12,33 ^d	74,08±15,60 ^d	11,63±1,83 ^a	10,19±1,93 ^a	23,59±8,60 ^{bc}	15,97±5,60 ^{ab}	29,41±6,30 ^{bc}	17,84±5,73 ^b	35,06±9,30 ^c	22,15±3,50 ^{bc}
ALA	9,62±1,65 ^a	11,81±2,30 ^a	25,12±5,80 ^b	17,36±5,98 ^{ab}	40,89±13,18 ^{bc}	53,32±11,42 ^c	52,95±12,60 ^c	67,07±9,02 ^d	9,62±1,65 ^a	11,81±2,30 ^a	25,12±5,80 ^b	17,36±5,98 ^{ab}	40,89±13,18 ^{bc}	53,32±11,42 ^c	52,95±12,60 ^c	67,07±9,02 ^d
TYR	4,20±0,87 ^a	5,34±1,09 ^a	7,66±1,98 ^a	6,75±2,37 ^a	8,53±2,90 ^a	7,21±2,75 ^a	11,41±2,33 ^a	7,67±3,11 ^a	4,20±0,87 ^a	5,34±1,09 ^a	7,66±1,98 ^a	6,75±2,37 ^a	8,53±2,90 ^a	7,21±2,75 ^a	11,41±2,33 ^a	7,67±3,11 ^a
GABA	4,07±0,88 ^a	2,35±0,91 ^a	12,87±3,60 ^b	7,93±2,85 ^a	15,73±3,50 ^{bc}	12,20±3,11 ^b	20,58±7,36 ^c	15,07±5,56 ^b	4,07±0,88 ^a	2,35±0,91 ^a	12,87±3,60 ^b	7,93±2,85 ^a	15,73±3,50 ^{bc}	12,20±3,11 ^b	20,58±7,36 ^c	15,07±5,56 ^b
TRP	5,87±0,64 ^a	9,72±1,93 ^a	31,14±13,90 ^c	35,49±9,88 ^c	42,62±16,69 ^c	61,57±7,70 ^e	54,79±18,18 ^d	64,50±13,86 ^e	5,87±0,64 ^a	9,72±1,93 ^a	31,14±13,90 ^c	35,49±9,88 ^c	42,62±16,69 ^c	61,57±7,70 ^e	54,79±18,18 ^d	64,50±13,86 ^e
MET	12,49±0,72 ^a	16,81±1,82 ^a	54,61±17,01 ^c	45,05±15,25 ^c	65,97±19,58 ^d	70,97±13,42 ^d	81,82±25,11 ^e	78,37±25,37 ^e	12,49±0,72 ^a	16,81±1,82 ^a	54,61±17,01 ^c	45,05±15,25 ^c	65,97±19,58 ^d	70,97±13,42 ^d	81,82±25,11 ^e	78,37±25,37 ^e
PHE	5,02±1,50 ^a	4,43±0,86 ^a	16,16±4,95 ^b	14,33±7,37 ^b	20,97±8,49 ^c	23,20±1,64 ^c	27,57±9,40 ^d	29,47±8,37 ^d	5,02±1,50 ^a	4,43±0,86 ^a	16,16±4,95 ^b	14,33±7,37 ^b	20,97±8,49 ^c	23,20±1,64 ^c	27,57±9,40 ^d	29,47±8,37 ^d
VAL	11,90±1,85 ^a	12,74±3,40 ^a	56,96±11,12 ^c	48,68±20,37 ^{cd}	71,05±20,98 ^{cd}	82,91±18,61 ^d	87,58±28,03 ^e	95,64±35,17 ^e	11,90±1,85 ^a	12,74±3,40 ^a	56,96±11,12 ^c	48,68±20,37 ^{cd}	71,05±20,98 ^{cd}	82,91±18,61 ^d	87,58±28,03 ^e	95,64±35,17 ^e
ILE	7,52±3,22 ^a	13,32±3,77 ^{ab}	13,47±6,90 ^{ab}	28,25±6,28 ^{bc}	23,18±5,21 ^b	31,94±11,96 ^{bc}	37,05±8,24 ^c	32,91±11,44 ^{bc}	7,52±3,22 ^a	13,32±3,77 ^{ab}	13,47±6,90 ^{ab}	28,25±6,28 ^{bc}	23,18±5,21 ^b	31,94±11,96 ^{bc}	37,05±8,24 ^c	32,91±11,44 ^{bc}
ORN	10,55±5,17 ^a	10,55±3,83 ^a	23,55±5,57 ^b	18,44±9,52 ^b	31,36±15,34 ^{bc}	26,51±9,25 ^b	32,93±12,25 ^{bc}	43,03±19,00 ^c	10,55±5,17 ^a	10,55±3,83 ^a	23,55±5,57 ^b	18,44±9,52 ^b	31,36±15,34 ^{bc}	26,51±9,25 ^b	32,93±12,25 ^{bc}	43,03±19,00 ^c
LYS	162,12±17,10	181,15±34,90	499,78±148,00	435,06±132,43	650,78±166,00	613,62±130,43	831,59±235,90	774,54±311,49	162,12±17,10	181,15±34,90	499,78±148,00	435,06±132,43	650,78±166,00	613,62±130,43	831,59±235,90	774,54±311,49
TOTAL																

Resultado del test de Fisher's (LSD); medias del mismo parámetro en la misma línea sin superíndices comunes (a-e) son estadísticamente diferentes (p< 0,05).

CAP: quesos elaborados con cuajo animal y tamaño pequeño; CAG: quesos elaborados con cuajo animal y tamaño grande.

Tabla 60. Evolución de los aminoácidos libres totales del queso de Murcia al Vino elaborado con coagulante animal y con dos tamaños

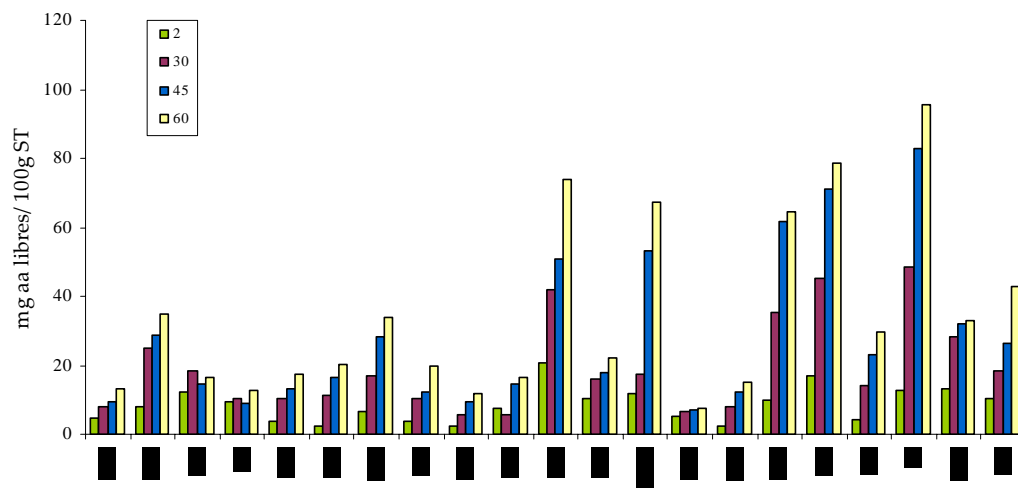


Figura 92.a) Evolución de los aminoácidos libres individuales (mg AAL/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino con tamaño grande (CAG)

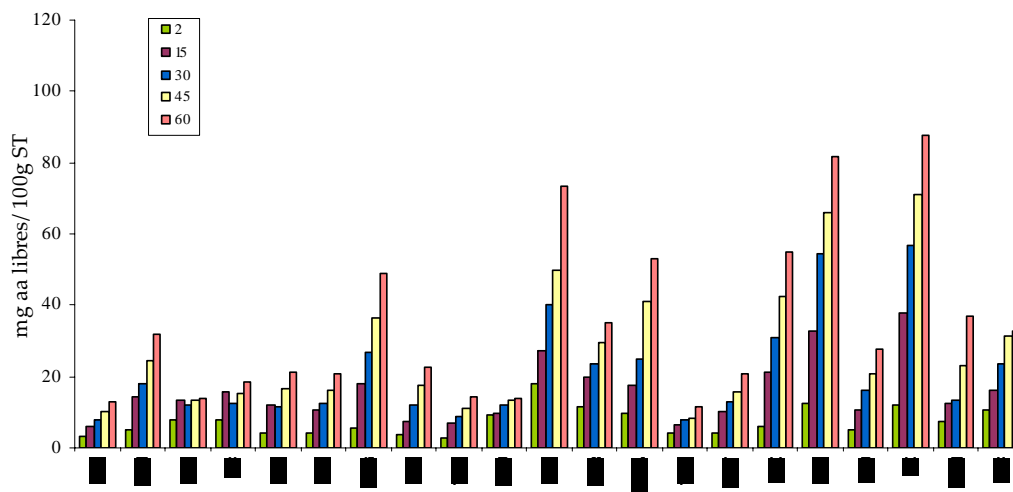


Figura 92.b) Evolución de los aminoácidos libres individuales (mg AAL/100g ES) durante la maduración de los quesos de Murcia al Vino con tamaño pequeño (CAP)

Los quesos CAG presentan, por regla general, correlaciones inferiores a las presentadas por los quesos CAP, siendo en todos casos correlaciones significativas, salvo para Glu, His, Tau y Tyr. La correlación más elevada entre AAL de quesos CAG y tiempo de maduración se observó en Gly, Asp y Asn.

Los AAL más abundantes en los quesos grandes fueron Ile, Val, Ala, Gaba, Phe y Lys, que representaron el 54,58% del total de los AAL a los 60 días de maduración, coincidiendo con los encontrados en los quesos CAP.

Tabla 61. Niveles de significación ANOVA y coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de aminoácidos libres, el tiempo de maduración y el tamaño del queso

aminoácidos	ANOVA		Correlación de Pearson	
	Tiempo maduración	Tamaño queso	CAP	CAG
Asp	**	ns	0,996**	0,970**
Asn	***	ns	0,990**	0,970**
Glu	ns	ns	0,753	0,712
His	***	*	0,804	0,165
Ser	***	ns	0,962**	0,954*
Gln	***	ns	0,986**	0,949*
Arg	***	*	0,997**	0,917*
Gly	**	ns	0,998**	0,994**
Thr	***	*	0,989**	0,939*
Tau	***	ns	0,976**	0,787
Ala	**	ns	0,985**	0,958*
Tyr	**	ns	0,993**	0,836
GABA	***	*	0,992**	0,902*
Trp	ns	ns	0,980**	0,956*
Met	*	*	0,987**	0,893*
Phe	**	*	0,995**	0,926*
Val	**	ns	0,991**	0,929*
Leu	***	ns	0,999**	0,961**
Ile	**	*	0,989**	0,934*
Orn	**	ns	0,948**	0,917*
Lys	***	ns	0,984**	0,951**
TOTAL	**	ns	0,997**	0,970**

ANOVA: ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, ns: no significación

Coefficiente de Pearson: ** correlación significativa 0,01 (unilateral), * correlación significativa 0,05 (unilateral).

Al estudiar la influencia del tamaño de los quesos sobre el contenido en aminoácidos se observa que se establecieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los AAL His, Arg, Gaba, Met, Phe e Ile. De esta manera, en los quesos grandes se establecieron valores de Ile, Phe y Gaba significativamente superiores ($p < 0,05$), mientras que los valores de His, Arg y Met fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) con respecto a los quesos pequeños.

De manera cuantitativa, tal y como se ha visto anteriormente, el tamaño de los quesos no influye en el contenido de péptidos ni AAT, dependientes fundamentalmente de la actividad proteolítica bacteriana. No obstante, cualitativamente los productos obtenidos (péptidos, polipéptidos) pueden haber sido distintos en cada tipo de queso, lo que ha podido provocar algunas diferencias en la formación de AAL, apareciendo como se ha visto variaciones en su concentración.

Las diferencias observadas en el contenido de AAL podrían ser la causa de ciertas diferencias significativas que aparecen en algunas características sensoriales de los quesos grandes como veremos posteriormente.

4.2.2.4.a) Análisis multivariante

Análisis Discriminante

- Aplicación con relación al tiempo de maduración

Para simplificar las funciones de clasificación se seleccionaron aquellos AAL que presentaron mayor valor F y, por tanto, mayor capacidad de diferenciar los grupos. Se utilizó el método de inclusión por pasos, fijándose como número máximo de pasos 100 y una F de entrada y de salida igual a 1.

De esta forma, al aplicar el AD y el método de inclusión por pasos en función del tiempo de maduración se seleccionaron 17 AAL (**Tabla 62**). Los AAL que presentaron mayor capacidad discriminante fueron Gaba, Orn y Ser con valores de F y de Lambda de Wilks de 25,39, 15,83 y 14,86 y de 0,05, 0,08 y 0,08, respectivamente.

Tabla 62. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tiempo de maduración

	Gaba	Orn	Trp	Phe	His	Asp	Thr	Arg	Tyr
Lambda de Wilks	0,05	0,08	0,26	0,37	0,21	0,08	0,24	0,31	0,33
Valor F	25,39	15,83	3,83	2,25	4,87	14,82	4,34	3,00	2,65
	Ser	Lys	Ala	Asn	Ile	Met	Tau	Val	
Lambda de Wilks	0,08	0,12	0,13	0,09	0,27	0,25	0,38	0,14	
Valor F	14,86	10,22	9,22	13,83	3,52	3,96	2,19	7,91	

Al observar las distancias establecidas entre los diferentes periodos de maduración, vemos que las menores diferencias se establecieron entre los quesos con 45 y 60 días, mientras que las mayores, tal y como era de esperar lo hicieron entre los 2 y 60 días (**Tabla 63**).

Tabla 63. Distancias entre grupos. Distancias de los cuadrados de Mahalanobis

	2	30	45	60
2	0,0	977,7	1913,8	3037,1
30	977,7	0,0	811,3	1951,8
45	1913,8	811,3	0,0	263,2
60	3037,1	1951,8	263,2	0,0

A partir de las funciones de clasificación, se obtuvo la matriz de clasificación (**Tabla 64**) en la que aparecen todos los quesos correctamente clasificados.

Tabla 64. Factor variedad y tipo. Matriz de clasificación. Número de quesos correctamente clasificados mediante las funciones de clasificación

	Correcto (%)	2	30	45	60
2	100	6	0	0	0
30	100	0	6	0	0
45	100	0	0	6	0
60	100	0	0	0	6
Total correcto	100	6	6	6	6

En la **Figura 93** mediante las dos primeras funciones canónicas se representa en un diagrama de dispersión los quesos con 2, 30, 45 y 60 días de maduración.

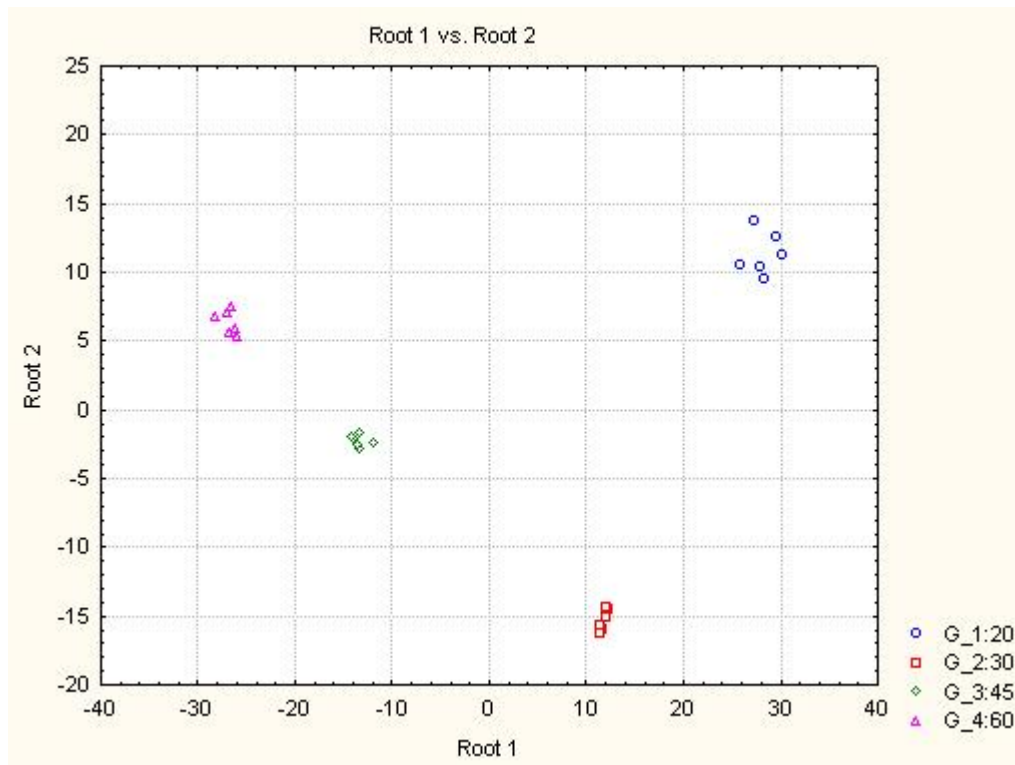


Figura 93. Diagrama de dispersión. Representación de los quesos en función del tiempo de maduración mediante las funciones canónicas FC1 y FC2

- Aplicación con relación al tamaño del queso

En la **Tabla 65** se muestran los valores de Lambda de Wilks y F de los AAL determinados en relación al tamaño del queso. Los AAL con mayor capacidad discriminante son Tyr y Glu con valores de 0,35 y 0,28 para la Lambda de Wilks y de 27,84 y 38,41 para el valor F, respectivamente. Por el contrario, Met es el AAL con menor capacidad de discriminación, presentando los valores de F más próximos a la unidad (0,88).

Tabla 65. Factores de variedad y tipo. Parámetros estadísticos obtenidos en el proceso de selección de variables. Tamaño del queso

	Arg	Asp	Trp	Tyr	Glu	Ser	Met	Thr
Lambda De Wilks	0,62	0,42	0,79	0,35	0,28	0,76	0,88	0,78
Valor F	9,06	21,08	4,09	27,84	38,41	4,64	2,14	4,20

Con la matriz de clasificación obtenida con las funciones de clasificación se observó que el contenido en AAL discriminó a los quesos de distinto tamaño de manera satisfactoria, ya que la totalidad de ellos se clasificaron correctamente.

Análisis de componentes principales (ACP)

Se ha aplicado el ACP a los datos de AAL para establecer la relación entre las variables y detectar las principales causas de variabilidad. Se han extraído dos componentes principales que explican 92,3 % del total de la varianza (**Tabla 66**)

El CP1 explica el 84,0% de la varianza total, y presenta unas correlaciones positivas muy elevadas con la mayoría de AAL, observándose los valores más altos para Gln (0,991), Val y Leu (0,986) y los más bajos para Glu (0,582) y His (0,605). El CP2 explica tan sólo el 8,3% de la varianza total, estando poco correlacionado con los AAL. Se correlaciona positivamente con la His, Tyr, Trp, Met, Arg, Ser, Thr y Gly.

En la **Figura 94** se representa a los quesos en el plano definido por el CP1 y CP2. Se observa que el CP1 separa a los quesos en función de su tiempo de maduración. De esta manera, los quesos con 45 y 60 días de maduración, con mayores contenidos en AAL, se sitúan en el hemisferio positivo y los quesos con menor concentración (2 y 15 días) en el negativo, quedando los quesos con 30 días con valores intermedios en el centro. Por tanto, se puede afirmar que el CP1 está asociado al tiempo de maduración, explicando el 84,0% de la varianza.

Tabla 66. Análisis de componentes principales de datos del contenido de los aminoácidos de queso de Murcia al Vino elaborados con CA y con CV a lo largo de la maduración

Aa libres	CP1	CP2
Asp	0,98	-0,09
Asn	0,95	-0,27
Glu	0,58	-0,52
His	0,61	0,71
Ser	0,98	0,17
Gln	0,99	-0,02
Arg	0,97	0,24
Gly	0,98	0,07
Thr	0,98	0,16
Tau	0,80	-0,10
Ala	0,97	-0,09
Tyr	0,85	0,51
GABA	0,93	-0,24
Trp	0,90	0,33
Met	0,95	0,29
Phe	0,94	-0,31
Val	0,99	-0,08
Leu	0,99	-0,14
Ile	0,98	-0,15
Orn	0,87	-0,31
Lys	0,95	-0,11

De igual forma, podemos observar que el CP2 nos diferencia claramente a los quesos elaborados con tamaños diferentes, representando a la mayoría de los quesos CAP en la parte positiva y a los CAG en la negativa. Por tanto, podemos afirmar que el CP2 está asociado a la variable tamaño del queso, y explica el 8,3% de la varianza.

Aunque se establecen diferencias sólo en algunos AAL, han sido suficientes para diferenciar entre quesos con diferente tamaño mediante el análisis multivariante (AD y ACP).

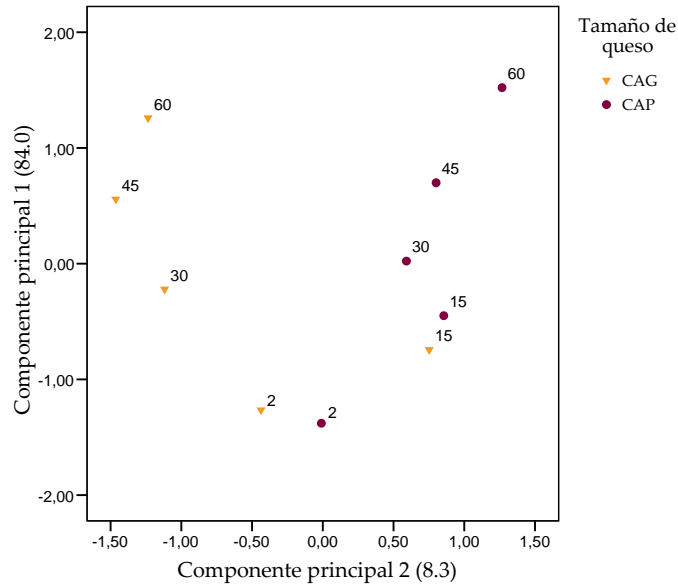


Figura 94. Representación en un plano definido por los dos componentes principales de los aa de los quesos de Murcia al Vino con dos tamaños

4.2.3. Microbiología

En la **Tabla 67** se presentan los recuentos de microorganismos (expresados como log ufc/g) de quesos de Murcia al Vino elaborados con dos tamaños diferentes (CAP y CAG). Así mismo, se muestran los resultados de la comparación múltiple de medias individualizadas, realizadas mediante el test LSD.

Se observa, que en los medios de cultivo MSE, petrifilm para *Coliformes* y petrifilm para *Levaduras*, o bien no se ha detectado crecimiento, o éste no ha superado los límites inferiores de contaje; confirmando el efecto de la pasteurización que ha sufrido la leche y de unas buenas prácticas de higiene durante la elaboración del queso.

Tabla 67. Recuento de bacterias ufc/g queso presentes en el queso de Murcia al Vino, con dos tamaños (CAP) y (CAG), a lo largo de su maduración. Valores medios y desviaciones estándar

	Días de maduración			
	2	30	45	60
CAP				
PCA ¹	8,14±0,42 ^a	8,79±0,52 ^a	8,10±0,43 ^a	8,19±0,53 ^a
M ₁₇	8,26±0,68 ^{abc}	8,86±0,21 ^c	8,85±0,65 ^c	8,96±0,22 ^c
KF ³	7,25±0,46 ^{abc}	7,53±0,62 ^b	6,64±0,60 ^a	6,96±1,40 ^a
RA ⁴	8,03±0,33 ^b	6,53±1,44 ^a	8,46±0,82 ^{bc}	9,49±0,86 ^c
MSE ²	ND	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Coliformes</i>	ND	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Levaduras</i>	ND	ND	ND	ND
CAG				
PCA ¹	8,70±0,34 ^a	7,45±0,65 ^a	9,01±0,59 ^a	7,56±0,17 ^a
M ₁₇	8,13±1,24 ^{abc}	7,55±0,50 ^a	8,70±0,02 ^{bc}	8,47±0,98 ^{ab}
KF ³	7,74±0,36 ^{abc}	6,64±0,47 ^a	5,94±1,48 ^{bc}	7,00±0,99 ^{ab}
RA ⁴	8,50±0,24 ^{bc}	7,35±0,88 ^{ab}	8,11±0,02 ^b	9,36±1,57 ^{bc}
MSE ²	ND	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Coliformes</i>	ND	ND	ND	ND
Petrifilm <i>Levaduras</i>	ND	ND	ND	ND

^{a-c} Resultados del Test de Fisher (LSD). Medias del mismo parámetro en la misma fila sin superíndice común difieren significativamente ($p < 0,05$).

¹ PCA: medio utilizado para aislamiento de microorganismos aeróbios mesófilos totales (RAMT)

² MSE: medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Leuconostoc*

³ KF: medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Streptococcus*

⁴ RA: agar rogosa, medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Lactobacillus*

⁵ M₁₇: medio utilizado para aislamiento presuntivo de *Lactococcus*

ND: no detectado crecimiento o no superado el límite inferior de contaje

En las **Figuras 95** y **96** se representan, respectivamente, la evolución de los recuentos en los medios de cultivo, M₁₇, y RA, como medios presuntivos para *Lactococcus* y *Lactobacillus* de los quesos CAP y CAG, a lo largo de toda la maduración.

El tamaño de los quesos afectó de manera significativa ($p < 0,05$) a los recuentos de *Lactococcus* y *Lactobacillus*, no modificándose de forma significativa los recuentos de RAMT, y *Streptococcus*.

Al contrario de lo que se observa en los quesos con formato pequeño, en los quesos CAG se observa un ligero descenso en los recuentos presuntivos de *Lactococcus*, a los 30 días de la maduración. Esta evolución podría estar relacionada con la mayor concentración de sal que presentan los mismos. De hecho, Beresford *et al.* (2001) señalaron que al necesitar *Lactococcus* mayor actividad de agua para su crecimiento, un descenso de ésta, explicaría la disminución de este grupo microbiano. El mayor contenido en NaCl observado en los quesos CAG a los 30 días (3,3% frente al 2,4% de los CAP), puede provocar un descenso de la a_w ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el cultivo iniciador, tal y como señalaron autores como Fernández del Pozo *et al.* (1988) o Estepar *et al.* (1999). En este sentido, otros autores justificaron también los descensos que experimentaron estos dos grupos microbianos en los primeros momentos de la maduración, al efecto selectivo de la sal, a favor de la flora más tolerante y a la menor cantidad de agua de los quesos (Guizani *et al.*, 2006; Buffa *et al.*, 2001; McSweeney *et al.*, 1993; Tornadijo *et al.*, 1995).

Se observa también que los recuentos presuntivos de *Lactobacillus* son ligeramente superiores en los quesos CAP que en los CAG.

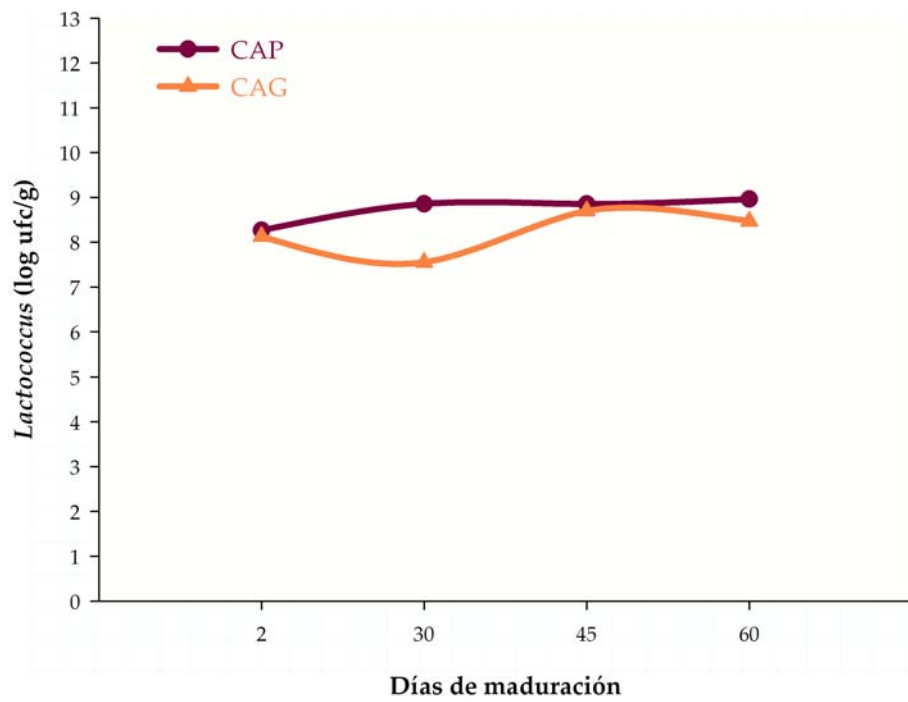


Figura 95. Evolución de los recuentos de *Lactococcus* a lo largo de la maduración.

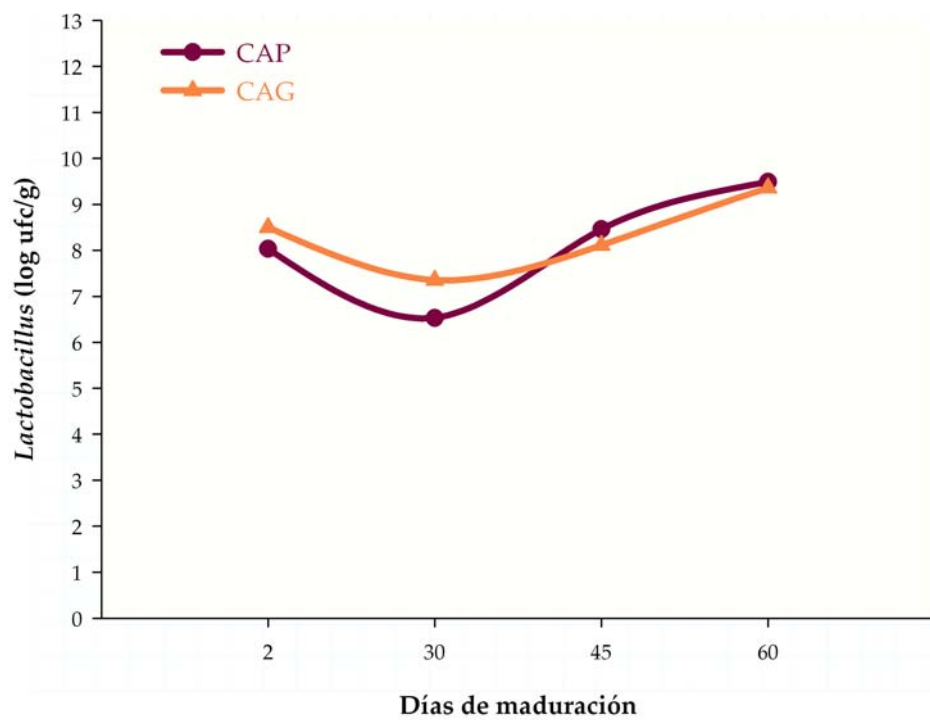


Figura 96. Evolución de los recuentos de *Lactobacillus* a lo largo de la maduración

4.2.4. Análisis Sensorial

La **Tabla 68** muestra las medias y desviaciones standard de los atributos sensoriales determinados a los 30, 45 y 60 días de maduración para los quesos grandes (CAG) y pequeños (CAP). También se muestran los resultados obtenidos mediante el test LSD de la comparación múltiple de medias individualizadas.

Tabla 68. Puntuaciones medias y desviaciones estándar obtenidas para los atributos sensoriales de quesos con tamaño grande (CAG) y pequeño (CAP) durante la maduración

Atributos	Días de maduración					
	30		45		60	
	CAG	CAP	CAG	CAP	CAG	CAP
Intensidad olor	4,78±0,10 ^a	4,64 ±0,81 ^a	4,69±0,37 ^a	5,05±0,55 ^a	4,86±0,57 ^a	5,57±0,35 ^b
Olor ácido	4,39±0,48 ^a	3,62±1,27 ^a	4,21±0,25 ^a	4,34±0,60 ^a	4,88±0,53 ^a	4,17±1,80 ^a
Olor vino	3,76±0,60 ^{ab}	2,73±0,13 ^a	3,74±0,56 ^{ab}	2,86±0,96 ^a	4,48±0,77 ^b	3,09±1,16 ^{ab}
Color	2,24±0,13 ^a	2,30±0,57 ^a	2,44±0,29 ^{ab}	2,54±0,21 ^{ab}	2,75±0,67 ^{ab}	3,08±0,71 ^b
Nº ojos	5,24±1,14 ^a	2,36±0,60 ^b	4,94±0,08 ^a	2,40±1,16 ^b	5,45±0,45 ^a	2,20±0,71 ^b
Tamaño ojos	4,22±0,67 ^c	2,77±0,26 ^{abc}	4,03±0,67 ^c	2,14±0,29 ^{ab}	3,21±0,04 ^{bc}	1,70±0,46 ^a
Distribución ojos	2,47±0,38 ^a	2,19±0,56 ^a	2,84±0,49 ^a	2,33±1,20 ^a	2,54±0,66 ^a	1,80±0,58 ^a
Dureza	2,97±0,92 ^a	3,57±0,53 ^{ab}	3,48±0,30 ^{ab}	4,38±0,98 ^{bc}	4,50±0,01 ^{bc}	5,11±0,89 ^c
Granulosidad	2,89±0,31 ^a	3,77±0,82 ^{ab}	3,17±0,65 ^a	3,56±1,07 ^{ab}	3,34±0,51 ^a	4,45±1,25 ^b
Creemosidad	5,45±0,24 ^a	5,93±0,34 ^a	5,28± 0,24 ^a	4,93±0,87 ^a	5,21±0,13 ^a	5,19±1,18 ^a
Intensidad sabor	4,97±0,44 ^a	5,40±0,04 ^b	5,29±0,23 ^{ab}	5,89±0,08 ^{bc}	5,44±0,14 ^{abc}	6,01±0,86 ^c
Sabor vino	2,68±1,24 ^a	2,27±0,15 ^a	3,54±0,59 ^b	3,30±0,30 ^b	4,54±0,36 ^c	3,21±0,54 ^b
Sabor ácido	4,50±0,68 ^a	4,31±0,02 ^a	4,94±0,54 ^a	5,00±0,69 ^a	5,35±0,34 ^a	4,49±0,31 ^a
Sabor salado	4,06±0,64 ^a	3,95±0,42 ^a	3,67±0,30 ^a	4,69±0,40 ^a	4,66±0,52 ^a	4,95±0,80 ^a
Sabor amargo	3,54±0,46 ^a	3,90±0,06 ^{ab}	4,21±0,33 ^b	3,69±1,35 ^{ab}	4,52±0,26 ^c	3,40±1,45 ^a

¹Valores medios de 12 panelistas.

^{a-g}Medias del mismo parámetro sin una letra común difieren significativamente (p<0,05)

En la **Figura 97** se representa el perfil sensorial del queso de Murcia al Vino de tamaño grande a los 30, 45 y 60 días de maduración. De la misma manera, con objeto de comparar de forma adecuada las características sensoriales de quesos con distinto tamaño, en las **Figuras 98, 99 y 100** se representan, los perfiles sensoriales de los quesos CAP y CAG a los 30, 45 y 60 días, respectivamente.

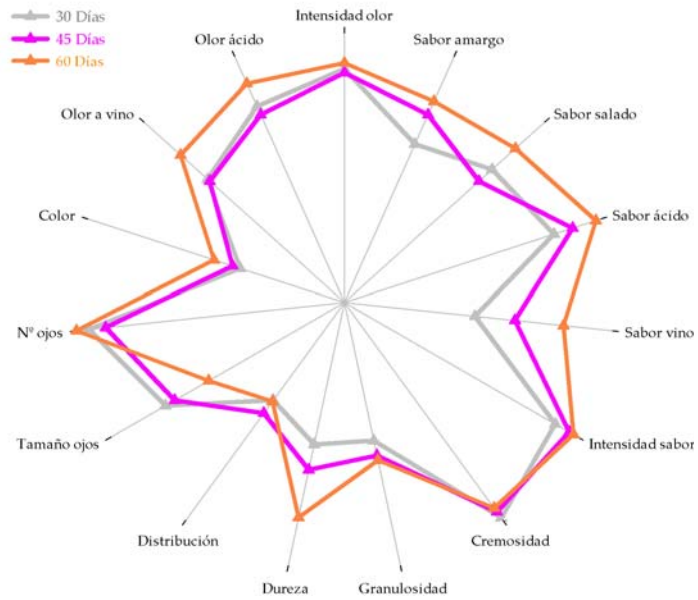


Figura 97. Perfil sensorial del queso de Murcia al Vino de tamaño grande

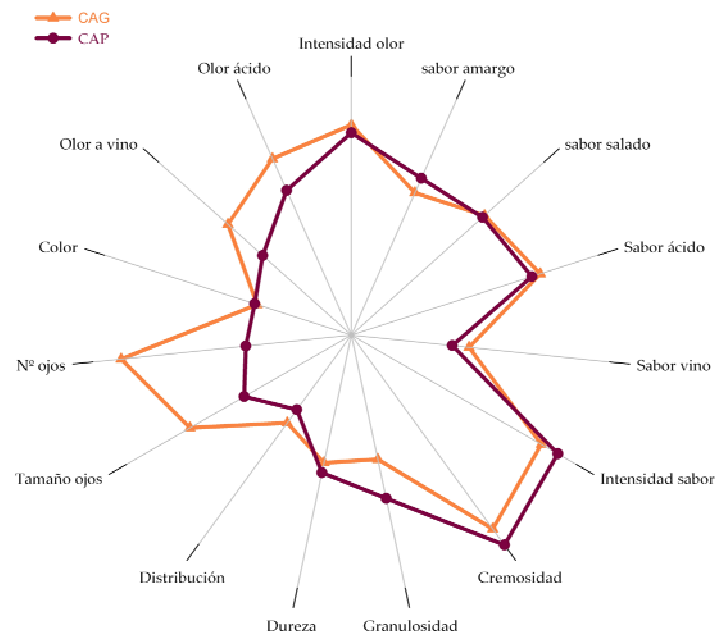


Figura 98. Perfiles sensoriales de los quesos CAP y CAG a los 30 días de maduración

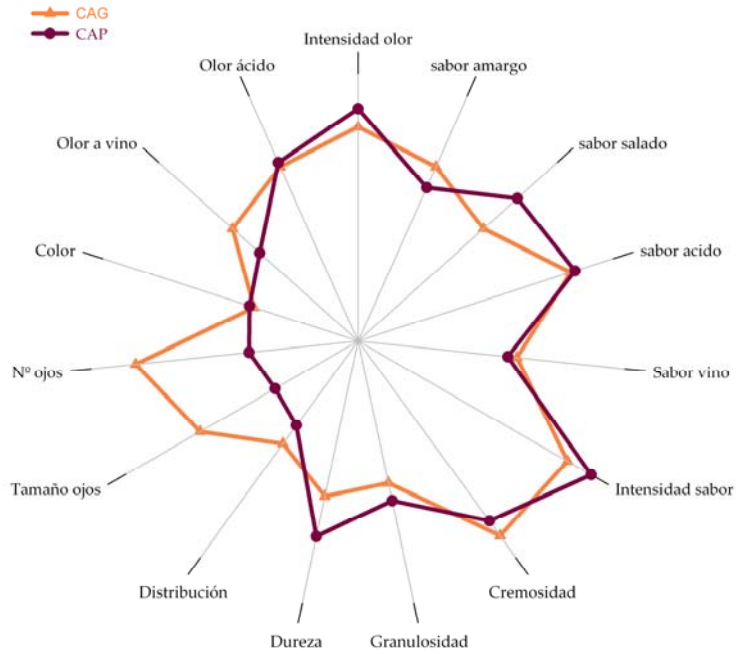


Figura 99. Perfiles sensoriales de los quesos CAP y CAG a los 45 días de maduración

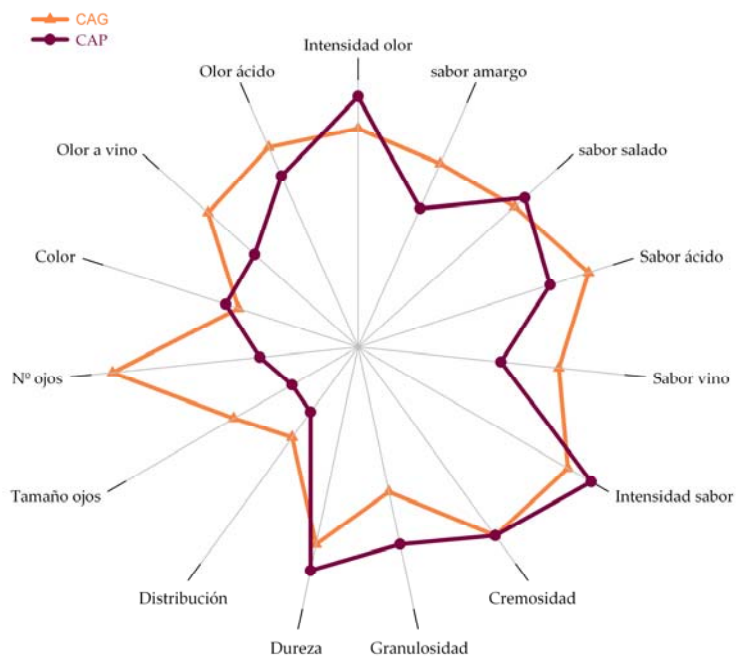


Figura 100. Perfiles sensoriales de los quesos CAP y CAG a los 60 días de maduración

El tamaño de los quesos afectó de manera significativa a la intensidad de olor ($p < 0,01$), al olor a vino ($p < 0,01$), al número y tamaño de los ojos ($p < 0,001$), a la dureza ($p < 0,05$), a la granulosis ($p < 0,05$), a la intensidad total de sabor ($p < 0,001$), al sabor a vino ($p < 0,05$) y al sabor amargo de los quesos ($p < 0,05$).

Así, los quesos CAG presentaron puntuaciones más elevadas a los CAP en los atributos número y tamaño de los ojos sabor a vino y sabor amargo, mientras que las puntuaciones de intensidad de olor, dureza, granulosis e intensidad de sabor fueron significativamente inferiores. El resto de los atributos estudiados no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

El hecho de que los quesos CAG presenten ojos de mayor tamaño y más numerosos que los quesos CAP puede deberse a que los primeros, por las diferencias en el proceso de prensado, presenten una masa más elástica que favorezca la formación de ojos. De igual forma, la mayor concentración de agua de los quesos grandes, desde los primeros días de maduración, permite retener mayor cantidad del dióxido de carbono producido durante la fermentación bacteriana. También puede deberse a que durante la elaboración de los quesos grandes, se produce una mayor cantidad de dióxido de carbono y de una manera más rápida (Polychroniadou, 2001). Otros autores, como Christensen *et al.* (1999), han observado una relación directa entre el GABA y la cantidad de ojos en los quesos. En nuestro estudio también hemos establecido una correlación positiva entre los valores de GABA y el parámetro n° de ojos en el queso.

Las mayores puntuaciones del sabor amargo en los quesos CAG no se producen por una mayor concentración en los péptidos HO en los quesos CAG, ya que, como se ha visto anteriormente, el tamaño de estos no afectó significativamente ($p > 0,05$) al contenido de estos péptidos. Algunos autores, como Christensen *et al.* (1999) han relacionado concentraciones elevadas de Phe con la aparición de sensaciones amargas en los quesos. Por esta razón, los valores más elevados de sabor amargo en los quesos grandes, pueden deberse a que éstos presentaron mayores concentraciones de este AAL que los quesos pequeños.

Las puntuaciones más altas obtenidas para la intensidad de olor y sabor en los quesos pequeños, pueden deberse a la mayor concentración de sustancias aromáticas y sápidas en estos quesos, como consecuencia de su menor contenido en humedad. Por otra parte, y según Puchades *et al.*, 1989, la Met se relaciona con

el desarrollo del aroma, por lo que el menor contenido de este AAL en los quesos CAG, podría también justificar estos resultados. De cualquier manera, las diferencias detectadas en las características sensoriales entre CAG y CAP probablemente no estén provocadas por la diferente concentración de polipéptidos observada, ya que parece que estos no contribuyen directamente en el sabor ni en el olor de los quesos (Sousa *et al.*, 2001).

Con respecto a la dureza y la granulosis, hay autores que han observado una relación directa entre estos atributos y el extracto seco de los quesos (Pompei *et al.*, 1991). En nuestro caso, también detectamos una correlación directa ($p < 0,05$) entre el contenido en ST, dureza y granulosis, lo que explicaría las mayores puntuaciones para estos atributos en los quesos CAP. Por otra parte, el menor contenido en agua en los quesos, proporciona una concentración mayor de caseínas que influyen positivamente en la dureza.

Se observa que a los tiempos mínimos requeridos para la comercialización del queso de Murcia al Vino con formato pequeño (30 días) y formato grande (45 días), las características sensoriales fundamentales, como intensidad de olor, intensidad de sabor, dureza o granulosis, fueron iguales o ligeramente superiores en los quesos CAP. Así, los quesos elaborados con formato pequeño consiguen adquirir las características sensoriales fundamentales en menos tiempo, acortándose, por tanto, el tiempo de maduración.

4.2.4.1. *Análisis multivariante*

4.2.4.1.a) Análisis de componentes principales

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial, que se han comentado anteriormente, han sido confirmados mediante el análisis de componentes principales (ACP) (**Tabla 69**).

Tabla 69. Análisis de componentes principales de datos a lo largo de la maduración de los atributos sensoriales de muestras de quesos de Murcia al Vino CAG y CAP

	CP1	CP2
Intensidad olor	0,451	0,282
Olor ácido	0,072	0,640
Olor vino	-0,011	0,871
Color	0,680	0,423
Nº ojos	-0,512	0,752
Tamaño ojos	-0,807	0,435
Distribución ojos	-0,239	0,331
Dureza	0,921	0,149
Granulosidad	0,697	-0,183
Creemosidad	-0,301	-0,096
Intensidad sabor	0,909	-0,103
Sabor vino	0,403	0,662
Sabor ácido	0,346	0,673
Sabor salado	0,798	0,085
Sabor amargo	-0,315	0,472

Se han extraído dos componentes principales que explican el 59% de la varianza en las muestras. El primer componente, que explica el 36% del total de la varianza, se relacionó positivamente con la intensidad de sabor total, la dureza, la intensidad de olor total y otros atributos que aumentan durante la maduración; y, negativamente, con el tamaño, número y distribución de los ojos, los cuales decrecen a lo largo de la misma. La intensidad total de sabor, la dureza y el tamaño de los ojos han sido los atributos con mayor efecto diferenciador (**Tabla 69**).

El segundo componente principal explica el 23% del total de la varianza, presentando correlaciones positivas con la mayoría de las características estudiadas excepto para la cremosidad, granulosidad e intensidad de sabor, las cuales presentan correlaciones negativas. El olor a vino, el número y tamaño de los ojos y el sabor a vino fueron los atributos con mayor efecto diferenciador

En la **Figura 101**, se representan en un plano los quesos de distinto tamaño en función de los dos componentes principales. Se han confeccionado dos grandes grupos, uno aglutina a los quesos grandes y otro a los pequeños. La evolución de las características sensoriales de los quesos CAG durante la maduración permitió

diferenciar entre los quesos con 30, 45 y 60 días. Por el contrario, no diferenció entre los quesos CAP con 45 y con 60 días.

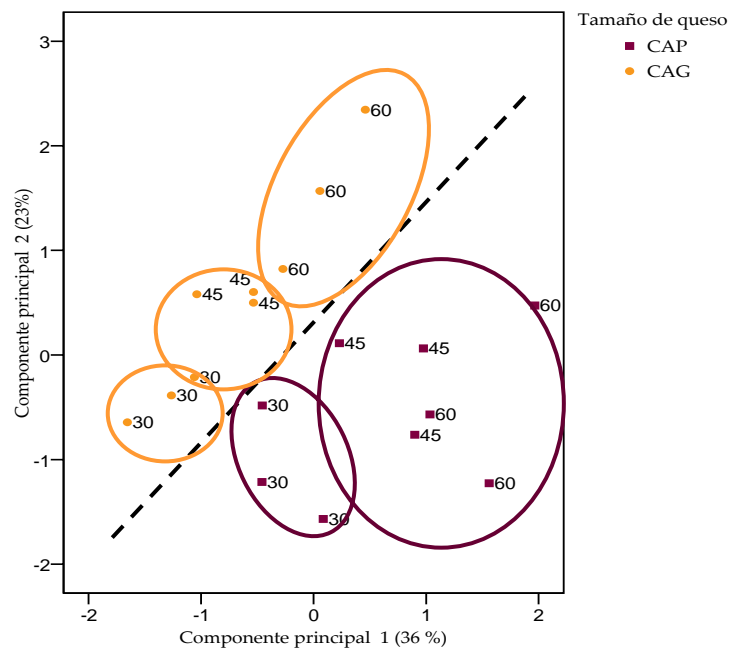


Figura 101. Representación gráfica del análisis de componentes principales de las muestras de quesos en función de los datos de las características sensoriales

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

PRIMERA. Durante la maduración del queso de Murcia al Vino se produce un incremento significativo de los sólidos totales y del NaCl, no modificándose significativamente los contenidos de proteína, grasa, cenizas y ácidos grasos esterificados. Por su parte, los valores de pH, acidez titulable y contenidos de macro y microminerales del queso se vieron afectados significativamente por el tiempo de maduración. De esta manera, se produce un incremento del Na, así como, un descenso significativo de los contenidos de Ca, P, Zn, Cu y Fe.

Las características del queso de Murcia al Vino son similares a las encontradas en otras variedades de queso de cabra con el mismo tiempo de maduración, estableciéndose algunas diferencias en función de las distintas tecnologías de elaboración utilizadas.

SEGUNDA. Se observa una intensa actividad proteolítica en el queso de Murcia al Vino durante la maduración, sobre todo pasados los 30 días. Los aminoácidos libres con valores más elevados fueron Ile, Val, Ala, Phe y Gaba; mientras que se observaron bajas concentraciones en Glu, Met y Leu.

TERCERA. La evolución de los principales recuentos microbianos observados en el queso de Murcia al Vino ha sido similar a la detectada en otras variedades de queso, correspondiéndose los recuentos más elevados con las bacterias del cultivo iniciador (*Lactococcus Lactis* y *Streptococcus Thermophilus*) y *Lactobacillus*.

La relación de la población microbiana con el perfil aminoacídico haría interesante realizar alguna modificación en el cultivo iniciador para mejorar las características organolépticas.

No se detectan diferencias significativas en los recuentos de quesos elaborados con diferente coagulante, ni con tamaños distintos.

CUARTA. El queso de Murcia al Vino se caracteriza por tener una intensidad de olor media y suave olor a ácido. Presenta una pasta blanca y homogénea con pocos y pequeños ojos que se distribuyen irregularmente. Tiene una textura suave, cremosidad media e intensidad de sabor media.

QUINTA. El tipo de coagulante no afectó significativamente a ninguno de los parámetros composicionales estudiados, excepto a los valores de pH, acidez titulable y Ca, que presentaron mayores niveles en los quesos elaborados con coagulante vegetal.

SEXTA. En quesos elaborados con CV se observó una mayor proteólisis de las caseínas con valores más elevados de sus productos de degradación, debido a que la actividad proteolítica de las cinasas es más intensa que la de la quimosina de los quesos elaborados con CA. Por la misma razón, se observa en los quesos elaborados con CV una mayor concentración de NS, NNP, NAA, N-NH₃, péptidos (HI e HO) y aminoácidos totales. A pesar de que la producción de AAL depende fundamentalmente de la actividad bacteriana, en los quesos elaborados con CV se observó mayor concentración de His, Ser, Gln, Thr, Ala, Met e Ile.

La mayor proteólisis observada en los quesos elaborados con CV permite acortar el tiempo de maduración.

SEPTIMA. El uso de coagulante vegetal para elaborar queso de cabra de Murcia al Vino le confiere unas características sensoriales diferentes al obtenido con cuajo animal, permitiendo la diversificación de esta variedad de queso. Así, los quesos elaborados con coagulante vegetal son más blandos, más cremosos, ligeramente más amargos y presentan mayor intensidad de sabor.

OCTAVA. Los sólidos totales y el NaCl fueron los únicos parámetros composicionales que se vieron modificados significativamente por el tamaño del

queso de Murcia al Vino. De esta manera, los quesos de mayor tamaño presentaron menor contenido en sólidos totales y mayor concentración de sal.

Para evitar estas diferencias se deberían unificar los procesos de elaboración de quesos con distinto tamaño, fundamentalmente en las etapas de moldeado, prensado y salado.

NOVENA. El tamaño de los quesos tan sólo afectó significativamente a la proteólisis primaria observándose mayor degradación de las caseínas, y por tanto, contenidos más elevados en NS. Esto sugiere que la actividad de la quimosina es mayor en los quesos grandes, mientras que la actividad proteolítica microbiana no se ve afectada por el tamaño.

A pesar de que el contenido en AAT no se afecta por el tamaño de los quesos, aparecen diferencias significativas en las concentraciones de algunos de los AAL. Este es el caso de la Ile, Phe y Gaba, que presentaron valores superiores en quesos grandes, o de la His, Arg y Met, cuyos valores fueron inferiores a los detectados en los quesos pequeños. Las diferencias observadas en el contenido en AAL pudiera ser la causa de las diferencias sensoriales encontradas entre quesos con diferente tamaño.

DÉCIMA. Los quesos con mayor tamaño presentan mayores puntuaciones en los atributos tamaño y número de ojos, sabor a vino, y sabor amargo, y menores en la intensidad de olor, dureza, granulosis e intensidad de sabor. No se presentan diferencias en el resto de atributos estudiados.

Por tanto, los quesos elaborados con formato pequeño consiguen adquirir las características sensoriales fundamentales en menos tiempo, pudiéndose acortar su tiempo de maduración.

CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, A.C., Prieto, J.A., Rubio-Teixeira, M. & Polaina, J. (1999). Construction of a lactose-assimilating strain of baker's yeast. *Yeast*, 15, 1299-1305.
- AENOR (1997). *Vocabulario de análisis sensorial*. Norma UNE 87-001-94. Recopilación de normas UNE. Tomo 1. Alimentación. Análisis sensorial.
- AFNOR ISO 4832 (3M-01/2-09/89 A).
- Alais, C. (2003). *Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera*. Ed. Reverté, S.A.
- Albenzio, M., Corbo, M.R., Rehman, S.U., Fox, P.F., De Angelis, M., Corsetti, A., Sevi, A. & Gobbetti, M. (2001). Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 35-48.
- Alichanidis, E., Polychroniadou, A., Tzanetakis, N. & Vafopoulou, A. (1981). Teleme cheese from deep-frozen curd. *Journal of Dairy Science*, 64, 732-39.
- Almenara, F.J., Álvarez, S., Darias, J., Rodríguez, E., Díaz, C. & Fresno, M. (2007). Efecto de la maduración en la composición mineral de los quesos de cabra Majorera. *Archivos de Zootecnia*, 56, 667-671.
- Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A. & García-Lopez, M.L. (2002). Changes in the microflora of Valdeteja raw goat's milk cheese throughout manufacturing and ripening. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*, 35, 222-232.
- Amantea, G.F., Skura, B.J. & Nakai, S. (1986). Culture effect on ripening characteristics and rheological behavior of cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 51(4), 912-918.
- Amerine, M.A., Pangborn, R.M. & Roessler, E.B. (1965). *Principles of sensory evaluation of foods*. Academic Press, New York. USA.
- Andrews, A.T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, 50, 45-55.
- Andrews, A.T., Anderson, M. & Goodenough, P.W. (1987). A study of the heat stabilities of a number of indigenous milk enzymes. *Journal of Dairy Research*, 59, 823-827.
- Anónimo (1990). BORM de 11 Junio de la Consejería por la que se aprueba la Reglamentación específica de los quesos de cabra acogidos a la Denominación Producto de Calidad de Murcia y su marca.
- Anónimo (1990). *Catálogo de quesos de España*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

- Anónimo (1991). *Código Alimentario Español* (CAE). Ed. Boletín Oficial del Estado. Colección textos legales. 6ª ed. Madrid. España.
- Anónimo (2001). Orden del 11 Julio de 2001, por la que se aprueba el Reglamento de las Denominaciones de Origen Queso de Murcia, Queso de Murcia al vino y se constituye su Consejo Regulador.
- Anónimo (2001). Orden del 31 de Agosto de 2001, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen Queso Palmero y su Consejo Regulador.
- Anónimo (2006). BOE de 6 de Octubre, por el que se aprueba las Normas de Calidad para quesos y quesos fundidos.
- A.O.A.C (Association of Official Analytical Chemist). (1990). *Official Methods of Analysis*. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemist. Washington.
- APHA (1985). *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association. Washington. USA.
- Arancibia, J.A. & Escandar, G.E. (1999). Complexation of diclorofenac with β -ciclodextrin and spectrofluorometric determination. *Analyst*, 124, 1833-1838.
- Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K. & Arai, S. (1997). Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: Purification, characterization, and application to milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1070-1075.
- Assenat, L. (1991). *La leche de oveja*. In F. M. Luquet, Leche y productos lácteos-Vaca, Oveja, Cabra, vol. 1 (pp. 277-311). Zaragoza, España: Acibia S.A.
- Aston, J.W., Grieve, P.A., Durward, I.G. & Dulley, J.R. (1983). Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese. *Austrian Journal of Dairy Technology*, 38, 55-59.
- Aston, J.W., Grieve, P.A., Durward, I.G. & Dulley, J.R. (1983b). Proteolysis and flavour development in Cheddar cheeses subjected to accelerated ripening treatments. *Austrian Journal of Dairy Technology*, 38, 59-65.
- Aston, J.W. & Creamer, L.K. (1986). Contribution of the components of the water-soluble fraction to the flavor of cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 21(3), 229-248.
- Atasoy, A.F., Yetismeyen, A., Türkoglu, H. & Ozer B. (2008). Effects of heat treatment and starter culture on the properties of traditional Urfa cheeses (a white-brined Turkish cheese) produced from bovine milk. *Food Control*, 19, 278-285.
- Atasoy, A.F. & Türkoglu, H. (2009). Lipólisis in Urfa cheese produced from raw and pasteurized goats' and cows' milk with mesophilic or thermophilic cultures during ripening. *Food Chemistry*, 115, 71-78.
- Atlan, E., Laloi, P. & Portalier, R. (1989). Isolation and characterization of aminopeptidase-deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1717.

- Aword, O.C. & Muller, H.G. (1987). Cheese-making properties of vegetable rennet from Sodom apple (*Calotropis procera*). *Food Chemistry*, 26, 71-79.
- Baer, A, Ryba, I. & Casey, M. (1997). Influence of coagulating enzymes and plasmin on the growth of starter bacteria at the start of Emmental cheese manufacture. Preliminary-report. *Lait*, 77, 189-199.
- Ballesteros, C., Poveda, J., Gonzalez-Vinas, M. & Cabezas, L. (2006). Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17, 249-255.
- Banks, J., Roa, I. & Muir, D. (1998). Manipulation of the texture of low-fat cheddar using a plant protease extracted from *Cynara cardunculus*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53 (2), 105.
- Barbosa, M., Valles, E., Vassal, L. & Mocquot, G. (1976). L'utilisation d'extrait de *Cynara cardunculus* L. comme agent coagulant en fabrication de fromages à pâte molle et à pâte cuite. *Le Lait*, 561-617.
- Barbosa, M., Corradini, C. & Battistoti, B. (1981). Cheesemaking experiments carried out on some Italian cheese with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus*, L.). *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 32, 203-221.
- Barcenas, P., Elortondo, F. & Albisu, M. (2003). Comparison of free choice profiling, direct similarity measurements and hedonic data for ewes' milk cheeses sensory evaluation. *International Dairy Journal*, 13, 67-77.
- Barcina, Y., Ibañez, F. & Ordoñez, A. (1995). Evolution of free amino-acids during idiazabal cheese ripening. *Food Control*, 6, 161-164.
- Barcina, Y. (1997). Nuevas tendencias del análisis sensorial en el queso. *Industria Láctea Española*, 18, 25-29.
- Barron, L., Redondo, Y., Ortigosa, M., Carbonell, M., Garcia, S., Torre, P., de Renobales, M. & Fernandez-Garcia, E. (2005). Comparison of dynamic headspace methods used for the analysis of the volatile composition of Spanish PDO ewe's raw milk cheeses. *Lait*, 85, 491-513.
- Battistotti & Corradini. (1993). *Italian cheeses*. In P. F. Fox (Ed.) (2nd ed. Cheese: Chemistry, physics and microbiology (Vol. 2, pp. 221-243). London: Chapman & Hall.
- Beerens, H. & Luquet, F.M. (1990). *Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y productos lácteos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- Benedito, J., Carcel, J.A., González, R. & Sanjuán, N. (2000). Prediction of instrumental and sensory textural characteristics of Mahon cheese from ultrasonic measurements *Journal of Texture Studies*, 31(6), 631-643.
- Benfeldt, C., Sorensen, J., Ellegard, K. & Petersen, T. (1997). Heat treatment of cheese milk: Effect on plasmin activity and proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 7, 723-731.

- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. & Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Bernardo, A. (1991). *Aspectos fundamentales para la elaboración industrial de quesos artesanos*. Nuevos métodos tecnológicos para productos lácteos. Venus.
- Bills, D., Scanlan, R., Lindsay, R. & Sather, L. (1969). Free fatty acids and flavor of dairy products. *Journal of Dairy Science*, 52, 1340.
- Blakesley, R. & Boezi, J. (1977). New staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250. *Analytical Biochemistry*, 82(2), 580-582.
- Bonetta, S., Bonetta, S., Carraro, E., Rantsiou, K. & Cocolin, L. (2008). Microbiological characterisation of Roviola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology*, 25, 786-792.
- Bontiris, T.G., Mallatou, H., Alichanidis, E., Kakouri, A. & Samelis, J. (2008). Physicochemical, microbiological and sensory changes during ripening and storage of Xinotyri, a traditional Greek cheese from raw goats' milk. *International Journal of Dairy Technology*, 61(3), 229-236.
- Bosi, F., Rebecchi, A., Cappa, F., Botazzi, V. & Battistotti, B. (1993). Batteri lattici per la produzione de formaggio Grana. IV parte: Distribuzione e caratterizzazione di batteri lattici mesofili. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* 44, 205-214.
- Branger, A. (1992). Il controllo dei batteri lattici. *Il latte* 1, 46.
- Brickley, C.A., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J.J., Johnson, M.E., McSweeney, P.L.H. & Lucey, J.A. (2008). Influence of emulsifying salts on the textural properties of nonfat process cheese made from direct acid cheese bases. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 39-48
- British Standards Institution, B.S. (1963). *Methods for the chemical analysis of cheese*. London: BSI.
- Brito, C., Manriquez, X., Molina, L.H. & Pinto, M. (2003). Maturation study of low fat Chanco cheese made with homogenized milk. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(3), 299-305.
- Broome, M.C., Krause, D.A. & Hickey, M.W. (1990). The use of non-sartarter *lactobacilli* in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45, 67-73.
- Broome, M. & Hickey, M. (1991). Proteinase activity of nonstarter *lactobacilli*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 46, 12-18.
- Broome, M. & Hickey, M. (1991). Peptidase activity of nonstarter *lactobacilli*. *Australian Journal of Dairy Technology*, 46, 19-23.
- Büetikofer, U. & Fuchs, D. (1997). Development of free amino acids in Appenzeller, Emmentaler, Gruyere, Raclette, Sbrinz and Tilsitercheese. *Le Lait*, 77, 91-100.

- Buffa, M., Guamis, B., Pavia, M. & Trujillo, A. (2001). Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *International Dairy Journal*, 11, 175-179.
- Buffa, M., Guamis, B., Royo, C. & Trujillo, A. (2001). Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. *Food Microbiology*, 18, 45-51.
- Burton, H. (1986). Monograph on pasteurized milk. Microbiological aspects. *Bulletin International of Dairy Fed*, Brussels, 200, 8-15.
- Cabezas, L., Poveda, J.M., Sánchez, I. & Palop, M.L. (2005). Physico-chemical and sensory characteristics of Spanish goat cheeses. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 60, 48-51.
- Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S. & Palop, M.L.L. (2007). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. *Food Control*, 18, 11-17.
- Calvo, M.V., Castillo, I., Díaz-Barcos, V., Requena, T. & Fontecha, J. (2007). Effect of a hygienized rennet paste and a defined strain starter on proteolysis, texture and properties of semi-hard goat cheese. *Food Chemistry*, 102, 917-924.
- Cantoni, C. & Bersani, C. (1988). Possible enteropatogenicità di *Enterococcus faecium*. *Industrie Alimentari*, 27, 729-731.
- Carballo, J., Fresno, J.M., Tuero, J.R., Prieto, J.G., Bernardo, A. & Martín-Sarmiento, R. (1994). Characterization and biochemical-changes during the ripening of a Spanish hard goat cheese. *Food Chemistry*, 49, 77-82.
- Carles, C. & Ribadeau-Dumas, B. (1984). Kinetics of action of chymosin (rennin) on some peptide bonds of bovine b-casein. *Biochemistry*, 23, 6.839-6.843.
- Carmona, M.A. & Gomez, R. (1994). Adición de cultivos lácticos y maduración controlada en la elaboración del queso de Los Pedroches. *Industrias Lacteas Españolas*, 184, 33-39.
- Carmona, M., Sanjuan, E., Gomez, R. & Fernandez-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. & Mateo, J. (2000). *Rendimientos queseros I. Concepto y factores que afectan. Alimentaria*, 311, 103-113.
- Carrera, E., Gaya, P., Medina, M. & Nunez, M. (1999). Effect of milk coagulant on the formation of hydrophobic and hydrophilic peptides during the manufacture of cows' milk Hispanico cheese. *Milchwissenschaft*, 54, 146-149.
- Carretero, C., Mor-Mur, M., Pla, R. & Guamis, B. (1992). Caracterización físico-química del queso de leche de cabra Cendrat del Montsec. *Revista Española de Lechería*, 4, 28-33.

- Carretero, C., Trujillo, A.J., Mor-Mur, M., Pla, R. & Guamis, B. (1994). Electrophoretic study of casein breakdown during ripening of goat's milk cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1546-1550.
- Catalano, M., De Felice, M. & Gomes, T. (1985). Influenza della frazione lipidica sulla qualità del formaggio II. *Latte*, X, 936-943.
- Celano, G., Cafarchia, C. & Tiecco, G. (1996). Formation of biogenic amines in Pecorino Pugliese cheese. *Industrie Alimentari*, 35, 249-252.
- Centeno, J., Cepeda, A. & Rodriguez Otero, J. (1996a). Lactic acid bacteria isolated from Arzua cows' milk cheese. *International Dairy Journal*, 6, 65-78.
- Centeno, J., Menendez, S., Hermida, M. & Rodriguez-Otero, J. (1999). Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 97-111.
- Chamorro, M.C. (2002). *El análisis sensorial de los quesos*. Editorial Mundi-prensa.
- Chandan, R., Argyle, P. & Mathison, G. (1982). Action of *Lactobacillus-bulgaricus* proteinase preparations on milk-proteins. *Journal of Dairy Science*, 65, 1408-1413.
- Chapot-Chartier, M. (1996). Autolysins of lactic acid bacteria. *Lait*, 76(1-2), 91-109.
- Chávarri, F. (1999). Lipólisis en el Queso Idiazábal: Efecto de la época de elaboración, del cultivo iniciador, de la pasteurización y del tipo de cuajo. *Tesis Doctoral* Nº 35, Gobierno Vasco, Departamento de Industria, Agricultura y Pesca, Vitoria-Gasteiz.
- Chen, A.H., Larkin, J.W., Clark, C.J.E. & Irwin, W.E. (1979). Textural analysis of cheese. *Journal Dairy Science*, 62, 901-907.
- Chen, S., Agboola, S. & Zhao, J. (2003). Use of Australian cardoon in the manufacture of ovine milk cheese: A comparison with commercial rennet preparations. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 799-807.
- Choisy, C., Desmezaud, M., Gripon, J.C., Lamberet, G., Lenoir, J. & Tourneur, C. (1990). Los fenómenos microbiológicos y enzimáticos y la bioquímica del afinado. In Anonymous *El Queso Barcelona*. España: Omega, S.A.
- Christensen, J.E., Johnson, M. & Steele, J.L. (1995). Production of cheddar cheese using a *Lactococcus-lactis* ssp *cremoris* sk11 derivative with enhanced aminopeptidase activity. *International Dairy Journal*, 5, 367-379.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A. & Steele, J.L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. In Proceedings of the sixth symposium on the lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19-23. September, Veehoven, The Netherlands.
- Christopherson, S.W. & Glass, R.L. (1969). Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. *Journal of Dairy Science*, 52, 1289-1290.

- Cichoski, A.J., Valduga, E., Valduga, A.T., Tornadizo, M. & Fresno, J.M. (2002). Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. *Food Control*, 13, 329-336.
- Cogan, T., Barbosa, M., Beuquier, E., Bianchi Salvadori, B., Cocconcelli, P., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M. & Rodriguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- Collins, Y., McSweeney, P. & Wilkinson, M. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841-866.
- Conserjería de Agricultura y Agua. Dirección General. "Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2008". Tomo I. Datos Regionales.
- Cordeiro, M., Jakob, E., Puhan, Z., Pais, M. & Brodelius, P. (1992). Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus* a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 47(11), 683-687.
- Cordeiro, M., Xue, Z.T., Pietrzak, M., Pais, M.S. & Brodelius, P.E. (1994). 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.
- COST 95. (1999). "Guía para la evaluación sensorial de la textura de quesos de pasta dura o semidura de leche de oveja". En: COST95 Improvement of the quality of the production of raw milk cheeses. A guide to the quality of the production of raw milk cheeses. European Commission. Luxembourg, 148 pp.
- Costell E, Duran, L. (1981). Sensory analysis in the quality-control of foods.1. Introduction. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos*, 21, 1-10.
- Creamer, L.K. (1975). Beta-casein degradation in Gouda and Cheddar cheeses. *Journal of Dairy Science*, 58, 287-292.
- Creamer, L.K. (1991). Electrophoresis of cheese. *Bulletin of International Dairy Federation Brussels*, 261, 14-28.
- Crow, V., Curry, B. & Hayes, M. (2001). The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal*, 11, 275-283.
- Cuesta, P., Fernández-García, E., González de Llano, D., Montilla, A. & 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. & Leeuwen, H.J.M. (1970). Further notes on the lactose, lactic acid and mineral equilibria in Cheddar cheese manufacture. XVIII *Internacional Dairy Congress*, 1E, 303.
- Dagleish, D.G. (1992). The enzymatic coagulation of milk. In: *Advanced Dairy Chemistry I: Proteins* (PF Fox, Ed), pp 579-619. Elsevier Applied Science. Elsevier Science Publishers Ltd. England.
- De la Fuente, M.A., Requena, T. & 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.
- De Rensis, C.M.V.B., Petenate, A.J. & Viotto, W.H. (2009). Chemical composition, rheological and sensorial characterization of reduced fat Prato cheese. *Ciencia e tecnologia de alimentos*, 29(3), 488-494.
- Delacroix-Buchet, A. & Trossat, P. (1991). Proteolysis and texture of gruyere type cheese 1. Influence of water activity. *Lait*, 71(3), 299-311.
- Delacroix-Buchet, A., Degas, C., Lamberet, G. & Vassal, L. (1996). Effect of AA and FF caprine alpha (α_1)-casein variants on cheesemaking. *Lait*, 76(3), 217-241.
- Delgado, F.J., González-Crespo, J., Ladero, L., Cava, R. & Ramirez, R. (2009). Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (PDO "Torta del Casar") during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(9), 1721-1728.
- Demarigny, Y., Beuvier, E., Dasen, A. & Duboz, G. (1996). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait*, 76, 371-387.
- Desmazeaud, M.J. & Gripon, J.C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32, 731-734.
- Desmazeaud, M.J. (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait*, 63, 267-316.
- Días, J.J.M. (1998). Estudo de alguns parâmetros microbiológicos e tecnológicos do Queijo Serpa. *Tese de Licenciatura*. ISA. Universidade Técnica de Lisboa.
- Doi, E., Shibata, D. & Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry*, 118(1), 173-184.
- Eck, A. (1990). La coagulación de la leche. In A. Eck, *El Queso* (pp. 3-20). Barcelona. España: Ediciones Omega.
- Edwards, J. & Kosikowski, F. (1983). Bitter compounds from cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 66(4), 727-734.

- Eigel, W.N., Butler, J.L., Ernstrom, C.A., Farrel, H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R. & Whitney, R.M. (1984). Nomenclature of protein of cow's milk: fifth revision. *Journal of Dairy Science*, 67, 1599-1608.
- El Abboudi, M., El Soda, M., Pandian, S., Barreu, M., Trepanier, G. & Simard, R.E. (1992). Peptidase activity in debittering and non-debittering strains of *Lactobacilli*. *International Dairy Journal*, 2, 55-64.
- Engels, W. & Visser, S. (1994). Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavor of different types of cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48(3), 127-140.
- Engels, W. & Visser, S. (1996). Development of cheese flavour 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(1), 3-17.
- Espie, W. & Madden, R. (1997). The carbonation of chilled bulk milk. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 52(5), 249-253.
- Estepar, J., Sánchez, M.M., Alonso, L. & Mayo, B. (1999). Biochemical and microbiological characterization of artisanal "Peñamellera" cheese: análisis of its indigenous lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 9, 737-746.
- Ezzat, N., El soda, M., Bouillanne, C., Zevaco, C. & Blanchard, P. (1985). Cell-wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis*. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 40(3), 140-143.
- Faccia, M., Gambacorta, G., Liuzzi, V.A., Alviti, G. & Di Luccia, A. (2003). Influence of cheese weight and type of rennet on composition and proteolysis of Canestrato Pugliese cheese II. Chromatographic characterization of soluble nitrogen. *Italian Journal of Food Science*, 15, 75-84.
- Falagan, A., Luna, A. & Carricoza, J.A. (2000). Evolución del sector productor y transformador de leche de cabra en Murcia: una aventura pionera en España. Curso de perfeccionamiento actualidad y nuevas tendencias en el sector lácteo.
- Fallico, V., McSweeney, P., Horne, J., Pediliggieri, C., Hannon, J., Carpino, S. & Licitra, G. (2005). Evaluation of bitterness in Ragusano cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(4), 1288-1300.
- Faro, C.C., Moir, A.J. & Pires, E.V. (1992). Specificity of milk-clotting enzyme extracted from the thistle *C. cardunculus* L: action on oxidized insulin and K-casein. *Biotechnology letter*, 14, 841-846.
- FDA. Validation of analytical procedures: methodology. FDA Guidance for Industry Q2B. Food and Drug Administration. Rockville, MD. USA.
- Fenelon, M.A., Guinee, T.P. & Reville, W.J. (1999). Characteristics of reduced-fat Cheddar prepared from the blending of full-fat and skim cheese curds at whey drainage. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 54(9), 506-510.

- Fernández de Palencia, P., Martín, C., López, R. & Pelaez, C. (1997a). Proteolytic activity of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731 in a model cheese system. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 45, 3703-3708.
- Fernández del Pozo, B., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M.A. & Núñez, M. (1988). Changes in chemical and rheological characteristics of La Serena ewe's milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 55, 457-464.
- Fernandez-Espla, M.D. & Martín-Hernandez, M.C. (1997). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* IFPL 731 isolated from goat cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1497-1504.
- Fernández-García, E., Carbonell, M. & Nuñez, M. (2002). Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 1. Comparison of raw and pasteurized milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 69(4), 579-593.
- 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. (1978). Estudio del queso de los Pedroches. II. Evolución de los aminoácidos libres en el transcurso de la maduración. *Anales de Bromatología*, 30, 130-135.
- Fernández Salguero, J. Matos, J.B. & Marsilla, B.A. (1981). Electroforesis cuantitativa y datos composicionales del queso de Fuerteventura. *Alimentaria*, 119, 71-80.
- Fernández-Salguero, J., Florido, S. & Marcos, A. (1986). 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. & Gómez, R. (1997). Estudio de los quesos tradicionales de Andalucía. Publicaciones de la Universidad de Córdoba y Obra Social y Cultural Cajasur.
- Fernández-Salguero, J., Gómez, R., Tejada, L. & Vioque, M. (2000). Un coagulante vegetal liofilizado, procedimiento para su preparación y sus aplicaciones en la fabricación de quesos. Solicitud de Patente de Invención a la Oficina Española de Patentes y Marcas. Número de solicitud P200001593.
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L. & Gómez, R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 464-468.
- Fernández-Salguero, J., Prados, F., Pino, A., Vioque, M., Galán, E., Medina, M. & Gómez, R. (2004). Influencia de un coagulante vegetal en polvo en la maduración de quesos de oveja. In Anonymous III Congreso español de Ingeniería de Alimentos. Pamplona. España.

- Fernández-Salguero, J. & Sanjuán, E. (1999). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64(2), 177-183.
- Ferrazza, R.E., Mansur, M., Ribeiro, J.I., Fresno, J.M. & Tornadijo, M.E. (2003). Características e influencias físico-químicas, químicas e bioquímicas do queijo Zamorano DOP sob modificações de temperatura durante maturação. Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes, pp, 90-94. Juiz de Fora, Minas, Brasil.
- Ferrazza, R.E., Fresno, J.M., Ribeiro, J.I., Tornadijo, M.E. & Mansur, M. (2004). Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. *Food Research International*, 37, 149-155
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. & Beresford, T. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3418-3426.
- Folkertsman, B. & Fox, P.F. (1992). Use of Cd-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 59, 217-224.
- Foltmann, B. & Scecsi, P.B. (1998). Chymosin. In: Handbook of proteolytic enzymes, ed. AJ Barret, ND Rawlings & JF Woessner, pp, 815-819. Academic Press. London. UK.
- Fontecha, J., Pelaez, C., Juárez, M., Requena, T. & Gómez, C. (1990). Biochemical and Microbiological Characteristics of Artisanal Hard Goat's Cheese. *Journal of Dairy Science*, 73, 1150-1157.
- Fox, P. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379-1400.
- Fox, P.F., Lucey, J.A. & Cogan, T.M. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Food Science and Nutrition*, 29, 237-252.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H. & Wallace, J. (1993a). Biochemistry of Cheese Ripening. In P. F. Fox, Cheese: Chemistry, physics and microbiology-major cheese groups (pp. 389-438). London, UK: Elsevier Applied Science.
- Fox, P.F., Guinee, T.M. Cogan, T.M. & Mcsweeney, P.L.H. (2000). Biochemistry of Cheese Ripening. In: Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers, Inc. Maryland, USA.
- Fox, P. & Wallace, J. (1997). Formation of flavor compounds in cheese. In Anonymous *Advances in Applied Microbiology*, 45, 17-85.
- Franco, I., Prieto, B., González, J. & Carballo, J. (2001). Los quesos de cabra tradicionales de España: una revisión. *Alimentaria*, enero-febrero, 63-82.
- Franco, I., Prieto, B., Bernardo, A., Gonzalez Prieto, J. & Carballo, J. (2003). Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety ((Babia-Laciana). *International Dairy Journal*, 13, 221-230.

- Frau, M., Massanet, J., Roselló, C., Simal, S. & Cañelas, J. (1997). Evolution of free amino acid content during ripening of Mahon cheese. *Food Chemistry*, 60, 651-657.
- Frau, M., Simal, S., Femenia, A., Sanjúan, E. & Rossello, C. (1999). Use of principal component analysis to evaluate the physical properties of Mahon cheese. *European Food Research and Technology*, 210, 73-76.
- Freitas, A.C. & 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. & Malcata, F.X. (1998). Lipolysis in Picante cheese, influence of milk type and ripening time on free acid fatty profile. *Le Lait*, 78, 251-258.
- Fresno, J.M., Rodríguez Tuero, J., Carballo, J., Bernado, A., González Prieto, J. & Martín Sarmiento. (1988). Evolución de los componentes nitrogenados durante la maduración del queso de Valdejeta. *Anales Facultad de Veterinaria de León*, 34, 101-109.
- Fresno, J.M., Prieto, B., Urdiales, R., Martin-Sarmiento, R. & Carballo, J. (1995). Mineral content of some Spanish cheese varieties. Differentiation by source of milk and by variety from their content of main and trace elements. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 69, 339-345.
- Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., Gonzalez-Prieto, J. & Bernardo, A. (1996). Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish craft goat's milk cheese (Armada variety). *Food Chemistry*, 11, 315-325.
- Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Carballo, J., Bernardo, A. & Gonzalez-Prieto, J. (1997). Proteolytic and lipolytic changes during the ripening of a Spanish craft goat cheese (Armada variety). *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 75, 148-154.
- Furtado, M.M. & Partridge, J.A. (1988). Characterization of nitrogen fractions during ripening of a soft cheese made from ultrafiltration retentates. *Journal of Dairy Science*, 71, 2.877-2.884.
- Gaborit, P., Menard, A. & Morgan, F. (2001). Impact of ripening strains on the typical flavour of goat cheese. *International Dairy Journal*, 11, 315-325.
- Galán Larrubia, E. (2008). Utilización de distintas proporciones de coagulante vegetal procedente del cardo *Cynara cardunculus* en la maduración del queso de oveja. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- García-Fontán, M.C., Michinel, M., Franco, I., Prieto, B. & Carballo, J. (1999). La calidad microbiológica de la leche destinada a la fabricación de queso. *Alimentaria*, 308, 53-60.
- García-Palmer, F.J., Serra, N., Palou, A. & Gianotti, M. (1997). Free amino acids as indices of Mahón cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 80, 1.908-1.917.

- García-Ruiz, A., Cabezas, L., Martín-Álvarez, P.J. & Cabezudo, D. (1998). Prediction of the ripening times of Manchego cheese using multivariate statistical analysis: a preliminary study. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 206, 382-386.
- Garde, S., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (1997). Acceleration of flavour formation in cheese by a bacteriocin-producing adjunct lactic culture. *Biotechnol. Lett*, 19, 1011-1014.
- Garde, S., Tomillo, J., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (2002). Proteolysis in Hispanic cheese manufactured using a mesophilic starter, a thermophilic starter, and bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 415 adjunct culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3479-3485.
- Garde, S., Fernandez-Garcia, E. & Nuñez, M.A. (2004). Comparative study of the semiquantitative analysis of volatile compounds in Hispanic cheese. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 59, 623-626.
- Gaya, P., Carrera, E., Medina, M. & Nuñez, M. (1999). Formation of hydrophobic and hydrophilic peptides during the manufacture of ewes' milk Manchego cheese using different milk coagulants. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 54(10), 556-558.
- Gaya, P., Fernández-García, E., Medina, M. & Nuñez, M. (2003). Seasonal variation in microbiological, chemical, textural and sensory characteristics during ripening of raw ewes' milk Castellano cheese. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 58(7-8), 376-379.
- Ginzinger, W., Jaros, D., Lavanchy, P. & Rohm, H. (1999). Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase. 3. Physical and sensory properties, and conclusions. *Le Lait*, 79, 411-421.
- Giraud, M., Sánchez, H., Muset, G., Pavesi, R., Castañeda, R., Fernández, M., Noseda, D., Markowski, I. & Guiria, G. (2002). Determinación cuantitativa de aminoácidos libres en quesos Reggiano Argentino por derivatización con 6-AQC y RP-HPLC. *Alimentaria*, 337, 121-126.
- Gobbetti, M., Burzigotti, E., Smacchi, A., Corsetti, A. & De Angelis, M. (1997). Microbiology and biochemistry of Gorgonzola cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7, 519-529.
- Gómez, R., Fernández-Salguero, J. & Marcos, A. (1987). Composición en ácidos grasos libres y combinados de algunas variedades de quesos comerciales. *Grasas y aceites*, 38, 23-26.
- Gómez, R., Fernandez-Salguero, J. & Sanjuán, E. (1991). Caracterización química del queso Palmero. *Revista Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, 31, 187-194.

- Gómez, R., Sánchez, E., Vioque, M., Ferreira, J., Tejada, L. & Fernández-Salguero, J. (2001). Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara L.* *Milchwissenschaft-milk science international*, 56(1), 16-19.
- González-Crespo, J. & Mas, M. (1993). Estudio del empleo de fermentos iniciadores autóctonos en la elaboración de queso de cabra de pasta prensada, con leche pasteurizada. *Alimentaria*, 243, 51-53.
- González de Llano, D., Polo, M.C. & Ramos, M. (1995). Study of proteolysis in artisanal cheeses: High performance liquid chromatography of peptides. *Journal of Dairy Science*, 78, 1018-1024
- Gorostiza, A., Cichoski, A.J., Valduga, A.T., Valduga, E., Bernardo, A. & Fresno, J.M. (2004). Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chemistry*, 85, 407-414.
- Grappin, R., Rank, T. & Olson, N. (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening - a review. *Journal of Dairy Science*, 68(3), 531-540.
- Green, M.L. & 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
- Griffiths, M.W. (1986). Use of milk enzymes as indices of heat treatment. *Journal of Food Protection*, 49, 696-705.
- Guerra, B., Mendez, J., Taboada, M. & Fernández-Albalat, M.P. (1999). Training of a panel for the evaluation of cheese flavor. *Milchwissenschaft*, 54, 203-205.
- Guizani, N., Kasapis, S., Al-Attabi, Z. & Al-Ruzeiki, M. (2005). Microbiological, physicochemical and biochemical changes during ripening of camembert cheese made of pasteurized cow's milk. *International Journal of Food Properties*, 5(3), 483-494.
- Guizani, N. & Zaher, A. (2006). Ripening profile of semi-hard standard goat cheese made from pasteurized milk. *International Journal of Food Properties*, 9, 523-532.
- Guo, M.R. & Kindstedt, P.S. (1995). Age related changes in the water phase of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 78, 2099-2107.
- Guo, M.R., Gilmore, J.A. & Kindstedt, P.S. (1997). Effect of sodium chloride on the serum phase of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 80, 3092-3098.
- Gupta, C.B. & Eskin, N.A.M. (1977). Potential use of vegetable rennet on the production of cheese. *Food Technology*, 77, 62-65.
- Hassan, A.N. & Frank, J.F. (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.

- Hassouna, M., Nafti, A. & Ghrir, R. (1996). L'affinage d'un fromage à Pâte Molle et à croûte fleurie de type Camembert au lait cru de Brevis: Aspects Microbiologiques et Physico-chimiques. *Sciences des Aliments*, 16, 187-203.
- Hayaloglu, A., Guven, M., Fox, P., Hannon, J. & McSweeney, P. (2005). Proteolysis in Turkish White-brined cheese made with defined strains of *Lactococcus*. *International Dairy Journal*, 14(7), 599-610.
- Hayaloglu, A.A., Cakmakci, S., Brechany, E.Y., Deegan, K.C. & McSweeney, P.L.H. (2007). Microbiology, biochemistry, and volatile composition of Tulum cheese ripened in goat's skin or plastic bags. *Journal of Dairy Science*, 90(3), 1102-1121.
- Hayaloglu, A.A., Brechany, E.Y., Deegan, K.C., McSweeney, P.L.H. (2008). Characterization of the chemistry, biochemistry and volatile profile of Kuflu cheese, a mould-ripened variety. *Food Science and Technology* 41, 1323-1334.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Da Silva Figueiredo, A.C. & Pais, M.S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara Cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405-1410.
- Hemme, D., Bouillane, C., Metro, F. & Desmazeaud, M.J. (1982). Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sciences des Aliments*, 2, 113-123.
- Herrera, M.I., Peláez-Puerto, P., Fresno, M., Rodríguez, E., Darías, J. & Díaz, C. (2006). Mineral and trace element concentrations of dairy products from goats' milk produced in Tenerife (Canary Islands). *International Dairy Journal*, 16, 182-185.
- Herreros, M., Fresno, J., Prieto, M. & Tornadijo, M. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13(6), 469-479
- Herreros, M.A., Arenas, R., Sandoval, M.H., Castro, J.M., Fresno, J.M. & Tornadijo, M.E. (2007). Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. *International Dairy Journal*, 17(4), 328-335.
- Hollar, C.M., Parris, N., Hsieh, A. & 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.
- Hort, J., Legrys, G. & Woodman, J. (1997a). The relationships between the chemical, rheological and textural properties of Cheddar cheese. *Le Lait*, 77, 587-600.
- Hynes, E., Bergamini, C., Suarez, V. & Zalazar, C. (2003). Proteolysis on Reggianito Argentino cheeses manufactured with natural whey cultures and selected strains of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 86(12), 3831-3840.
- Ibáñez, F.C., Loygorri, S., Ordóñez, A.I. & Torre, P. (1998). Evaluación instrumental y sensorial de la textura en queso de oveja con denominación de origen. *Alimentaria*, 292, 49-53.

- Ismail, A. & Hansen, K. (1972). Accumulation of free amino acids during cheese ripening of some types of Danish cheese. *Milchwissenschaft*, 27, 556-559.
- Iverson, J.L. & Sheppard, A.J. (1989). Detection of adulteration in cow, goat and sheep cheese utilizing gas-liquid chromatographic fatty acids data. *Journal of Dairy Science*, 72, 1707-1712.
- Jack, F.R., Piggot, J.R. & Paterson, A. (1995). Cheddar cheese texture related to salt release during chewing, measured by conductivity: preliminary study. *Journal of Food Science*, 60, 213-217.
- Jacquet, J. & Lenoir, J. (1969). Mecanisme intime de L'affinage des fromages. *Econ. Med. Anim.*, 45, 93-98.
- Jameson, G.W. (1990). Cheese with less fat. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45, 93-98.
- Jaros, D., Ginzinger, W., Stchager, E., Mayer, H.K. & Rohm, H. (1997). Effects of water addition on composition and fracture properties of Emmentaler cheese. *Le Lait*, 77, 467-477.
- Jay, M. (1994). *Microbiología moderna de los alimentos*. Zaragoza. España: Acribia, S.A.
- Jensen, J.P., Reinbold, G.W., Washam, C.J. & Vedamuthu, E.R. (1975). Role of *enterococci* in Cheddar cheese: Organoleptic consideration. *Journal of Milk and Food Tecnology*, 38, 142-145.
- Johnson, E.A., Nelson, J.H. & Johnson, M. (1990). Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk. *Journal of Food Protecction*, 53, 441-452, 519-533, 610-628.
- Jones, B.N., Paabo, S. & Stein, S. (1981). Amino-acid-Analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved ortho-phthaldialdehyde pre-column labelling procedure. *Journal of Liquid Chromatography*, 4, 565-586.
- Juárez, M., Ramos, M. & Martin-Hernández, C. (1991). Quesos españoles de leche de cabra.
- Kaminarides, S., Kalogridis, D. & Massouras, T. (2006). Creation and quality characterization of processed cheeses derived mainly from Halloumi cheese. *Lait*, 86(4), 333-343.
- Kaminogawa, S., Yamauchi, K., Miyazawa, S. & Koya, Y. (1980). Degradation of caseins components by acid protease of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 63, 701-709.
- Kanawjia, S.K., Rajesh, P. Latha, S. & Singh, S. (1995). Flavour, chemical and texture profile changes in accelerated ripened Gouda cheese. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 557-583.
- Kathleen Mahan, L. & Escote-Stump, S. (2001). *Nutricion y dietoterapia de krause*. McGraw-Hill Interamericana.

- Katsiari, M., Alichanidis, E., Voutsinas, L. & Roussis, I. (2001). Proteolysis in reduced sodium Kefalograviera cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. *Food Chemistry*, 73(1), 31-43.
- Kilic, M., Muthukumarappan, K. & Sunsaram, G. (1997). Kinetics of nonenzymatic browning in Cheddar cheese powder during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 21, 379-393.
- Kimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T. & Katsuya, N. (1969). The contribution of peptides and amino acids to the taste of food-stuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17, 689-695.
- Kimura, T., Sagara, Y., Fukushima, M. & Taneya, S. (1992). Effect of pH on submicroscopic structure of String cheese. *Milchwissenschaft*, 47, 574-582.
- Kinstedt, P.S. & Kosikowski, F.V. (1988). Calcium, phosphorus and sodium concentrations in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 71, 285-289.
- Kleter, G. (1977). The ripening of Gouda cheese made under strictly aseptic conditions. II. The comparisons of the activity of different starters and the influence of certain lactobacilli strains. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 177-187.
- Kongo, J.M., Gomes, A.M., Malcata, F.X. & McSweeney, P.L.H. (2009). Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of Sao Jorge - a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chemistry*, 112(1), 131-138.
- Kosikowski, F.V. & Mistry, V. (1997). In: *Cheese and fermented milk foods*. USA: Ed. Conn.
- Kraggerud, H., Skeie, S., Hoy, M., Rokke, L. & Abrahamsen, R.K. (2008). Season and ripening temperature influence fatty acid composition and sensory properties of semi-hard cheese during maturation. *International Dairy Journal*, 18(8), 801-810.
- Krause, W., Partzsch, M. & 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. & Fox, P.F. (1982b). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*, 37, 331-335.
- Kuchroo, C.N. & Fox, P.F. (1983a). Fractionation of water-soluble nitrogen from Cheddar cheese: chromatographic methods. *Milchwissenschaft*, 38, 76-79.
- Lacasa, A. (1986). Quesos de pasta prensada de oveja y cabra. *Revista Española de Lechería*, 7, 11-17.
- Lamberet, G., Degas, C., Delacroix-Buchet, A. & Vassal, L. (1996). Effect of characters linked to A-caprine and F-caprine alpha_(s1)-casein alleles on goat flavor cheesemaking with protein fat exchange. *Le Lait*, 76, 349-361.

- Lane, C., Fox, P., Johnston, D. & McSweeney, P. (1997). Contribution of coagulant to proteolysis and textural changes in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7(6-7), 453-464.
- Larsen, L.B., Benfeldt, C., Rasmussen, L.K. & Petersen, T.E. (1996). Bovine milk procathesin D and cathesin D: coagulation and milk protein degradation. *Journal of Dairy Research*, 63,119-130.
- Lau, K., Barbano, D. & Rasmussen, R. (1991). Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in cheddar cheese during aging. *Journal of Dairy Science*, 74(3), 727-740.
- Lawrence, R.C., Creamer, L.K. & Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 70, 1.748-1.760.
- Lawrie, R.J. & Lawrence, R.C. (1972). Cheddar cheese flavour IV. A new hypothesis to account for the development of bitterness. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 7, 51-53.
- Le Graet, Y. & Gaucheron, F. (1999). Phinduced solubilization of minerals from casein micelles: Influence of casein concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 66, 215-224.
- Lemieux, L., Puchades, R. & Simard, R.E. (1989). Size exclusion HPLC separation of bitter and astringent fraction from Cheddar cheese made with added lactobacilli strains to accelerate ripening. *Journal of Food Science*, 54, 1234-1237.
- Lemieux, L. & Simard, E.R. (1992). Bitter flavour in dairy products II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition. *Lait*, 72, 335-382.
- Lenoir, J. (1963). Note sur la composition en matières azotées des fromages affinés de Camembert, Saint-Paulin et Gruyère de Comté. , 12, 51.
- Leuschener, R.G.K., Kurihara, R. & 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.
- Lindgren, S.E. & Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiological Revision*, 87, 149-164.
- Llorente, B.E., Brutti, C.B. & Caffinis, N.S.O. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara cardunculus* L.) *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 52, 8183.
- Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E.J., Guerrero-Legarreta, I., Soriano-Santos, J. & Escalona-Beundia, H. (1997). Use of fat blends in cheese analogs: Influence on sensory and instrumental textural characteristics. *Journal of Texture Studies*, 28, 619-632.

- Lodes, A., Krause, I., Buchberger, J., Aumann, J. & 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.
- Lopez, M. B., Luna, A., Laencina, J. & Falagán, A. (1999). Cheese-making capacity of goat's milk during lactation: influence of stage and number of lactations. *Journal of the science of Food and Agriculture*, 79, 1105-1111.
- López-Gálvez, G., Amigo, L. & Ramos, M. (1994). Genetic polymorphism of whey proteins in two ovine breeds. *Milchwissenschaft*, 49, 123-125.
- Lucey, J.A. & Fox, P.F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1714-1724.
- Lucey, J., Johnson, M. & Horne, D. (2003). Invited review: perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2725-2743.
- Luna, A., Carrizosa, J. A. & Falagán, A. (1996). Queso de cabra en Murcia. *Agricultura*, 766, 434-445.
- Luyten, H., Vanvliet, T. & Walstra, P. (1991). Characterization of the consistency of gouda cheese - rheological properties. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 45, 1-33-53.
- Macedo, I., Faro, C., & Pires, E.V. (1993). Specificity and Kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L) toward bovine and κ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1537-1540.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X. & Oliveira, J.C. (1993b). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: A review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1725-1739.
- Macedo, A., Malcata, F. & Hogg, T. (1995). Microbiological profile in serra ewes cheese during ripening. *Journal of Applied bacteriology*, 79(1), 1-11.
- Macedo, A.C., Faro, C. & Pires, E. (1996). Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L. Action on bovine α_s - and β -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 42-47.
- Macedo, A.C. & 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. & 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., Vieira, M., Pocas, R. & Malcata, F.X. (2000). Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 10, 769-774.

- Macedo, A.C., Tavares, T.G. & Malcata, F.X. (2002). Purification and characterization of an intracellular aminopeptidase from a wild strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Serra da Estrela cheese. *Enzyme Microbiological Technological*, 32, 41-48.
- Macedo, A.C., Tavares, T.G. & Malcata, 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.
- Madkor, S.A., Tong, P.S. & El Soda, M. (2000). Evaluation of commercial adjuncts for use in cheese ripening: 5. Effect of added freeze-shocked adjunct lactobacilli on proteolysis and sensory quality of reduced fat Cheddar cheese. *Milchwissenschaft-milk Science International*, 55(7), 382-386
- Magboul, A.A.A. & Mcsweeney, P.L.H. (1999). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *International Dairy Journal*, 9, 107-116.
- Mallatou, H., Pappa, E. & Massouras, T. (2003). Changes in free fatty acids during ripening of Teleme cheese made with ewes', goats', cows' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 13, 211-219.
- Mallatou, H., Pappa, E. & Boumba, V. (2004). Proteolysis in Teleme cheese made from ewes', goats' or a mixture of ewes' and goats' milk. *International Dairy Journal*, 14(11), 977-987.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., Anifantakis, E.M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 153-161.
- Marchesseau, S., Gastaldi, E., Lagaude, A. & Cuq, J.L. (1997). Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. *Journal of Dairy Science*, 80, 1483-1489.
- Marcos, A., Esteban, M.A., León, F. & Fernández-Salguero, J. (1979b). Electrophoretic patterns of European cheese: comparison and qualification. *Journal of Dairy Science*, 62, 892-900.
- Marcos, A., Alcalá, M., Leon, F., Fernández-Salguero, J. & Esteban, M.A. (1981). Water activity and chemical composition of cheese. *Journal of Dairy Science*, 64, 622-626.
- Marcos, A.M., Estebán, M.A., Alcalá, M. & Fernández-Salguero, J. (1983). Chemical composition and water activity of Spanish cheeses. *Journal of Dairy Science*, 66, 2488-2493.
- Marcos, A.F.J., Esteban, M.A., León, F., Alcalá, M. & Beltrán de Heredia, F.H. (1984). El queso de los Ibores: composición química, valor nutritivo y estabilidad. *Industrias Lácteas Españolas*, 64, 15-20.

- Marcos, A.F.J., Esteban, M.A., León, F., Alcalá, M. & Beltrán de Heredia, F.H. (1984). El queso de Badaia: composición química, valor nutritivo y estabilidad. *Industrias Lacteas Españolas*, 65, 21-28.
- Marcos, A., Fernández-Salguero, J., Esteban, M. A., León, F., Alcalá, M. & Beltrán de Heredia, F.H. (1985). Quesos españoles. Tablas de composición, valor nutritivo y estabilidad. Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba.
- Marcos, A. & Mora, M.T. (1982). Proteolisis del queso Manchego: evolución de los aminoácidos libres. *Archivos de zootecnia*, 31, 115-129.
- MARM. Anuario de Estadística del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 1999-2008. Disponible en:
<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm>
- Martin, P., Ollivier-Bousquet, M. & Grosclaude, F. (1999). Genetic polymorphism of caseins: a tool to investigate casein micelle organization. *International Dairy Journal*, 9, 163-171.
- Martin-Hernández, M.C., Juárez, M. & Ramos, M. (1992a). Differentiation of milks and cheeses according to species based on the mineral content. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 194, 541-544.
- Martinez-Cuesta, M.C., Requena, T. & Pelaez, C. (2001). Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 79-88.
- Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., González, J. Rebollo, J.E. & Cáceres, P. (2002). Ibore goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Le Lait*, 82, 579-587.
- Mataix, J. (2002). *Nutrición y alimentación humana*. ERGON.
- Mattson, S. & Swartling, R. (1954). Determination of calcium and phosphorus in cheese. Dairy Dep. Anarp. Inst., Meddelande, 43, p. 1.
- Mauropoulos, A. & Arvanitoyannis, I. (1999). Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines. *Food Control*, 10(3), 213-219
- Mayer, H.K. (1997). Quality-Control of grated Parmesan products using an electrophoretic ripening index. *Milchwissenschaft*, 52, 443-448.
- McCance & Widdowson's. (1993). The composition of Foods Sixth Summary Edition, Compiled by Food Standards Agency and Institute of Food Research.
- McSweeney, P., Olson, N., Fox, P., Healy, A. & Hojrup, P. (1993). Proteolytic specificity of chymosin on bovine alpha_{s1}-casein. *Journal of Dairy Research*, 60(3), 401-412.
- McSweeney, P.L.H. & Fox, P.F. (1997). Indices of Cheddar cheese ripening, pp 73-89. *Proceedings of the 5th Cheese Symposium*. Moorepark. Femory. Cork. Ireland.

- McSweeney, P. & Sousa, M. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80(3), 293-324.
- Medina, M., Gaya, P. & Núñez, M. (1992). Gredos goat's milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, 59, 563-566.
- Mendia, C., Ibáñez, F.C., Torre, P. & Barcina, Y. (1999). Effect of pasteurization on the sensory characteristics of a ewe's-milk cheese. *Journal of Sensory Studies*, 14, 415-424.
- Mendía, C. (2000). Cambios proteolíticos y organolépticos del queso Idiazábal elaborado en diferentes épocas del año: influencia de la pasteurización de la leche y del cultivo iniciador. *Tesis Doctoral*. Universidad Pública de Navarra, España.
- Menéndez, S., Centeno, J.A. & Rodríguez-Otero, J.L. (1999b). Enterococos en quesos. *Alimentaria* 308, 69-73.
- Michaelidou- Koniordou, A.M. (1997). Protein hydrolysis during ripening of Feta cheese. *Tesis Doctoral*. Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Grecia.
- Michaelidou, A.M., Alichanidis, E., Urlaub, H., Polychroniadou, A. & Zerfiridis, G.K. (1998). Isolation and identification of some major water-soluble peptides in Feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 82, 3109-3116.
- Mohedano, A.F., Fernández, J., Garde, S., Medina, M., Gaya, P. & Núñez, M. (1998). The effect of the cysteine proteinase from *Micrococcus* sp. INIA 528 on the ripening process of Manchego cheese. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 391-396.
- Molimard, P. & Spinnler, H.E. (1996). Dairy Foods. Review, compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses, origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.
- Moreno, R., Amaro, M.A. & Zurera, G. (1994a). Copper, iron and zinc variations in Manchego-type cheese during the traditional cheesemaking process. *Food Chemistry*, 49, 67-72.
- Moreno, R., Pozo, R., Zurera, G. & Amaro, M.A. (1994b). Calcium, magnesium, manganese, sodium and potassium variations in Manchego-type cheese during ripening. *Food Chemistry*, 50, 373-378.
- Morishita, T., Deguchi, Y., Yajima, M., Sakurai, T. & Yura, T. (1981). Multiple nutritional requirements of Lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*, 148, 64-71
- Morgan, F. & Gaborit, P. (2001). The typical flavour of goat milk products: technological aspects. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 38-40.
- Mor-Mur, M., Carretero, C., Pla, R. & Guamis, B. (1994). Microbiological changes during ripening of Cendrat del MonSTec, a goat's milk cheese. *Food Microbiology*, 11, 177-185.
- Mossel, D.A.A. & Moreno, B. (1985). *Microbiología de los alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.

- Mulet, A., Escriche, I., Rossello, C. & Tarrazo, J. (1999). Changes in the volatile fraction during ripening of Mahón cheese. *Food Chemistry*, 65, 219-225.
- Muñoz, N., Ortigosa, M., Torre, P. & Izco, J. (2003). Free amino acids and volatile compounds in an ewe's milk cheese as affected by seasonal and cheese-making plant variations. *Food Chemistry*, 83(3), 329-338.
- Nájera, A.I., Barrón, L.J.R. & Barcina, Y. (1993) Revisión. Comparación de la fracción lipídica del queso de vaca, oveja y cabra, y la influencia sobre su calidad. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 334, 345-363.
- Nájera, A.I., Barcina, Y., De Renobales, M. & Barrón, L.J.R. (1999a). Influence of salt content on the triglyceride composition of Idiazábal cheese during ripening. *Le Lait*, 79, 527-534.
- Netherland Standard NEN 3059 (1969). Butyrometric determination of the fat content of cheese (Gerber-Van Gulik method). *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 23, 214.
- Noomen, A. (1978). Activity of proteolytic enzymes in simulated soft cheeses (Meshanger type). Activity of calf rennet. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 32, 49-68.
- NORMA ESPAÑOLA UNE 34 105hl (1969). Métodos de ensayo de queso: Obtención de muestras. Madrid. España: IRANOR.
- Norma UNE 55-118 (1979)
- Núñez, M., Fernández del Pozo, B., Rodríguez-Marín, M.A., Gaya, P. & Medina, M. (1991). Effect of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *Journal of Dairy Research*, 58, 511-519.
- O'Mahony, J.A., Sousa, M.J. & 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, 52-58
- O'Sullivan, N.A., Sousa, M.J., O'Grady-Walsh, D., Uniacke, T., Nelly, A.L. & McSweeney, P.L.H. (2005). Ripening of Camembert-type cheese made from caprine milk using calf rennet or kid rennet as coagulant. *International Journal of Dairy Technology*, 58, 13-17.
- Olarte, C., Sanz, S., González-Fandos, E. & Torre, P. (1999). Microbiological and physicochemical characteristics of Cameros cheese. *Food Microbiology*, 16, 615-621.
- Olarte, C., Sanz, S., González-Fandos, E. & Torre, P. (2000). The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 421-429.
- Oliszewski, R., Van Nieuwenhove, C., González, S. & Pérez Chaia, A. (2008). Influence of autochthonous Argentine gota lactobacillus in ripening of slurry cheese models. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 256-264
- Olson, N.F. & Johnson, M.E. (1990). Low-fat cheese technology. *Journal of Food Engineering International*, December, 31-37.

- Ordoñez, J.A. (1987). Aspectos microbiológicos y bioquímicos de la maduración del queso. *Industrias Lácteas Españolas*, 106, 48-51.
- Ordóñez, A.I., Ibáñez, F.C., Torre, P. & 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. & Perez-Elortondo, F.J. (1998a). Application of multivariate-analysis to sensory characterization of ewes milk cheese. *Journal of Sensory Studies*, 13, 45-55.
- Ortigosa, M., Torre, P. & Izco, J.M. (2001). Effect of pasteurisation of ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of Roncal cheese. *Journal of Dairy Science*, 84, 1320-1330.
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Oneca, M., Irigoyen, A. & Torre, P. (2004). Effects of pasteurisation on microorganism and sensory attributes in Roncal cheese from ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 59, 392-396.
- Ortiz de Apodaca, M.J., Amigo, L. & 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. & Voogt, P. (1986). *Análisis de los nutrientes de los alimentos*. Zaragoza: Ed. Acribia.
- Oumer, A., Garde, S., Medina, M. & Núñez, M. (1999). Defined starter system including a bacteriocin producer for the enhancement of cheese flavour. *Biotechnology Techniques*, 13, 267-270.
- Oumer, A., Fernández-García, E., Garde, R.M.S., Medina, M. & Nuñez. M. (2001). Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with bacteriocin-producing adjunct culture. *Journal of Dairy Research*, 68(1), 117-129.
- Padmanabhan, S., Chitre, A. & Shastri, N. (1993). Milk clotting protease isolated from *Dieffenbachia maculata*. *Die Nahrung*, 37, 99-101.
- Pagliarini, E., Lembo, P. & Bertuccioli, M (1991). Recent advancements in sensory analysis of cheese. *Italian Journal of Food Science*, 2, 85-99.
- Pagliarini, E., Monteleone, E. & Wakeling, I. (1997). Sensory Profile Description of Mozzarella Cheese and Its Relationship with Consumer Preference. *Journal of Sensory Studies*, 12, 285-301
- Paleari, M.A., Moretti, V.M., Beretta, G. & Caprino, F. (2008). Chemical parameters, fatty acids and volatile compounds of salted and ripened goat thigh. *Small Ruminant Research*, 74, 140-148.
- Pappa, E.C., Kandarakis, I., Anifantakis, E.M. & Zerfiridis, G.K. (2006). Influence of types of milk and culture on the manufacturing practices, composition and sensory characteristics of Teleme cheese during ripening. *Food Control*, 17, 570-581.

- Pappa, E.C., & Sotirakoglou, K. (2008). Changes of free amino acid content of Teleme cheese made with different types of milk and culture. *Food Chemistry*, 111(3), 606-615.
- Park, Y.W. (2001). Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 84, 84-92
- Parra, L., Requena, T., Casal, V. & Gómez, R. (1996). Proteolytic activity of lactobacilli in a model goats' milk curd system. *Lett Appl Microbiol*, 23, 375-378.
- Parris, N., Hollar, C.M., Hsieh, A. & Cockley, H. (1997). Thermal stability of whey protein concentrate mixtures: Aggregate formation. *Journal of Dairy Science*, 80, 19-28.
- Pavia, M., Guamis, B., Trujillo, A., Capellas, M. & Ferragut, V. (1999). Changes in microstructural, textural and colour characteristics during ripening of Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *International Dairy Journal*, 9(2), 91-98.
- Pelaez-puerto, P., Fresno, M., Dias Romero, C., & Darías, J. (2004). Physicochemical characterization of fresh cheeses elaborated with goat milk in the island of tenerife. *Journal of Food*, 4(2), 103-108.
- Pelissier, J.P. & Manchon, P. (1976). Comparative study of the bitter taste of enzymic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. *Journal Food Science*, 41, 231-242
- Pérez-Elortondo, F.J., Albisu, M. & Barcina, Y. (1999a). Brining time effect on physicochemical and microbiological parameters in Idiazábal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 139-149.
- Perotti, M.C., Bernal, S.M., Meinardi, C.A. & Zalazar, C.A. (2005). Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. *International Dairy Journal*, 15, 1150-1155.
- Phelan, J.A. (1973). Laboratory and field tests on new milk coagulants. *Dairy Industry*, 38, 418-421.
- Picon, A., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (1994). The effect of liposome encapsulation of chymosin derived by fermentation on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 77, 16-23.
- Picon, A., Serrano C., Gaya P., Medina M. & Nuñez M. (1996). The effect of liposome encapsulated cyprosins on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 79, 1.699-1.705.
- Picon, A., Gaya, P., Medina, M. & Nuñez, M. (1997). Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for cheese ripening. *Biotechnology Letters*, 19, 345-348.
- Pierre, A., Michel, F., Le Graet, Y. & Berrier, J. (1999). Soft goat cheeses at different ripening stages: cheese structure, composition and non solvent water. *Lait*, 79, 489-501.
- Piggott, J.R. & Hunter E.A. (1999). Evaluation of assessor performance in sensory analysis [Review]. *Italian Journal of Food Science*, 11, 289-303.

- Pino Campos, A. (2007). Utilización de enzimas coagulantes del cardo *Cynara Cardunculus* en la fabricación del queso de cabra. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- Pino, A., Prados, F., Galan, E., McSweeney, P.L.H. & Fernandez-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42(3), 324-330.
- Pizzillo, M., Clips, S., Cifuni, G.F., Fedele, V. & Rubino, R. (2005). Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. *Livestock production science*, 94, 33-40.
- Polo, C., Ramos, M. & Sánchez, R. (1985). Free amino-acids by high-performance liquid-chromatography and peptides by gel-electrophoresis in Mahon cheese during ripening. *Food Chemistry*, 16(2), 85-96.
- Polychroniadou, A. (2001). Eyes in cheese: A concise review. *Milchwissenschaft*, 56, 74-77.
- Pompei, C., Casiraghi, E., Lucisano, M. & Dellea, C. (1991). Multivariate statistical methods for the characterization of Provolone cheese. I. Selection of variables. *Italian Journal of Food Science*, 3, 99-107.
- Poto, A. (1992). Importancia económica del ganado caprino de aptitud láctea. In Anonymous Jornadas de Patología de Pequeños Rumiantes. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia.
- Pouillet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P. & Larriba, G. (1991). Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. *Journal of Dairy Research*, 58, 231-238.
- 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., Cabezas, L. & McSweeney, P. (2004). Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chemistry*, 84(2), 213-218.
- Póveda, J.M. & Cabezas, L. (2006). Free fatty acid composition of regionally-produced Spanish gota cheese and relationship with sensory characteristics. *Food Chemistry*, 95, 307-311.
- Póveda, J.M., Sánchez-Palomo, E., Pérez-Coello, M.S., Cabezas, L. (2008). Volatile composition, olfactometry profile and sensory evaluation of semi-hard Spanish goat cheeses. *Dairy Science and Technology*, 88, 355-367.
- Powell, I.B., Broome, M.C. & Limsowtin, G.K.Y. (2002). Starter cultures: General aspects. Pages 261-268 in *Encyclopedia of Dairy Science*. Ed Academia Press, London, UK.

- Prados, F. (2005). Estudio de las características bioquímicas, físico-químicas, microbiológicas y sensoriales de quesos tipo Manchego elaborados con diversos tipos de coagulante. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. España.
- Prados, F., Pino, A. & Fernández-Salguero, J. (2007). Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 556-561.
- Precht, D. & Abd-el-Salam, M.H. (1985). Gliceride composition of fat in Damiaty cheese. *Milchwissenschaft*, 40, 213-215.
- Prentice, J. H. (1987). Cheese, Chemistry, physics and microbiology. New York: Elsevier Appl. Science.
- Prieto, B., Franco, I., González Prieto, J., Bernardo, A. & Carballo, J. (2002). Compositional and physico-chemical modifications during the manufacture and ripening of León raw cows milk cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 725-735.
- Puchades, R., Lemieux, L. & Simard, R.E. (1989). Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. *Journal of Food Science*, 54, 885-888.
- Quattrochi, O., Abelaira, S. & Laba, R. (1992). *Introducción al HPLC. Aplicación y práctica*. Ed. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires.
- Rafecas, M., Boatella, J. & 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.
- Ramos, M. & 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., Barreto, R. & Ordoñez, J.A. (1981). Evaluation of a specific starter for Manchego cheese production. *Milchwissenschaft*, 36, 528-531.
- Rank, T.C., Grappin, R. & Olson, N.F. (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening: review. *Journal of Dairy Science*, 68, 801-805.
- Reglamento 2004/853/CE de 29 de Abril, que establece normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal
- Resmini, P., Saracchi, S., Volonterio, G. & Bozzolati, M. (1969). Gli amminoacidi liberi nel formaggio Taleggio. *Il Latte*, 43, 99-109.
- Rodríguez Tuero, J., Carballo, J., González Raurich, M., Martín-Sarmiento, R., Bernardo, A. & González Prieto, J. (1989). Cálculo de la actividad del agua en el queso de Valdeleja. *Anales Facultad de Veterinaria de León*, 35, 161-167.

- Rogers, N.R., Drake, M.A., Daubert, C.R., McMahon, D.J., Bletsch, T.K. & Foegeding, E.A. (2009). The effect of aging on low-fat, reduced-fat, and full-fat Cheddar cheese texture. *Journal of Dairy Science*, 92, 4756-4772.
- Rohm, H., Lederer, K. & Ginzinger, W. (1992). Relationship between rheological properties and composition of Swiss-type cheese. Multiple regression analysis. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 27, 406-414.
- Rohm, H., Jaros, D. & Riedlerhellrigl, M. (1997). A simple distillation in hard cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 30, 767-769.
- Rohm, H. & Jaros, D. (1997a). Colour of hard cheese. 1. Description of colour properties and effects of maturation. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 203, 241-244.
- Rohm, H. & Jaros, D. (1997b). Colour of hard cheese. 2. Factors of influence and relation to compositional parameters. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A*, 204, 259-264.
- Rossano, R., Piraino P., D'ambrosio A., O'Connell O.F., Ungaro N., McSweeney, L. & Riccio P. (2005). Proteolysis in miniature cheddar-type cheeses manufactured using extracts from the crustacean *Munida* as coagulant. *Journal of Biotechnology*, 120, 220-227.
- Ruas-Madiero, P., Bada-Gancedo, J.C., Alonso, L. & De Los Reyes Gavilán C.G. (1998a). Afuega'l Pitu cheese quality: Carbon dioxide addition to refrigerated milk in acid coagulated cheesemaking. *International Dairy Journal*, 8, 951-958.
- Rul, F. & Monnet, V. (1997). Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 82(6), 695-704.
- Saldo, J., McSweeney, P.H.L., Sendra, E., Kelly, A.L. & Guamis, B. (2002). Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 12, 35-44.
- Salles, C., Herve, C., Septier, C., Demaizieres, D., Lesschaeve, I., Issanchou, S. & Le Quere, J. (2000). Evaluation of taste compounds in water-soluble extract of goat cheeses. *Food Chemistry*, 68(4), 429-435.
- Sánchez, D., Carmona, M.A., Gomez, R. & Fernández-Salguero, J. (1995). Evolución de algunos grupos microbianos durante la maduración del queso de Los Pedroches. *Alimentaria*, 263, 87-90.
- Sánchez, E. (1999). Evolución de la flora microbiana durante la maduración de quesos de oveja artesanos en diferentes condiciones de elaboración. *Tesis Doctoral*. Universidad de Córdoba. España.
- Sancho, J. & Bota, J.J. de Castro. (2001). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. Edición de la Universidad de Barcelona. Barcelona.

- 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. & 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., Saavedra, P., Millán, R., Castelo, M. & 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.
- Sanjuan, E., R. Millan, P., Saavedra, M.A., Carmona, R., Gomez, R. & 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.
- Santoro, M. & Faccia, M. (1998). Influence of mould size and rennet on proteolysis and composition of Canestrato Pugliese cheese. *Italian Journal of Food Science*, 10, 217-228.
- Sasaki, M., Bosman, B. & Tan, P. (1995). Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *Journal of Dairy Research*, 62(4), 601-610.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilper-Bälz, R., Collins, M.D. & 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. & Kilper-Bälz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of *Streptococci*, *Enterococci* and *Lactococci*: A review. *Systematic Applied Microbiology* 10, 1-19.
- Schlessler, J.E., Schmidt, S.J. & Speckman, R. (1992). Characterization of chemical and physical changes in Camembert cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 75, 1.753-1.760.
- Scott, R. (2002). *Fabricación de queso*. Zaragoza. España: Editorial Acribia, S.A. 3ª Edición.
- Serradilla, J.M., Carrizosa, J.A., Falagán, A. & Urrutia, B. (2001). Estudio preliminar del efecto del gen de la caseína α_{s1} sobre el rendimiento del queso de la leche de cabra. In Anonymous XXVI *Jornadas científicas de la SEOC*. (pp. 131). Sevilla.
- Serrano, C.E., González, M.E. & Serrano, E. (1997a). Aplicación experimental del sistema ARICPC en una quesería artesanal. *Alimentaria*, 288, 25-31.
- Shakeel-Ur-Rehman, Banks, J.M., McSweeney, P.L.H. & Fox, P.F. (2000). Effect of ripening temperature on the growth and significance of non starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 10, 45-53.
- Shalabi, S.I. & Fox, P.F. (1987). Electrophoretic análisis of cheese: comparison of methods. *Journal of Food Science and Technology*, 11, 135-151.

- Shao, W.L., Yuksel, G.U., Dudley, E.G., Parkin, K.L. & Steele, J.L. (1997). Biochemical and Molecular Characterization of PEPR, a Dipeptidase, from *Lactobacillus-Helveticus* Cnrz32. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3438-3443.
- Sheehan, J.J., Patel, A.D., Drake, M.A. & McSweeney, P.L.H. (2009). Effect of partial or total substitution of bovine for caprine milk on the compositional, volatile, non-volatile and sensory characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 19, 498-509.
- Shinoda, I., Noshio, Y., Otagiri, K., Okai, H. & Fukui, S. (1986b). Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. 3. Bitterness of diastereomers of a hexapeptide (arg-arg-pro-pro-phe-phe) containing d-phenylalanine in place of l-phenylalanine. *Agricultural and biological chemistry*, 50(7), 1785-1790.
- Sidrach, L., García-Cánovas, F., Tudela, J. & Rodriguez-Lopez, J.N. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase. *Aphytochemistry*, 66(1), 41-49.
- Singh, T.K., Drake, M.A. & Caldwell, K.R. (2003). Flavor of Cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 139-162.
- Skeie, S., Narvhus, J.A., Ardo, Y., Thorvaldsen, K. & 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.
- Sousa, M., Ardo, Y. & McSweeney, P. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11 (4-7, Sp. Iss. SI), 327-345.
- Sousa, M.J. & 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. & Malcata, F.X. (1997a). Comparison of plant and animal rennet in terms of microbiological, chemical, and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 74-81.
- Sousa, M.J. & Malcata, F.X. (1997b). 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. & 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. & 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. & 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. *Lait*, 82(2), 151-170.
- Sousa, M. & McSweeney, P. (2001). Studies on the ripening of Cooleeney, an Irish farmhouse Camembert-type cheese. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 40(1), 83-95.
- Stampanoni, C.R. & 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 Texture Studies*, 22, 367-380.
- Tamer, I.M. (1993). Identification and parcial purification of a novel milk enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Lett.*, 15, 427-432
- Tan, P.S.T. & Konings, W.N. (1993). New endopeptidase obtd. from lactic acid bacteria - used for preparing antibodies and foods, e.g. cheese and meat products, having cobalt ion dependent activity with good substrate range. Patent Number(s): EP522203-A; EP522203-A1; CA2068811-A; JP5268955-A.
- Tavaria, F.K., Sousa, M.J., Domingos, A., Malcata, F.X., Brodelius, P., Clemente, A. & Pais, M.S. (1997). Degradation of casein from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agriculture chemistry*, 45, 3760-3765
- Tejada, L., Gómez, R., Vioque, M., Sánchez, E., Mata, C. & 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. (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., Gomez, R. & Fernandez-Salguero, J. (2007). Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: Calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *Journal of Food Quality*, 30(1), 91-103.
- Tejada, L. & Fernández-Salguero, J. (2003). Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Italian Journal of Food Science*, 15, 125-131.
- Thierry, A., Maillard, M.B. & 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. & Pritchard G.G. (1987). Proteolytic-Enzymes of Dairy Starter Cultures. *Fems Microbiology Reviews*, 46, 245-268.

- Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Bernardo, A., Martín-Sarmiento, R. & Carballo, J. (1995). Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Le Lait*, 75, 551-570.
- Tornadijo, M.E., Fresno, J.M.B., A., Martín-Sarmiento, R., & Carballo, J. (1998). Study of the yeast during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk. *Le Lait*, 78, 647-659.
- Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Bernardo, A., Martín-Sarmiento, R. & Carballo, J. (1998). Penicillium species during the manufacturing and ripening of Armada raw goat's milk cheese: identification, characteristics and in vitro potential toxins production. *Le Lait*, 78, 661-672.
- Trujillo, A., Guamis, B. & Carretero, C. (1995). Proteolysis of goat beta-casein by calf rennet under various factors affecting the cheese ripening process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(6), 1472-1478.
- Trujillo, A.J.B., Casals, I., Fernández, P. & Guamis, B. (1997b). Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 309-319.
- Trujillo, A.J., Buffa, M., Casals, I., Fernández, P. & Guamis, B. (2002). Proteolysis in goat cheese made from raw, pasteurized or pressure-treated milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 309-319.
- Tunick, M.H. (2000). Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. *Journal Dairy Science* 83 1892-1898.
- Uceda, R., Guillen, A.M., Gaya, P., Medina, M. & Núñez, M. (1994a). Chemical and rheological characteristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw milk preserved by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft*, 49, 494-498.
- Upadhyay, V.K., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A.A. & Fox, P.F. (2004). Proteolysis in cheese during ripening. In P.F.Fox, P.L.H.McSweeney, T.M.Cogan & T.P.Guinee (Eds) *Cheese: chemistry, physics and microbiology* (3rd ad., pp 391-433). Amsterdam: Elsevier Academic press.
- Urbach, G. (1993). Relations between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*, 3, 389-422.
- Ustunol, Z. & Zeckzer, 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.
- Van Hekken, D.L., Tunick, M.H. & Park Y.W. (2004). Rheological and proteolytic properties of Monterey Jack goat's milk cheese during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5372-5377.

- Van Vliet, T. & Dentener-Kikkert, A. (1982). Influence of the composition of the milk fat globule membrana on the rheological properties of acid milk gels. *Netherland Milk Dairy Journal*, 36, 261-266.
- Vanboekel, M.A.J.S. & Crijs, C.L. (1994). Behavior of the proteose peptone fraction during renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48, 117-126.
- Varnam, H. & Sutherland, J. (1995). *Milk and milk products: Technology, chemistry and microbiology*. London UK: Chapman y Hall.
- Vefoupoulu, A., Alichanidis, E. & Zerfiridis, G. (1989). Accelerated ripening of Feta cheese with heat-shocked cultures or microbial proteinases. *Journal of Dairy Research*, 56, 285-296.
- Veisseyre, R. (1988). *Lactología técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Ed. Acribia.
- Vema, A. & Anand, S.R. (1989). Biochemical changes associated with ripening of Cheddar cheese from buffalo milk: effect of bacterial enzymes in accelerating the cheese ripening. *Indian Journal of Dairy Science*, 42, 584-588
- Verdini, R.A., Zorrilla S.E. & Rubiolo, A.C. (2002). Free amino acid profiles during ripening of Port Salut Argentino cheese after frozen storage. *Journal of Food Science*, 67, 3.264- 3.270.
- Vidal-Aragón, M.C., Sabio, E., Gonzalez, J. & Mas, M. (1994). Contribución al estudio de los compuestos volátiles de queso de cabra de Extremadura: efecto de la época de elaboración. *Alimentaria*, 31, 25-29.
- Vieira de Sá, F., Machado, B.R., Pinto, O.P.R., Vicente da Cruz, I.M., Carneiro, M.J.D., Barbosa, M.M.A. & Reis, M.M.C. (1970). *Maturação em queijos de ovelha Serra e Serpa. Química e Biologia 6*. INII. Lisboa.
- Vioque, M., Gomez, R., Sanchez, E., Mata, C., Tejada, L. & Fernandez-Salguero, J. (2000). Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardúnculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 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.
- Visser, S., Slangen, K.J. & Hup, G. (1975). Some bitter peptides from rennet-treated casein. A method for their purification, utilizing chromatographic separation on silica gel. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 29, 319-334.
- Visser, F.M.W. (1977a). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese III. Protein breakdown: analysis of the nitrogen and amino acid fraction. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 210-239.

- Visser, F.M.W. & de Groot-Mostert, A.E.A. (1977b). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese IV. Protein breakdown: a gel electrophoretical study. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31, 247-264.
- Visser, S., Slangen K.J., Hup G. & Stadhouders J. (1983a). Bitter Flavor in Cheese .3. Comparative Gel-Chromatographic Analysis of Hydrophobic Peptide Fractions from 12 Gouda-Type Cheeses and Identification of Bitter Peptides Isolated from A Cheese Made with *Streptococcus Cremoris* Strain Hp. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 37, 181-192.
- Walpole, R.E. & Myers, R.H. (1991). *Probabilidad y Estadística*. McGraw-Hill. 4ª Edición.
- Walstra, P. & Jenés, R. (1987). *Química y física lactológica*. Zaragoza. Editorial Acribia.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A. & Van Boekel, M.A.J.S. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Zaragoza: Editorial Acribia
- Wallace, J.M. & 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.
- Weimer, B., Dias, B., Ummadi, M., Broadbent, J., Brennand, C., Jaegi, J., Johnson, M., Milani, F., Steele, J. & Sisson, D.V. (1997). Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence Cheddar cheese ripening. *Lait*, 77, 383-398.
- Weintein, M.J. & Dootlittle, R.F. (1972). Differential specificities of thrombin, plasmin and trypsin with regard to synthetic and natural substrates and inhibitors. *Biochimica and Biophysics Acta*, 258,577-590.
- Wijesundera, C. & Drury, L. (1999). Role of milk-fat in production of Cheddar cheese flavor using a fat substituted cheese model. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54, 28-35.
- Wilkinson, M.G., Guinee, T.P., O'Callaghan, D.M. & Fox, P.F. (1992). Effects of commercial enzymes on proteolysis and ripening in Cheddar cheese. *Le Lait*, 72, 449-459
- Wilkinson, M.G. (1993). Acceleration of cheese ripening. In P.F. Fox (Ed), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 1, 523-556.
- Williams, A.G. & Banks, J.M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal*, 7, 763-774
- Williams, A.G., Withers, S.E. & Banks, J.M. (2000). Energy sources of non starters lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 10, 17-23.
- Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, Y. & Kiso, H. (1982). Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwi fruit, and miut: occurrence and partial characterization. *Agriculture Biological Chemistry*, 46, 1983-1986.

- Yan, T.R., Azuma N., Kaminogama, S. & Yamauchi, K. (1987). Purification and characterization of a substrate-size-recognizing metalloendopeptidase from *Streptococcus cremoris* H61. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2.296-2.301.
- Yang, S. & Silva, E. (1995). Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2541-2562.
- Yubero, A. (1985). Situación actual de la producción de quesos de cabra y su futuro. *Revista Española de Lechería*, 6, 17-24.
- Yun, J.J., Barbano, D.M. & 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. & Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11(4-7, Sp. Iss. SI), 185-201.
- Zannoni, M. (1995). Preliminary results of employ of an artificial nose for the evaluation of cheese. *Science Tecnological Lait Casearia*, 46, 277-289
- Zarate, V., Belda, F., Perez, C. & Cardell, E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7(10), 635-641.